

Bedeutung der PTEN-Splice-Variante PTEN- Δ für die Tumorprogression

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Ines Breuksch
geboren am 28.03.1989 in Aurich

Mainz, Mai 2017

**“Life is like a camera.
Just focus on what’s important and capture the good times,
develop from the negatives and if things don’t work out,
just take another shot.”**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumorgenese	1
1.1.1	Kennzeichen von Tumoren	2
1.2	Der Tumorsuppressor PTEN	4
1.2.1	Struktur	4
1.2.2	Funktion	6
1.2.3	Regulation.....	9
1.2.4	Lokalisation	13
1.2.5	Protein-Protein-Interaktionen	14
1.3	Splice-Varianten von PTEN.....	15
1.4	Alternatives Splicen	17
1.5	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Substanzen	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3	Gebrauchsmaterialien	22
2.1.4	Kit-Systeme.....	22
2.1.5	Geräte	23
2.1.6	Antikörper.....	24
2.1.6.1	Primäre Antikörper	24
2.1.6.2	Sekundäre Antikörper.....	24
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	25
2.1.8	Enzyme	28
2.1.9	Oligonukleotide	28
2.1.10	Vektoren.....	31
2.1.11	Bakterienstämme	32
2.1.12	Gewebeproben	32
2.1.13	Kontinuierliche Zelllinien	33
2.2	Zellkulturmethoden	33
2.2.1	Steriles Arbeiten.....	33
2.2.2	Kultivierung humaner Zelllinien	33
2.2.3	Zellzahlbestimmung	34

2.2.4	Kryo-Konservierung	34
2.2.5	Stabile Transfektion	34
2.2.6	Durchflusszytometrie	35
2.2.7	Migration in der Boyden-Kammer	35
2.2.8	Adhäsion an Komponenten der Extrazellular-Matrix	37
2.2.9	MTT-Assay.....	37
2.2.10	Proliferationsassay.....	38
2.2.11	<i>RealTime-GloTM</i> Assay.....	38
2.2.12	<i>Cell Death Detection</i> Assay	39
2.3	Arbeiten mit Proteinen	39
2.3.1	Proteinextraktion aus Zellkulturen.....	39
2.3.2	Proteinextraktion aus Patientengewebe.....	40
2.3.3	Protein-Konzentrationsbestimmung	40
2.3.4	Proteinfällung und Lösen von Proteinen	40
2.3.5	SDS-PAGE	41
2.3.6	Westernblot.....	41
2.3.7	Proteindetektion	42
2.3.8	Coomassie-Brillant-Blau Färbung	42
2.3.9	Phospho-Kinase Array	43
2.3.10	<i>In vitro</i> Translation (IVT).....	44
2.4	Mikrobiologische Methoden.....	44
2.4.1	Herstellung chemokompetenter Zellen	44
2.4.2	Transformation chemokompetenter Zellen.....	44
2.4.3	Ansetzen von Dauerkulturen.....	45
2.5	Arbeiten mit Nukleinsäuren	45
2.5.1	RNA-Isolierung.....	45
2.5.2	DNA-Isolierung.....	46
2.5.3	cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase	47
2.5.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
2.5.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.5.7	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen	49
2.5.8	Aufreinigung von DNA	49
2.5.9	Sequenzierung.....	50

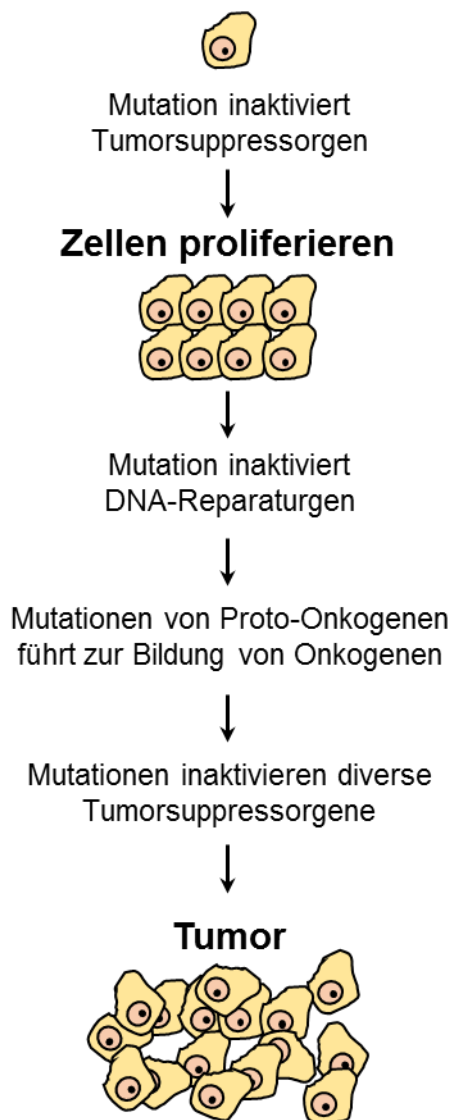
2.5.10	Fällung von DNA.....	51
2.5.11	Klonierungsschritte	51
2.5.11.1	Restriktion.....	51
2.5.11.2	Dephosphorylierung von Vektoren	51
2.5.11.3	Polyadenylierung von DNA-Fragmenten	52
2.5.11.4	Ligation	52
2.5.12	Quantitative Echtzeit-PCR	52
2.5.13	RNA-Seq.....	53
2.6	Statistische Auswertung	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Expression von PTEN- Δ auf Proteinebene.....	55
3.2	Expression von PTEN- Δ in den transgenen Zellen.....	56
3.3	Bedeutung von PTEN- Δ für die Prozesse der Tumorprogression	61
3.3.1	Einfluss von PTEN- Δ auf die chemotaktische Migration	61
3.3.2	Einfluss von PTEN- Δ auf die Adhäsion an Komponenten der Extrazellular-Matrix.....	72
3.3.3	Einfluss von PTEN- Δ auf die Integrin-Expression	84
3.3.4	Einfluss von PTEN- Δ auf die Proliferation.....	101
3.3.5	Einfluss von PTEN- Δ auf die Zellviabilität	104
3.3.6	Einfluss von PTEN- Δ auf die Apoptose.....	108
3.3.7	Bedeutung nachgeschalteter Signalkaskaden	111
3.3.7.1	Screening der Aktivität von 45 Kinasen	111
3.3.7.2	Validierung relevanter Kinasen im Westernblot	115
3.3.8	Einfluss von PTEN- Δ auf das Transkriptom	130
3.4	Expression von PTEN- Δ im Tumorgewebe	138
3.4.1	Bedeutung von PTEN- Δ im Mammakarzinom.....	138
4	Diskussion	141
4.1	Der Tumorsuppressor PTEN	141
4.2	Beteiligung von PTEN- Δ an der Tumorprogression.....	148
4.3	PTEN- Δ - ein Tumorsuppressor wie PTEN?	154
4.4	Relevanz in anderen Tumorentitäten.....	159
4.5	Ausblick.....	160
5	Zusammenfassung.....	162
6	Abstract	163
7	Referenzen.....	164

8	Anhang.....	177
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	177
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	183
8.3	Tabellenverzeichnis.....	190
8.4	Werte zu den Abbildungen	191
8.5	Lebenslauf.....	231
8.6	Danksagung	235
	Eidesstattliche Erklärung	236

1 Einleitung

1.1 Tumorgenese

Der Prozess der Tumorgenese erfolgt in mehreren Schritten und ist dadurch geprägt, dass zelluläre, genetische und epigenetische Veränderungen zur Ausbildung einer malignen Tumormasse führen (Abbildung 1). In einer ersten Phase der Initiation kommt es in einer benignen Zelle zu einer inaktivierenden Mutation eines Tumorsuppressorgens oder eines Onkogens (Hanahan & Weinberg, 2000). Tumorsuppressoren sind in der Regel Transkriptionsfaktoren, welche an der Regulation von Zellzyklus und Zellteilung beteiligt sind. Sie werden durch zellulären Stress aktiviert und induzieren einen Zellarrest, um eine DNA-Reparatur zu gewährleisten. Die



bekanntesten sind p53 und die Phosphatase PTEN (Iurlaro *et al.*, 2014; Sherr, 2004). Die mutierten Zellen können verstärkt proliferieren und bilden zunächst Neoplasien aus. Während der folgenden Promotion findet eine Akkumulation an Mutationen statt. Diese finden nicht nur in Tumorsuppressorgenen sondern auch in DNA-Reparaturgenen und Proto-Onkogenen statt. Proto-Onkogene sind Modulatoren des Zellwachstums und der Differenzierung. Eine aktivierende Mutation in den Proto-Onkogenen führt zur Bildung von Onkogenen. Prominente Beispiele sind RAS, Wnt und die Kinase ERK (Croce, 2008; Todd & Wong, 1999). In der Phase der Progression induzieren die Mutationen der Tumorzellen eine Vergrößerung der Tumormasse und es kommt zur Entdifferenzierung des Tumors (Abbildung 1). Des Weiteren kommt es zur Veränderung der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Die dadurch

Abbildung 1: Schritte der Tumorentstehung. Während der Tumorgenese kommt es durch die Ansammlung von Mutationen in Tumorsuppressorgenen, DNA-Reparaturgenen und Proto-Onkogenen zur Ausbildung des Tumors.

gesteigerte Invasivität der Tumorzellen führt zu deren Dissemination in das angrenzende Blut- und Lymphsystem und zur Ausbildung von Metastasen in entfernten Organen (Hanahan & Weinberg, 2000; Yokota, 2000).

1.1.1 Kennzeichen von Tumoren

Um die molekularen Hintergründe der Tumorgenese und Tumorprogression besser zu verstehen, haben Hanahan *et al.* in die „*Hallmarks of Cancer*“ die Eigenschaften, welche einen Tumor kennzeichnen, zusammengefasst (Hanahan & Weinberg, 2011). Sie beschrieben die Tumoreigenschaften, welche alle Tumoren aufweisen, mit Hilfe von zehn Kennzeichen (Abbildung 2). Die Tumorzellen können demnach ihr Wachstum stimulieren (1), Wachstumsinhibitoren umgehen (2), Apoptose inhibieren (3), sich unendlich teilen (4), Angiogenese induzieren (5), in lokales Gewebe eindringen und in entfernte Organe streuen (6), den Metabolismus der Zelle regulieren (7), dem Immunsystem ausweichen (8), die Genom-Instabilität und Mutationen initiieren (9) und tumor-assoziierte Inflammation fördern (10). Die Erhaltung der Proliferation (Punkt 1 nach Hanahan *et al.*) ist eine wichtige Eigenschaft der Tumorzellen. Diese kann über verschiedene Wege erfolgen. Die Tumorzellen können durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren die Proliferation autokrin über eigene Rezeptoren triggern. Alternativ können auch über die Stimulierung von benignen Zellen des tumor-assoziierten Stromas Wachstumsfaktoren sezerniert und die Tumorzellen parakrin beeinflusst werden (Bhowmick *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2008). Des Weiteren sind die Rezeptoren in Tumorzellen oft dereguliert oder mutiert und reagieren dadurch auch Liganden-unabhängig oder hypersensitiv. Neben der Aufrechterhaltung der Proliferation müssen Tumorzellen die Fähigkeit besitzen Wachstumsinhibitoren zu umgehen (Punkt 2 nach Hanahan *et al.*). Dies sind in der Regel Tumorsuppressoren, welche in den Krebszellen inaktiviert sind. Prominente Beispiele sind die Phosphatase PTEN und p53. Beide Proteine sind Schlüsselregulatoren, welche zwischen Proliferation, Seneszenz und Apoptose in der Zelle entscheiden (Punkt 3 nach Hanahan *et al.*) (Burkhart & Sage, 2008). Die Fähigkeit der Tumorzellen sich unendlich teilen zu können (Punkt 4 nach Hanahan *et al.*) wird über die Aktivierung von Telomerasen vermittelt. Telomere sind repetitive DNA-Abschnitte am Ende der Chromosomen, welche sich bei der Zellteilung verkürzen und nur durch eine aktive Telomerase verlängert werden können (Blasco, 2005). Ab einer Tumorgröße von etwa 1 mm Durchmesser kann die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff nur

gewährleistet werden, wenn die Tumorzellen Angiogenese induzieren (Punkt 5 nach Hanahan *et al.*). Die Tumorzellen sezernieren angiogene Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welche an die Rezeptoren von vaskulären endothelialen Zellen binden (Baeriswyl & Christofori, 2009). Ein weiterer Schritt in der Progression von Tumoren ist die Metastasierung (Punkt 6 nach Hanahan *et al.*). Durch eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie den Cadherinen auf der Zelloberfläche kommt es zu einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) und die Tumorzellen erlangen eine gesteigerte Invasivität, wodurch die Streuung in entfernte Organe ermöglicht wird (Klymkowsky & Savagner, 2009). Des Weiteren spielt der Metabolismus in Tumoren eine große Rolle (Punkt 7 nach Hanahan *et al.*). Die Tumorzellen weisen einen abnormalen Metabolismus mit einer erhöhten Glykolyse und einer unvollständigen aeroben Atmung auf (Jones & Thompson, 2009). Das Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem (Punkt 8 nach Hanahan *et al.*) wurde in den letzten Jahren verstärkt erforscht und zeigt, dass die Tumorzellen die Immunzellen beeinflussen um von ihnen nicht angegriffen zu werden. Die Lymphozyten üben eine Art Selektionsdruck auf die Tumorzellen aus und können eine tumor-assoziierte Immunantwort hervorrufen (Odunsi & Old, 2007). Diese geht mit der tumor-assoziierten Inflammation (Punkt 10 nach Hanahan *et al.*), welche bei zahlreichen Tumorentitäten aufzufinden ist, einher. Die Immunzellen beeinflussen die Mikroumgebung des Tumors und triggern zelluläre Prozesse durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren (Grivennikov *et al.*, 2010). Der Erwerb der zuvor genannten Kennzeichen von Tumoren ist vor allem von der Veränderung des Genoms abhängig (Punkt 9 nach Hanahan *et al.*). Mutationen und epigenetische Modifikationen tragen zur Genominstabilität des Tumors bei. Tumorzellen weisen häufig chromosomale Translokationen, Inversionen oder Deletionen auf (Storchova & Pellman, 2004). Die zehn definierten Kennzeichen von Hanahan *et al.* zeigen die Komplexität einer Tumorerkrankung auf und, dass das Verständnis jeder einzelner Eigenschaft wichtig ist um die Gesamtheit erfassen und neue Therapieangriffspunkte aufzeigen zu können (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

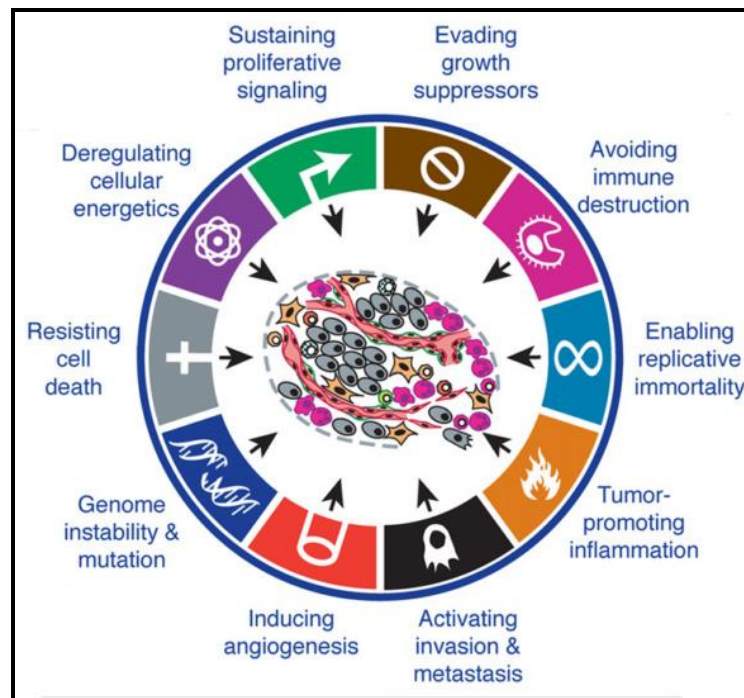


Abbildung 2: Kennzeichen von Tumoren. Die Abbildung zeigt die von Hanahan *et al.* definierten Kennzeichen, welche bei nahezu allen Tumoren auftreten. Nach (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Der Tumorsuppressor PTEN

Wie oben beschrieben, ist das Umgehen von wachstumsinhibitorischen Faktoren ein entscheidender Schritt in der Tumorgenese. Dies beinhaltet die Inaktivierung von Tumorsuppressoren, wie beispielsweise der Phosphatase PTEN. Bereits 1997 konnte durch Mutationsanalysen an verschiedenen Tumorentitäten wie der Prostata, dem Endometrium oder der Haut das Gen *PTEN/MMAC1/TEP1* für die Lipid- und Proteinphosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) als möglicher Tumorsuppressor identifiziert werden (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997). In darauffolgenden *Knockout*-Studien zeigte sich, dass der Verlust einer Kopie des *PTEN/MMAC1/TEP1*-Gens zur Ausbildung von Tumoren in verschiedenen Geweben führt (Di Cristofano *et al.*, 1998). Heutzutage ist die Bedeutung und Funktion des Tumorsuppressors PTEN sowohl für die zellulären Prozesse als auch dessen Dysregulation in Tumoren weitgehend erforscht, welche im folgenden Kapitel umfassend vorgestellt werden.

1.2.1 Struktur

Das *PTEN/MMAC1/TEP1*-Gen liegt auf Chromosom 10q23.3. Die 105365 Basenpaare (bp) umfassen neun codierende Exons. Aus der 5547 bp langen, prozessierten mRNA

(messenger RNA) wird das Protein aus 1212 bp translatiert. Die übrigen Basenpaare teilen sich in die 5'-UTR (*untranslated region*) (1032 bp) und die 3'-UTR (3303 bp) auf. PTEN ist eine dual-spezifische Phosphatase, welche sowohl Polypeptide als auch Phosphoinositide als Substrate umsetzen kann. Das 403 Aminosäuren-umfassende Protein besteht aus fünf funktionellen Domänen (Abbildung 3) und enthält das für Phosphatasen typische katalytische Motiv HCXXGXXR im aktiven Zentrum (Song *et al.*, 2012).

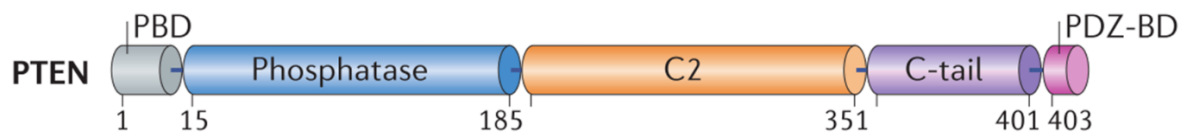


Abbildung 3: Struktur des Tumorsuppressors PTEN. Das 403 Aminosäuren-lange Protein setzt sich aus den 5 funktionellen Domänen, PBD, Phosphatase-, C2-, C-tail- und PDZ-bindende Domäne zusammen. Nach (Song *et al.*, 2012).

Die Phosphatase-Domäne weist hohe Homologien in der Sequenz mit den dual-spezifischen Proteinphosphatasen (DUSP) 2, 3 und 4 auf. PTEN dephosphoryliert Polypeptide an Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten sowie Phosphatgruppen an der D3-Position von Inositolringen (Myers *et al.*, 1997). Die Phosphatase-Domäne besteht aus einem zentralen fünf-strängigen β -Faltblatt, welches auf der einen Seite von zwei α -Helices und auf der anderen Seite von vier α -Helices flankiert wird. Das katalytische Motiv bildet einen sogenannten P Loop, welcher die Phosphate binden kann (Abbildung 4). Dieser Bereich von PTEN ist evolutionär hoch konserviert und häufig bei malignen Erkrankungen mutiert, was eine reduzierte Aktivität von PTEN zur Folge hat (Steck *et al.*, 1997). Die C2-Domäne schließt sich C-terminal an die Phosphatase-Domäne an und umfasst knapp 170 Aminosäuren. Sie setzt sich strukturell aus einem β -Sandwich zusammen (Abbildung 4), welches große Übereinstimmungen mit den C2-Domänen der Proteinkinase C (PKC) und der Phospholipase C1 (PLC1) aufweist (Lee *et al.*, 1999). Die C2-Domäne von PTEN kann an Phospholipide der Membran binden und die Zellmigration beeinflussen (Raftopoulou *et al.*, 2004). Des Weiteren befinden sich N-terminal eine kurze PtdIns(4,5)P₂-(Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat)-bindende Domäne (PBD) und C-terminal die C-tail-Domäne, welche PEST (Pro, Glu, Ser, Thr) Sequenzen aufweist, und die PDZ-bindende Domäne, welche an Protein-Interaktionen beteiligt ist (Song *et al.*, 2012).

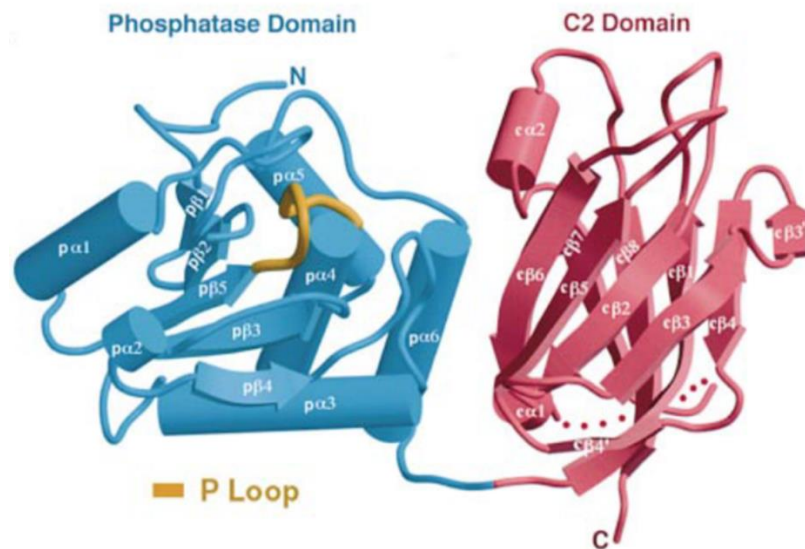


Abbildung 4: Struktur der Phosphatase PTEN. Dargestellt sind die Phosphatase-Domäne in blau mit ihrem P Loop und die C2-Domäne in rot. Nach (Lee *et al.*, 1999).

1.2.2 Funktion

Die dualspezifische Phosphatase PTEN kann sowohl Lipidsubstrate als auch Peptide dephosphorylieren. Als Tumorsuppressor übt PTEN hauptsächlich eine reduzierende Wirkung auf zelluläre Prozesse wie Migration, Proliferation und Vitalität aus (Chalhoub & Baker, 2009). Im Folgenden wird zunächst auf die Lipidphosphatase-Aktivität von PTEN und im Anschluss auf die Proteinphosphatase-Aktivität eingegangen.

Lipidphosphatase

Die Hauptfunktion von PTEN ist eng mit seiner Lipidphosphatase-Aktivität verbunden. PTEN fungiert als Gegenspieler zu den Klasse IA Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) indem es $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) zu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ an der D3-Position des Inositolrings dephosphoryliert. PI3K sind intrazelluläre Lipid-Kinasen, welche anhand ihrer Struktur und Substratspezifität in drei Klassen eingeteilt werden können. Sie regulieren Prozesse wie Überleben, Metabolismus, Migration, Proliferation, Wachstum und Apoptose. Die Klasse IA PI3K haben als Hauptsubstrat die einfach phosphorylierten $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und generieren durch Phosphorylierung an der 3'-Hydroxylgruppe des Inositolrings den *second messenger* $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ (Engelman *et al.*, 2006). Dieser aktiviert *downstream* vor allem die AKT-Signalkaskade. Die Aktivierung der Klasse IA PI3K erfolgt über membranständige Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK). Diese werden wiederum durch

Bindung von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie Insulin, *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF) oder *Fibroblast Growth Factor* (FGF) aktiviert (Abbildung 5) (Chalhoub & Baker, 2009).

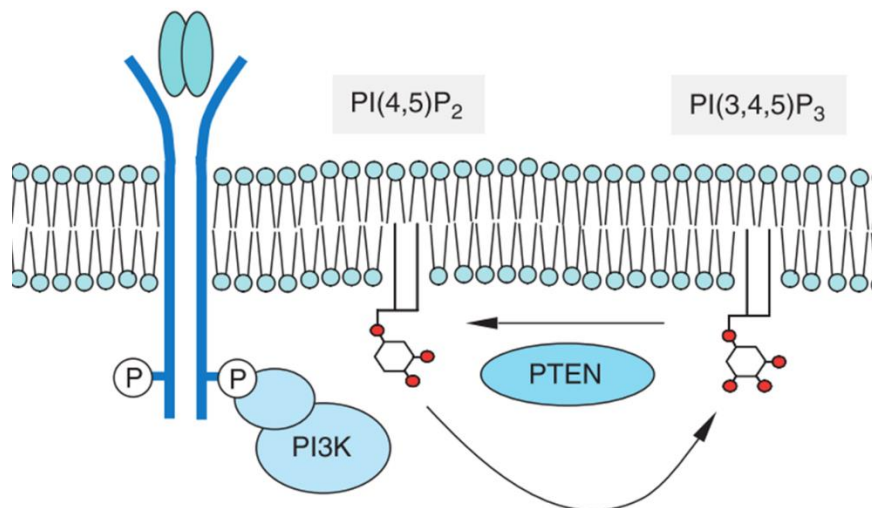


Abbildung 5: Lipidphosphatase-Funktion von PTEN. Nach Aktivierung der PI3K über RTK kann diese PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃ phosphorylieren. PTEN hydrolysiert den *second messenger* als Gegenspieler der PI3K. Nach (Leslie *et al.*, 2008).

AKT-Signalkaskade

In der AKT-Signalkaskade kommt es über die Aktivierung von RTK und PI3K zur Bildung des *second messengers* PtdIns(3,4,5)P₃. PtdIns(3,4,5)P₃ kann an die *pleckstrin homology* (PH)-Domänen von Proteinen binden und diese an die Membran rekrutieren. Durch Rekrutierung der Proteinkinase AKT, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, kommt es zu deren Aktivierung (Engelman *et al.*, 2006). Sie wird zum einen von der *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) an Thr308 (Mora *et al.*, 2004) und zum anderen von dem *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) an Ser473 phosphoryliert (Sarbasov *et al.*, 2005). Die aktivierte Proteinkinase AKT wirkt *downstream* auf verschiedene Moleküle und induziert zelluläre Prozesse wie Migration, Proliferation, Metabolismus sowie eine Hemmung der Apoptose (Abbildung 6). Der Transkriptionsfaktor FOXO (*forkhead box O*) und der Tumorsuppressor TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) sind zwei wesentliche Substrate von AKT. Durch Phosphorylierung von FOXO wird eine Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern verhindert, wodurch es zu einer reduzierten Aktivierung von Zellzyklusregulatorischen Genen wie *p27Kip1* und von proapoptotischen Genen wie *FasL* und *Bim* kommt. TSC2 formt zusammen mit TSC1 einen Proteinkomplex, welcher

inhibierend auf das kleine G-Protein Rheb (*RAS homolog enriched in brain*) wirkt. Durch Phosphorylierung von TSC2 via AKT kommt es zur Aufhebung der Hemmung und somit zur Aktivierung von mTORC1 über Rheb. mTORC1 triggert Wachstumsprozesse sowie den Zellzyklus und hemmt Autophagie (Wullschleger *et al.*, 2006). Ein weiteres Protein, welches an der Regulation der Apoptose beteiligt ist, ist das Protein BAD (*Bcl-2-associated death promotor*). Eine AKT-abhängige Phosphorylierung von BAD induziert die Freisetzung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Manning & Cantley, 2007). Des Weiteren wirkt AKT inhibierend auf die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) und moduliert somit den Glukose-Metabolismus (Cohen & Frame, 2001). Dagegen wirkt eine Phosphorylierung via AKT auf die Zielproteine MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*), welches die Degradierung des Tumorsuppressors p53 induziert, und NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), welcher die Apoptose hemmt, aktivierend (Abbildung 6) (Chalhoub & Baker, 2009; Vivanco & Sawyers, 2002).

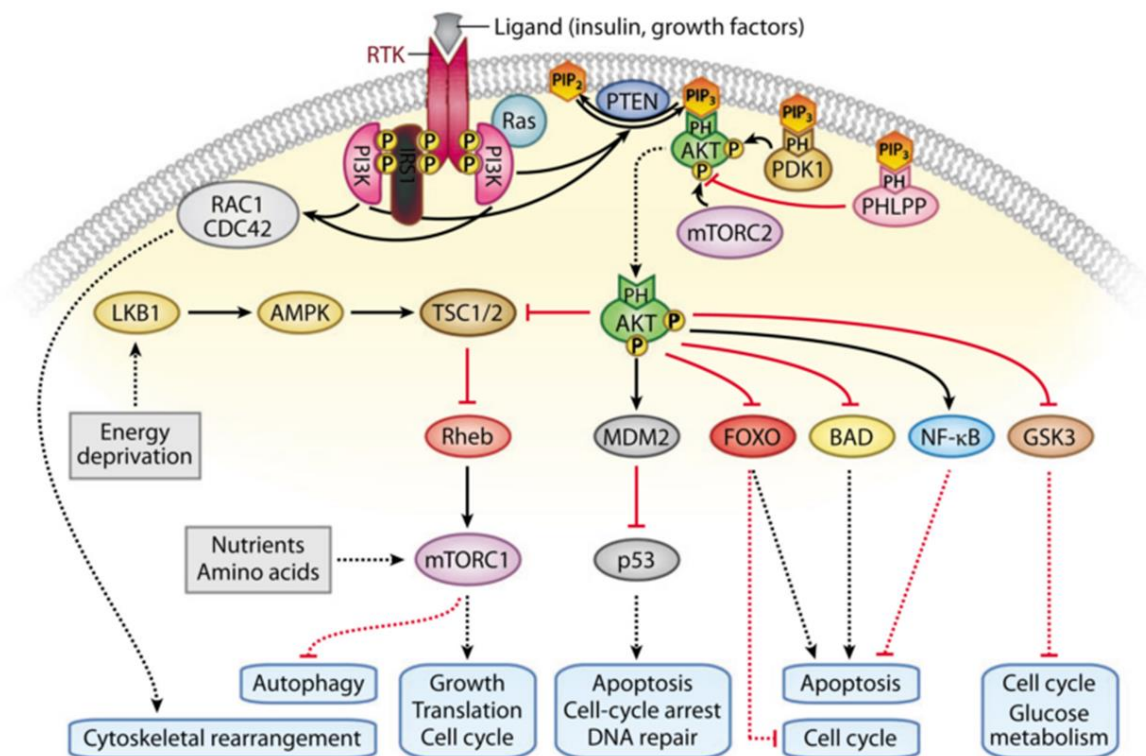


Abbildung 6: Die AKT-Signalkaskade. Aktivierte RTK induzieren die Phosphorylierung von PI3K, welche wiederum PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃ phosphoryliert. PTEN fungiert als Antagonist von PI3K. PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃) rekrutiert die Proteinkinase AKT über PH-Domänen. AKT wird von PDK1 und mTORC2 phosphoryliert und wirkt im Anschluss auf die dargestellten *downstream* Targets. In rot sind inhibitorische Effekte von AKT, in schwarz aktivierende Effekte von AKT dargestellt. Nach (Chalhoub & Baker, 2009).

Proteinphosphatase

Die dualspezifische Phosphatase PTEN kann neben Lipiden auch Peptide dephosphorylieren. Jedoch scheint die Proteinphosphatase-Aktivität eine weitaus geringere Rolle im Vergleich zu der Lipidphosphatase-Aktivität zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass PTEN die Signalmoleküle FAK (*focal adhesion kinase*), CREB (*cAMP responsive-element-binding protein*) und SHC (*SRC homology 2 domain containing*) dephosphorylieren kann und somit auf deren Signalweiterleitung Einfluss nimmt (Gu *et al.*, 2011; Tamura *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2011). Eine Dephosphorylierung von CREB induziert die verstärkte Expression seiner Zielgene und steigert dadurch die Proliferation (Gu *et al.*, 2011). FAK und SHC sind beide an der Integrin-Signalweiterleitung beteiligt, in der es über die Bindung der Extrazellulär-Matrix (EZM) an den Integrin-Rezeptor zur Aktivierung von FAK und SHC und infolgedessen zur verstärkten MAPK-(*Mitogen-activated protein kinase*)-Signalkaskade kommt. Des Weiteren können FAK und SHC auch über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert werden (Sieg *et al.*, 2000). Die hierdurch induzierten zellulären Prozesse wie Adhäsion, Migration und Proliferation werden somit von PTEN durch die Proteinphosphatase-Aktivität gehemmt (Schneider *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012).

1.2.3 Regulation

Transkriptionelle Regulation

Die Regulation der PTEN-Expression erfolgt auf Transkriptionsebene vor allem durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche den Promotor positiv oder negativ beeinflussen. Zu den positiven Transkriptionsfaktoren zählen EGR-1 (*early growth response protein 1*), PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) und p53. Diese können den Promotor durch direkte Bindung regulieren (Patel *et al.*, 2001; Stambolic *et al.*, 2001; Virolle *et al.*, 2001). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass SPRY 2 (*sprouty homolog 2*) die PTEN-Expression beeinflusst (Edwin *et al.*, 2006). Einen negativen Effekt auf die PTEN-Transkription haben der via des ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*)-Signalwegs aktivierte Transkriptionsfaktor c-Jun (Hettinger *et al.*, 2007), sowie NF- κ B über den Ko-Aktivator CBP/p300 (Vasudevan *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren MKK4 (*mitogen-activated protein kinase kinase-4*), TGF- β (*transforming growth factor β*) und PcG (*polycomb group*) protein BMI1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) negative Regulatoren des Promotors sind (Gericke *et al.*, 2006; Song *et al.*,

2009). Der NOTCH-Signalweg kann sowohl positiv als auch negativ auf die PTEN-Expression wirken. Bei einer positiven Regulation hemmt NOTCH den Transkriptionsfaktor CBF-1 (*centromere-binding protein 1*) (Chappell *et al.*, 2005; Whelan *et al.*, 2007), wobei es bei einer negativen Regulation zur Aktivierung des Faktors HES1 (*hairy and enhancer of split1*) kommt (Palomero *et al.*, 2007). Auf epigenetischer Ebene kann die Expression von PTEN ebenfalls reguliert werden. Hier kommt es vor allem zu Hypermethylierungen und Histonmodifikationen im Promotor-Bereich von PTEN, welche die Expression negativ beeinflussen. In verschiedenen Tumorentitäten wie Magenkrebs, Brustkrebs oder Melanomen konnte bereits das Vorhandensein von hypermethylierten CpG-Inseln nachgewiesen werden (Garcia *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2002; Mirmohammadsadegh *et al.*, 2006).

Post-transkriptionelle Regulation

Eine post-transkriptionelle Regulation von PTEN erfolgt über miRNAs (mikro RNA). Dies sind kurze nicht-codierende Nukleotid-Sequenzen, welche durch Bindung an mRNA-Sequenzen zu deren Degradierung oder Repression der Translation führen können (Bartel; Bartel & Chen, 2004; van den Berg *et al.*, 2008). Die Translation der PTEN-mRNA wird von verschiedenen miRNAs reguliert. Es konnte bereits eine Beteiligung der miRNAs miR-21 (Meng *et al.*, 2007), miR-22 (Poliseno, Salmena, Riccardi, *et al.*, 2010), miR-214 (Jindra *et al.*, 2010; Penna *et al.*, 2015), miR-221 (Xie *et al.*, 2014), miR-29b (Wang *et al.*, 2011) und miR-301 (Shi *et al.*, 2011) gezeigt werden. Einen besonderen Einfluss haben bei der Regulation der Expression via miRNAs auch RNA-RNA-Interaktionen. 1998 wurde eine weitere Besonderheit für das *PTEN/MMAC1/TEP1*-Gen entdeckt. Dahia *et al.* konnten zeigen, dass auf dem Chromosomenlokus 9p21 das Pseudogen *PTENP1* liegt (Dahia *et al.*, 1998). Das Pseudogen weist 98 % Übereinstimmung in der codierenden Region mit dem Ursprungsgen auf Chromosom 10q23.3 auf. Die transkribierte *long non-coding* RNA (lncRNA) von *PTENP1* nimmt Einfluss auf die Expression von PTEN. Die lncRNA fungiert als eine Art miRNA-Schwamm, welcher durch Abfangen von PTEN-spezifischen miRNAs die Stabilität der mRNA von PTEN erhöht, wodurch es zu einer verstärkten Expression von PTEN kommt (Johnsson *et al.*, 2013; Poliseno, Salmena, Zhang, *et al.*, 2010). In diversen Tumorentitäten, wie dem Nierenzellkarzinom, Leberzellkarzinom und Magenkrebs, konnte gezeigt werden, dass die Expression des Pseudogens *PTENP1* mit der Expression von PTEN korreliert (Chen *et al.*, 2015; Guo

et al., 2016). Im klarzelligen Nierenzellkarzinom wurde gezeigt, dass die miRNA miR-21 über *PTENP1* an der Regulation der PTEN-Expression beteiligt ist (Yu *et al.*, 2014). Die RNA-Transkripte konkurrieren somit mit den mRNAs um denselben Pool an miRNAs. Diese RNA-Transkripte werden auch als *competing endogenous RNAs* (ceRNA) bezeichnet (Cheng *et al.*, 2015; Salmena *et al.*, 2011). Weitere ceRNAs, welche einen Einfluss auf die PTEN-Expression haben, sind die protein-codierenden Gen-Transkripte von *VAPA* (*vesicle-associated membran protein-associated protein A*), *CNOT6L* (*CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like*) und *ZEB2* (Guil & Esteller, 2015; Karreth *et al.*, 2011; Tay *et al.*, 2011).

Post-translationale Modifikation

Das PTEN-Protein kann durch verschiedene Modifizierungen der Aminosäuren in allen Domänen bezüglich der Stabilität, Aktivität, Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Proteinen und Lokalisation beeinflusst werden.

Phosphorylierung. Die Phosphorylierungen können sowohl im *C-tail*-Bereich als auch in der C2-Domäne stattfinden. Im *C-tail*-Bereich werden die Aminosäuren Ser362 und Thr366 von der GSK3 β phosphoryliert (Al-Khoury *et al.*, 2005; Maccario *et al.*, 2007). Dagegen kann die PIK3 (*polo-like kinase 3*) Ser370 und Thr366 phosphorylieren (Xu *et al.*, 2010). Des Weiteren befindet sich in diesem Bereich ein Cluster bestehend aus Ser380, Thr382, Thr383 und Ser385, welches von CK2 (*casein kinase 2*) und S6K phosphoryliert wird (Torres & Pulido, 2001; Vazquez *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2014). Die Phosphorylierungen nehmen Einfluss auf die Stabilität und dadurch bedingt auf die Lokalisation und Aktivität von PTEN. Bei phosphorylierten *C-tail* kommt es zu einer Konformationsänderung in eine kompaktere Form, indem der *C-tail* mit Teilen der C2-Domäne wechselwirkt. Als Folge ist das Protein weniger aktiv und vermehrt im Zytoplasma aufzufinden (Das *et al.*, 2003; Rahdar *et al.*, 2009; Vazquez *et al.*, 2006). Die erhöhte Stabilität ist dadurch bedingt, dass eine Ubiquitinierung durch die E3-Ligase erschwert ist (Tolkacheva *et al.*, 2001; Torres & Pulido, 2001). Eine Phosphorylierung im Bereich der C2-Domäne kann an den Aminosäuren Tyr336 via RAK und an Ser229, Thr232, Thr319 und Thr321 via ROCK (*RhoA-associated kinase*) induziert werden. Während RAK die PTEN-Degradation hemmt, führt eine Phosphorylierung durch ROCK zu einer verstärkten Chemotaxis (Li *et al.*, 2005; Yim *et al.*, 2009).

Oxidation. Die Oxidation von PTEN mit H₂O₂ führt zur Bildung einer Disulfid-Brücke zwischen den Aminosäuren Cys124 und Cys71, wobei erstere im aktiven Zentrum des Proteins liegt. Dies führt zur Inaktivierung von PTEN (Cho *et al.*, 2004). Die Oxidation kann sowohl von endogenen ROS als auch von exogenem H₂O₂ induziert werden (Leslie *et al.*, 2003). Durch Reduktion des oxidierten PTEN mit Hilfe von Thioredoxinen kann die Aktivität des Proteins wiederhergestellt werden (Lee *et al.*, 2002).

Acylierung. Im PTEN-Protein wurden bisher zwei Acylierungsstellen identifiziert. Eine befindet sich in der Phosphatase-Domäne (Lys125-128) und reduziert die Aktivität der Phosphatase (Okumura *et al.*, 2006). Eine weitere befindet sich in der PDZ-Domäne (Lys402) und moduliert die Protein-Interaktionen von PTEN (Ding *et al.*, 2014).

Ubiquitinierung/SUMOylierung. Die Ubiquitinierung markiert Proteine als Substrate für den Abbau via des 26S Proteasoms. Zusätzlich kann durch die Ubiquitinierung auch die Protein-Lokalisation beeinflusst werden (Abbildung 7). Bei PTEN kommt es sowohl zu Mono- als auch zu Polyubiquitinierungen (Tolkacheva *et al.*, 2001; Torres & Pulido, 2001). Während Monoubiquitinierungen an Lys13, Tyr155 und Lys289 die Translokation von PTEN in den Kern regulieren (Trotman *et al.*, 2007), induzieren Polyubiquitinierungen dessen Degradation. Außerdem kommt es durch die Ubiquitinierungen zur Einschränkung der Aktivität von PTEN (Maccario *et al.*, 2007). Die Reaktion wird von verschiedenen E3-Ubiquitin-Ligasen katalysiert. Es konnte eine Beteiligung der NEDD4-(*Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4*)-Ligase gezeigt werden (Amodio *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007), jedoch auch der E3-Ligasen XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) (Van Themsche *et al.*, 2009), WWP2 (*WW domain-containing protein 2*) (Maddika *et al.*, 2011), RFP (Lee *et al.*, 2013) und CHIP (*chaperone-associated E3 ligase and C terminus of Hsc70-interacting protein*) (Ahmed *et al.*, 2012). Neben der Ubiquitinierung kann PTEN auch durch kleine Ubiquitin-ähnliche Proteine an den Lysin-Resten SUMOyliert (SUMO: *Small Ubiquitin-related MOdifier*) werden. Eine SUMOylierung an Lys254, Lys266 und Lys289, welche sich alle in der C2-Domäne befinden, induziert eine verstärkte Interaktion mit der Membran und erhöht die Stabilität von PTEN (Gonzalez-Santamaria *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012).

1.2.4 Lokalisation

PTEN kann sowohl im Zytosol und an der Plasmamembran als auch im Kern lokalisiert sein (Abbildung 7). Zudem kann PTEN ebenfalls extrazellulär und in zytoplasmatischen Organellen vorgefunden werden (Chalhoub & Baker, 2009). Die Assoziierung von PTEN mit der Plasmamembran wird durch mehrere Faktoren reguliert. Die Phosphatase kann zum einen mit Proteinen, welche eine PDZ-bindende Domäne aufweisen, und zum anderen mit Proteinen, welche ein PtdIns(4,5)P₂-Bindemotiv aufweisen, interagieren. Hierzu gehören die Membranproteine MAGI, PAR-3, MAST, SAST und NEP (Bonifant *et al.*, 2007; Tamguney & Stokoe, 2007; Wu *et al.*, 2000). Des Weiteren wird die Lokalisation an der Plasmamembran durch Phosphorylierung am C-*tail* inhibiert (Bolduc *et al.*, 2013) und durch SUMOylierung getriggert (Huang *et al.*, 2012). Die Translokation von PTEN in den Kern erfolgt nicht nur via Monoubiquitinierungen und SUMOylierungen (Bassi *et al.*, 2013; Trotman *et al.*, 2007). Ein Transport kann auch passiv via Diffusion (Liu *et al.*, 2005) oder über eine in PTEN-enthaltene Kernlokalisations-Sequenz erfolgen (Gil *et al.*, 2006). Im Kern übt PTEN ebenfalls eine tumorsuppressive Rolle aus, indem es die Stabilität des Genoms und die Regulation des Zellzyklus beeinflusst (Shen *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PTEN auch in dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Mitochondrien-assoziierten Membran (MAM) lokalisiert und an der Calcium-abhängigen Apoptose beteiligt ist (Bononi *et al.*, 2013; Bononi & Pinton, 2015).

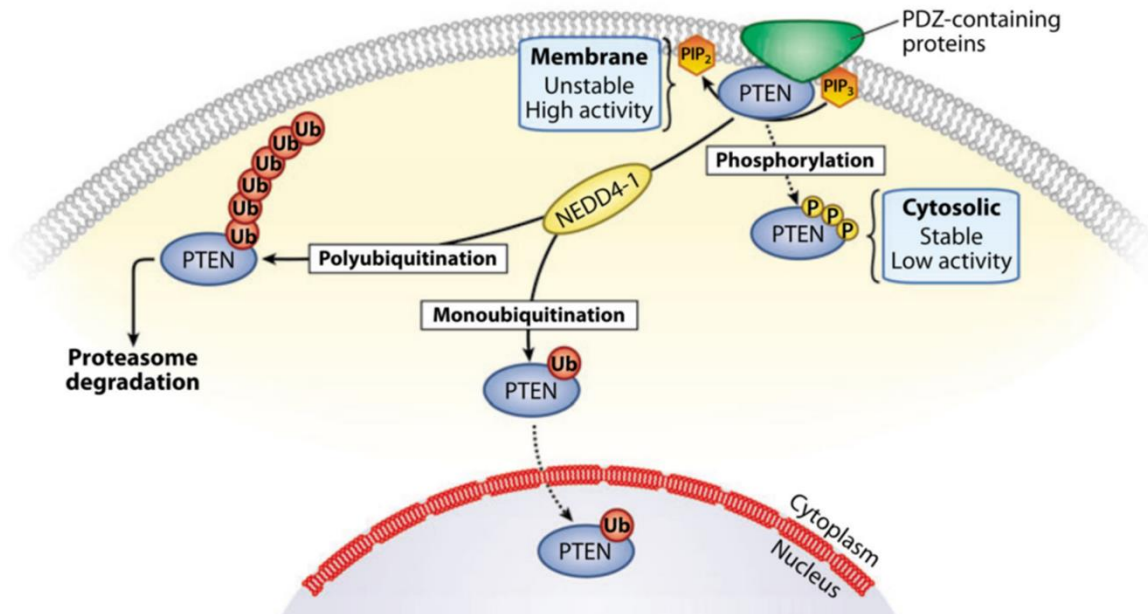


Abbildung 7: Regulation der Lokalisation von PTEN. Nach (Chalhoub & Baker, 2009).

Eine N-terminal verlängerte Isoform von PTEN, welche 173 Aminosäuren länger ist und PTEN-L (PTEN *long*) genannt wird, wurde ebenfalls in Mitochondrien entdeckt (Liang *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass PTEN-L sezerniert und von anderen Zellen aufgenommen werden kann, wodurch es zur Beeinflussung der intrazellulären AKT-Signalkaskade dieser Zellen kommt (Hopkins *et al.*, 2013; Putz *et al.*, 2015).

1.2.5 Protein-Protein-Interaktionen

Die Interaktion von PTEN mit anderen Proteinen ermöglicht der Phosphatase erst die vielfältigen Funktionen, die sie ausübt. Neben den bereits erläuterten zur Lokalisation beitragenden Interaktionen mit Membranproteinen, welche an die PDZ-BD von PTEN binden und den Kinasen, welche durch Modifizierung PTEN beeinflussen, gibt es noch weitere Proteine, welche mit PTEN interagieren. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) S1PR (*sphingosine 1-phosphate receptor*) und MC1R (*melanocortin-1 receptor*) sowie der nukleare Androgen-Rezeptor (AR) können mit PTEN assoziieren (Cao *et al.*, 2013). Bei der Interaktion von PTEN mit S1PR kommt es zur Regulation der Zellmigration, während eine Interaktion mit AR zur Degradation des AR führt (Lin *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2005). Durch Interaktion von PTEN mit Myosin kommt es zur Regulation der GSK2-/GSK3-Kinasen, welche einen Einfluss auf das Zytoskelett

haben (van Diepen *et al.*, 2009). Des Weiteren interagiert PTEN mit Transkriptionsfaktoren. Durch Interaktion mit MTF-1 (*metal-responsive transcription factor 1*) mit der C2-Domäne wird dessen Aktivität gesteigert (Lin *et al.*, 2012). Eine Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 erhöht dessen Stabilität und reguliert die Expression von p53 (Freeman *et al.*, 2003). Außerdem hemmt PTEN durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor SMAD3 die tumorprogressiven Wirkungen von TGF- β (Hjelmeland *et al.*, 2005).

1.3 Splice-Varianten von PTEN

Während der Transkription von PTEN kommt es neben der Bildung von PTEN-Proteinen auch zur Ausbildung alternativer Splice-Varianten. Derzeit sind zehn alternative Splice-Varianten bekannt (Abbildung 8). Die ersten zwei wurden 2000 von Sharrard *et al.* identifiziert und als PTEN-B und PTEN- Δ bezeichnet (Sharrard & Maitland, 2000). PTEN- Δ wird durch Inklusion des 5'-Endes von Intron H nach Exon 8 generiert, wodurch eine gekürzte codierende Sequenz entsteht. Die 61 Aminosäuren von Exon 9 werden durch die zwei Aminosäuren VS (Valin und Serin) aus Intron H am C-Terminus des Proteins ersetzt. Bei PTEN-B kommt es aufgrund des alternativen Splicens zur Integration des Introns E, wodurch bereits nach fünf Aminosäuren ein Abbruch des offenen Leserahmens induziert wird (Sharrard & Maitland, 2000). Agrawal *et al.* zeigten ein paar Jahre später, dass neben PTEN-B noch weitere Splice-Varianten (SV) durch Inklusion des Introns E und anschließenden Abbrüchen des offenen Leserahmens nach Exon 5 in verschiedenen humanen Geweben identifiziert werden konnten (Agrawal & Eng, 2006). Diese bezeichneten sie als SV-5a, SV-5b und SV-5c. Des Weiteren konnten noch drei Splice-Varianten, SV-3a, SV-3b und SV-3c, durch Einbeziehung des Introns C gefunden werden. Hier kommt es durch Stopp-Codons im Intron-Bereich bereits kurz nach dem Exon 3 zum Abbruch des offenen Leserahmens. Neben der Inklusion von Intron-Sequenzen wurden ebenfalls zwei Splice-Varianten entdeckt, welche Deletionen des Exons 5 bzw. Exons 6 aufweisen. Diese wurden als SV-DelE5 bzw. SV-DelE6 bezeichnet (Abbildung 8) (Agrawal & Eng, 2006).

Eine Beteiligung der Splice-Varianten an der Tumorprogression wurde bisher noch nicht untersucht. Agrawal *et al.* zeigten lediglich in einer kleinen Kohorte von 12 Patientinnen mit Brustkrebs, dass die Varianten SV-5c, SV-3b, SV-3c und SV-DelE6

im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe eine reduzierte Expression aufwiesen. Dagegen war SV-5b im Tumorgewebe verstärkt exprimiert (Agrawal & Eng, 2006).

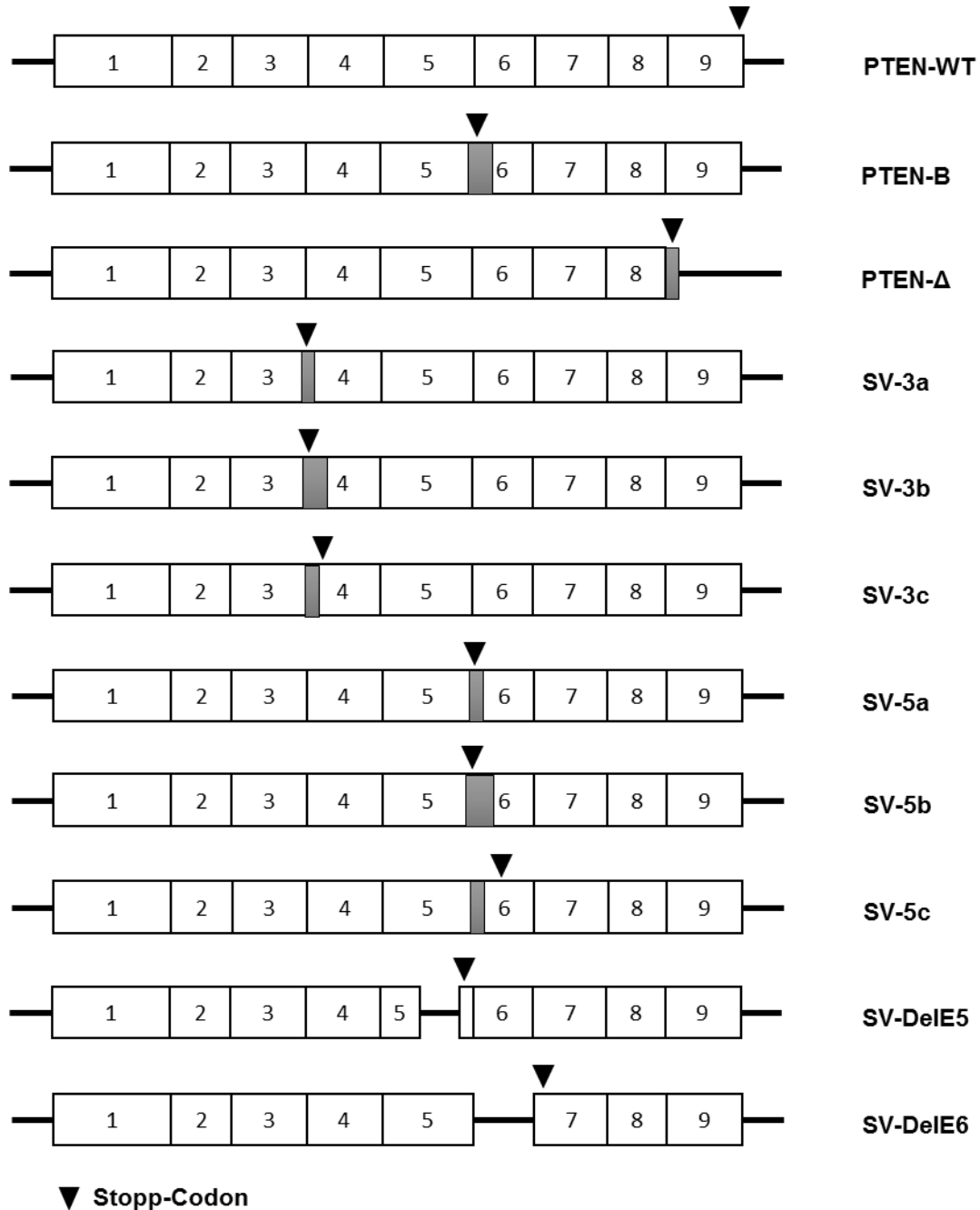


Abbildung 8: Die Splice-Varianten (SV) von PTEN. Schematische Darstellung der Zusammensetzung der SV. Nicht-ausgefüllte Boxen stellen die Exons 1-9 dar, eingefügte Introns sind grau hinterlegte Boxen. Die Pfeile zeigen jeweils den Abbruch der Translation durch ein Stopp-Codon an.

1.4 Alternatives Splicen

Unter Splicen versteht man einen zellulären Prozess, welcher während der Transkription stattfindet. Es kommt zur Prozessierung einer *precursor* (pre)-mRNA in einem Spliceosom-Komplex. Dieser RNA-Protein-Komplex besteht aus fünf *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP). Die pre-mRNA besteht aus alternierenden Exon- und Intron-Sequenzen, wobei die Introns spezifische Konsensussequenzen aufweisen. Während des Splicens werden die Intron-Sequenzen aus der pre-mRNA herausgeschnitten und die Exons miteinander verknüpft. Jedes Intron hat eine GU-Sequenz am 5'-Ende und nahe des 3'-Endes befindet sich eine *branch site* mit der Sequenz yUnAy gefolgt von einem Polypyrimidin-reichen Abschnitt und einer AG-Sequenz am 3'-Ende (Abbildung 9). Das Spliceosom bindet zunächst an das 5'-GU und an das *branch point* A. Anschließend kommt es durch Konformationsänderungen und zwei Umesterungen zur Abspaltung des Introns am 5'-Ende und dessen Bindung an das *branch point* A. Die Abspaltung des Introns am 3'-Ende und die Verknüpfung der zwei Exons vollendet den Vorgang. Das herausgeschnittene Intron wird im Anschluss degradiert (Black, 2003; Matlin *et al.*, 2005).

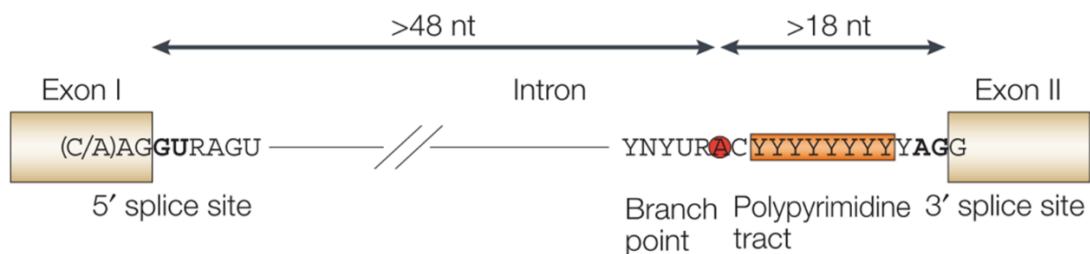


Abbildung 9: Konsensussequenzen des Introns. Nach (Matlin *et al.*, 2005)

Durch Variation der Exon-Komposition können beim alternativen Splicen verschiedene mRNAs und somit Proteine translatiert werden. Dieser Prozess ermöglicht die Generierung von einer Proteinviefalt aus nur einem Gen (Barash *et al.*, 2010). Die Regulation erfolgt hierbei über *trans-acting* Proteine, welche als Repressor oder Aktivator fungieren können, und über korrespondierende *cis-acting* Elemente auf der pre-mRNA, welche als *enhancer* oder *silencer* agieren. Die Repressor-Proteine binden an die *silencer* RNA-Sequenz und verringern somit die Wahrscheinlichkeit eines Splice-Vorgangs in diesem Bereich. Die Mehrheit aller Repressoren sind hierbei heterogene nukleäre RNPs (hnRNP). Analog können Aktivator-Proteine an die *enhancer* Elemente binden und den Splice-Vorgang triggern. Die meisten Aktivatoren

sind SR-Proteine, welche ein RNA-Erkennungsmotiv und Arginin- und Serin-reiche Domänen aufweisen (Matlin *et al.*, 2005). Je nach Lokalisation werden die *silencer* als *intronic splicing silencer* (ISS) oder *exonic splicing silencer* (ESS) und die *enhancer* als *intronic splicing enhancer* (ISE) oder *exonic splicing enhancer* (ESE) bezeichnet (Abbildung 10) (Caceres & Kornblihtt, 2002; Wang & Burge, 2008).

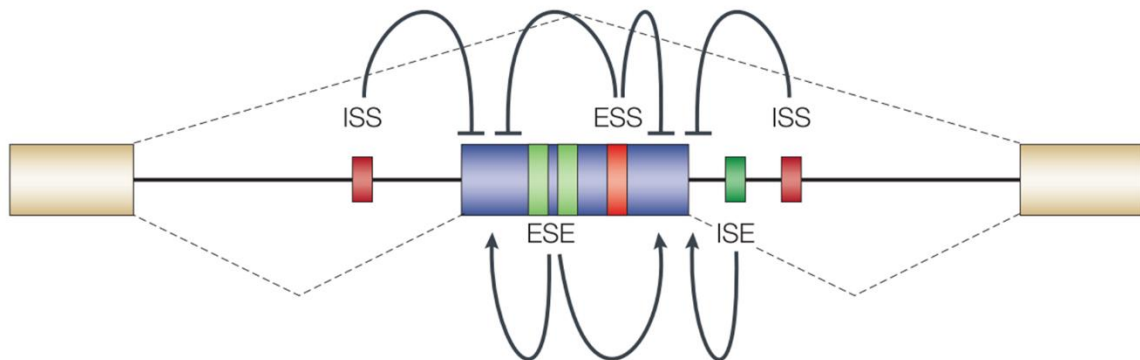


Abbildung 10: Einfluss von regulatorischen *cis-acting* und *trans-acting* Elementen auf das alternative Splicing. Nach (Matlin *et al.*, 2005)

1.5 Zielsetzung

Der Tumorsuppressor PTEN spielt in vielen verschiedenen Tumorentitäten wie dem Nierenzellkarzinom, dem Magenkrebs, dem Kolonkarzinom oder dem Melanom eine prominente Rolle. Eine reduzierte Aktivität der dualspezifischen Phosphatase aufgrund von Mutationen, epigenetischen Veränderungen oder Regulationen auf (post-)transkriptioneller sowie post-translationaler Ebene führen zu verstärkten zellulären Prozessen wie Migration, Proliferation, Wachstum und eine reduzierte Apoptose. Während die Funktion von PTEN in Tumoren weitgehend gut erforscht ist, ist die Bedeutung der bereits identifizierten zehn Splice-Varianten bisher noch unklar.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse der Splice-Variante PTEN- Δ in Bezug auf die Tumorprogression des Nierenzellkarzinoms sowie exemplarisch für eine weitere Tumorentität seine Relevanz im Brustkrebs. Anlass dieser Fragestellung war die Identifikation einer PTEN-Variante, die im Nierenzellkarzinom deutlich reduziert exprimiert ist und deren Molekulargewicht dem von PTEN- Δ entspricht. Es sollte zunächst unter Verwendung eines geeigneten Protein-Tags verifiziert werden, ob PTEN- Δ auf Proteinebene exprimiert wird. In weiteren funktionellen Analysen sollte der Einfluss von PTEN- Δ im Vergleich zu PTEN auf das Verhalten in den zellulären

Prozessen Migration, Proliferation, Adhäsion, Vitalität und Apoptose untersucht werden. Außerdem sollte die Expression einzelner Integrin-Untereinheiten in Abhängigkeit der PTEN- Δ -Expression analysiert werden. Um die molekularen Hintergründe tiefer aufklären zu können, sollte durch einen Phospho-Kinase Array mit anschließender Verifizierung im Westernblot der Einfluss von PTEN- Δ auf die Aktivität intrazellulärer Signalwege analysiert werden. Um die Fragestellung zu vertiefen, sollte eine Analyse des gesamten Transkriptoms in einer RNA-Sequenzierung einen Gesamtüberblick über die beteiligten Gene aufzeigen. Die Verifizierung prominenter Gene sollte mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR erfolgen.

Die Analyse der Bedeutung der Splice-Varianten von PTEN für die Tumorprogression könnte neue Erkenntnisse bezüglich des Tumorsuppressors liefern. Ziel ist es die molekularen Zusammenhänge der Entstehung und Progression des NZK aufzudecken und darüber langfristig neue Targets für die Entwicklung von Therapeutika aufzuzeigen. Da die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms immer noch eine große Herausforderung darstellt, sind neue Ansätze immens wichtig, um den Patienten in Zukunft eine möglichst optimale Therapie anbieten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen

Acrylamide Rotiphorese Gel 30 (Carl Roth, Karlsruhe), APS p.a. (Carl Roth, Karlsruhe), Aceton p.a. (AppliChem, Darmstadt), Agarose (Amersham Biosciences, Freiburg), Albumin *from bovine serum* (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Ampicillin Injektionslösung (Ratiopharm, Ulm), Bacto-Agar (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA), Bacto-Tryptone (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA), Bacto-Yeast Extract (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA), *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, USA), β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Bromphenolblau *Sodium Salt* (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Calciumchlorid Dihydrat (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), *Collagen human type I* (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), *Collagen type IV* (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), D+-Glukose (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), dH₂O (B. Braun, Melsungen), Dimethylformamid (Carl Roth, Karlsruhe), DPBS (Gibco, Carlsbad, USA), DNA Ladder 100 bp / 1 kb (Invitrogen, Karlsruhe), dNTP Set (Invitrogen, Darmstadt), DTT (Carl Roth, Karlsruhe), DMSO (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), EDTA (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Essigsäure Rotipuran p.a. (Carl Roth, Karlsruhe), Ethanol absolute p.a. (AppliChem, Darmstadt), Ethidiumbromid (Eurobio, Raunheim), FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), Fibronektin *Bovine Protein Plasma* (Thermo Scientific, Waltham, USA), G418 Disulfat-Salz (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Glycerol Rotipuran p.a. (Carl Roth, Karlsruhe), *GoTaq-Polymerase* (Promega, Mannheim), Hemacolor Lösungen 2 und 3 (Merck, Darmstadt), HEPES *Buffer Solution* 1M (Gibco, Carlsbad, USA), Immersionsöl (Merck, Darmstadt), IPTG (AppliChem, Darmstadt), Isopropylalkohol p.a. (AppliChem, Darmstadt), Kaliumacetat KAc (Carl Roth, Karlsruhe), Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt), Kristallviolett (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Laminin (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), *Lipofectamine 3000 Transfection Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, USA), *MagicMark XP Western Protein Standard* (Invitrogen, Carlsbad, USA), Magnesiumchlorid MgCl₂ (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Magnesiumsulfat MgSO₄ (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Manganchlorid MgCl₂ Hexahydrat p.a. (Merck, Darmstadt), Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt), Methanol (Merck, Darmstadt), MTT (Sigma Aldrich,

Saint Louis, USA), Nagellack Express *Nailcare* (Maybelline Jade, New York, USA), NaMOPS (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), *nonfat dried milk powder* (AppliChem, Darmstadt), Natriumchlorid NaCl p.a. (Carl Roth, Karlsruhe), Natronlauge NaOH 1M (Merck, Darmstadt), Natriumacetat (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Opti-MEM *reduced serum medium* (Gibco, Carlsbad, USA), *Orange G* (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Paraformaldehyd (Fluka Chemika, Saint Louis, USA), Penicillin/Streptomycin (Anti-Anti, 100x) (Gibco, Carlsbad, USA), Phosphatase-Inhibitor Cocktail II (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Puffer nach Weise Tabletten (Merck, Darmstadt), Roti[®]-Blue 5x Konzentrat (Carl Roth, Karlsruhe), Roti[®]-Block 10x Konzentrat (Carl Roth, Karlsruhe), Roti[®]-Blot A 10x (Carl Roth, Karlsruhe), Roti[®]-Blot K 10x (Carl Roth, Karlsruhe), Roti[®]-Histofix 4,5 % (Carl Roth, Karlsruhe), Roti[®]-phorese SDS-PAGE 10x (Carl Roth, Karlsruhe), RPMI Medium 1640 (Gibco, Carlsbad, USA), Schwefelsäure p.a. (Merck, Darmstadt), SDS *ultra pure* (Carl Roth, Karlsruhe), Sucrose (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), TEMED (Carl Roth, Karlsruhe), Terg-a-Zyme (Sigma, Saint Louis, USA), Terralin liquid (Schülke, Norderstedt), Tris Pufferan (Carl Roth, Karlsruhe), Tris-HCl Pufferan p.a. (Carl Roth, Karlsruhe), Tris-HCl *Buffer* 0,5 M pH 6,8 (BioRad, Hercules, USA), Tris-HCl *Buffer* 1,5 M pH 8,8 (BioRad, Hercules, USA), Triton X-100 BioChemica (AppliChem, Darmstadt), Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Tween 20, *molecular biology grade* (AppliChem, Darmstadt), Vitronektin, *cell culture tested* (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), Xylol (Merck, Darmstadt), X-Gal (AppliChem, Darmstadt), Xylencyanol FF (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well *Framestar* PCR Platten (4titude, Berlin), 96-Well *cell culture plates, black* (Greiner Bio-one, Frickenhausen), BD Röhrchen *Round-Bottom* (BD Biosciences, San Jose, USA), *Chromatography Paper* (Whatman, Maidstone, UK), Deckgläser Marienfeld 24x50 mm (Marienfeld, Lauda Königshofen), Immobilon-P Transfer Membran, PVDF 0,45 µm (Millipore, Temecula, USA), Cellstar *cell culture dishes* (Greiner Bio-one, Frickenhausen), Cellstar Zellkulturflaschen 25 cm², 75 cm², 175 cm² (Greiner Bio-one, Frickenhausen), Cellstar Zellkulturplatten (6-Well, 96-Well) (Greiner Bio-one, Frickenhausen), Einwegpipetten Cellstar, serologisch ((2, 5, 10, 25, 50) ml) (Greiner Bio-one, Frickenhausen), Einweghandschuhe, Supreno (Microflex, Chemnitz), *Cryo Tube Vials* (Thermo Scientific, Waltham, USA), Eppendorf-

Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg), FilterTips TipOne (StarLab, Ahrensburg), PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) (StarLab, Ahrensburg), Polypropylen Röhrchen (PP) 15 ml, 50 ml (Greiner Bio-one, Frickenhausen), Objektträger (Thermo Scientific, Waltham, USA), Objektträger 76x26 mm, geschnitten (Diagonal, Münster), Parafilm M (Laboratory Film, Chicago, USA), Pasteur-Pipetten (VWR, Darmstadt), *Pierce Maleic Anhydride Activated Plates, Clear, 96-Well* (Thermo Scientific, Waltham, USA), Polycarbonatmembranen 25x80 mm, Porengröße 8 µm (Neuro Probe, Gaithersburg, USA), Q-Stick *Adhesive Folie für qRT-PCR* (4titude, Berlin), Reservoir PS 25 ml (VWR, Darmstadt), *Safe Lock Tubes* 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg), Skalpelle, einmal, steril (Braun, Melsungen), Zellschaber Polyethylene steril (Corning Incorporated, Corning, USA)

2.1.3 Gebrauchsmaterialien

Accu-jet Pipetboy (Brand, Wertheim), BioRad Mini-Protean Tetra System Gelkammer (BioRad, Hercules, USA), Boyden-Migrationskammer, 48-Well-Mikro-Chemotaxis-Kammer (Neuro Probe, Gaithersburg, USA), Eppendorf Pipetten (Eppendorf, Hamburg), *Filtertemplate for AP48* (Neuro Probe, Gaithersburg, USA), Glasküvetten (Glaswerk Weinheim, Weinheim), Halterung für Objektträger (Diapath, München), Teigschaber (Rösle, Marktoberdorf), Nalgene *Cryo Freezing Container* (Nalgene Nunc International, Roskilde, DK), Neubauer Zählkammer *Improved Bright-Line* (Labor Optik, Lancing, UK)

2.1.4 Kit-Systeme

1-Step Human Coupled IVT Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA), *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Waltham, USA), *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt), *Cell Death Detection ELISA* (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), *Cell Proliferation ELISA, BrdU* (colorimetric) Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), *CellTox Green Cytotoxicity Assay* (Promega, Mannheim), *Human Phospho-Kinase Array Kit* (R&D Systems, Minneapolis, USA), *KAPA SYBR FAST qPCR Kit* (KAPA Biosystems, Wilmington, USA), *Mycoplasma Detection Kit* Venor GeM (Minerva Biolabs, Berlin), *NucleoBond Xtra Maxi Plus Endotoxin-free Kit* (Macherey & Nagel, Düren), *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey & Nagel, Düren), *NucleoSpin Plasmid Kit* (Macherey & Nagel, Düren), *Peq GOLD DNase I Digest Kit* (PeqLab, Erlangen), *Peq GOLD total RNA Kit* (PeqLab, Erlangen), *pGEM-T Vector System I* (Promega, Mannheim),

RealTime Glo Cell Viability Assay (Promega, Mannheim), *Western Lightning Plus-ECL Kit* (PerkinElmer Inc., Waltham, USA)

2.1.5 Geräte

Absaughilfe *Vacuboy* (IBS Integra Biosciences, Fernwald), *AquaLine AL 18* Wasserbad (Lauda, Lauda-Königshofen), *Axioskop 40* Mikroskop (Zeiss, Oberkochen), *Axiocam MRc5* Mikroskopkamera (Zeiss, Oberkochen), *Axiovert 40 CFL – HBO 50/AC* Mikroskop (Zeiss, Oberkochen), Bakterieninkubator (Heraeus, Hanau), *BioRad Trans-Blot Turbo* (BioRad, Hercules, USA), Dampfsterilisator *Varioklav* (H+P Labortechnik, Oberschleißheim), *DNA-Sequenzierer* *AbiPrism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Weiterstadt), *GloMax Multi-Detektionssystem* (Promega, Mannheim), *Durchflusszytometer* *FACS Calibur* (BD Biosciences, San Jose, USA), Eismaschine (Ziegra, Isernhagen), *ELISA Reader* *anthos 2010* (anthos, Krefeld), *Eppendorf Centrifuge 5415C* (Eppendorf, Hamburg), *Fluorochem E* (Protein Simple, Santa Clara, USA), Gefrierschrank -20 °C (Bosch, Gerlingen), Gefrierschrank -80 °C (Nalgene Nunc Int., Penfield, USA), Geldetektionsgerät (PeqLab, Erlangen), *GyroTwister* Schüttler (Labonet Int. Inc., Wien, AU), *Heißluftsterilisator* *Heraeus Oven* (Thermo Scientific, Waltham, USA), *Heiz-/Magnetrührer* (IKA Labortechnik, Stauffen), *Hera Safe* *Heraeus Sterilbank* (Thermo Scientific, Waltham, USA), *Hera Cell 240* Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, USA), *IKA Schüttler MTS4* (Labotec, Wiesbaden), *Kühlzentrifuge* *Heraeus Fresco 21* (Thermo Scientific, Waltham, USA), *Kühlschrank 4 °C Cooler* (Bosch, Gerlingen), *Kryo-Stickstofftank Locator 6 Plus* (Thermo Scientific, Waltham, USA), *Labor-Feinwaage* (Sartorius, Göttingen), *Lightcycler* *Platten-Zentrifuge Perfect Spin* (PeqLab, Erlangen), *Megafuge 1.0 R* *Heraeus* (Thermo Scientific, Waltham, USA), *Mikrowelle* (Siemens, München), *Mini-Gelkammer* mit Gelträger und Gelkämme (PeqLab, Erlangen), *Mini-Vac Power Pumpe* (PeqLab, Erlangen), *NanoDrop ND-3000* (PeqLab, Erlangen), *On-Block 08-3* Heizblock (Techne (RDSE), Abingdon, UK), *pH-Meter 211* (Hanna Instruments, Kehl am Rhein), *PP2000 Programmable High Voltage Power Pack* (Biometra, Göttingen), *Rollenmischer RS-TR 5* (Phoenix Instruments, Garbsen), *Taumelrollenmischer TRM-V 0.3 – 5 U/min* (IDL, Nidderau), *Thermocycler Touchdown* *Hybaid* (Hybaid, Heidelberg), *Ultraschallbad Sonorex Super RK510* (Bandelin electronic, Berlin), *Ultraschallstab* (Bandelin Electronic, Berlin), *Ultraturrax* (IKA Labortechnik, Stauffen), *Vortex VF2* (IKA, Stauffen)

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

AKT *Antibody, polyclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), phospho (S473) AKT *Antibody, polyclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), phospho (T308) AKT *Antibody, polyclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), β -Actin *Antibody, monoclonal, mouse* (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), β -Catenin *Antibody, monoclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), phospho (S133) CREB *Antibody, monoclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), ERK1/2 *Antibody, monoclonal, mouse* (R&D Systems, Minneapolis, USA), phospho (T202/Y204) ERK1/2 *Antibody, monoclonal, rabbit* (R&D Systems, Minneapolis, USA), FAK *Antibody, polyclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), phospho (Y397) FAK *Antibody, polyclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), Integrin α 1/CD49a PE-*conjugated*, human (R&D Systems, Minneapolis, USA), Integrin α 2/CD49b FITC-*conjugated*, human (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA), Integrin α 3/CD49c Fluorescein-*conjugated*, human (R&D Systems, Minneapolis, USA), Integrin α 5/CD49e PE-*conjugated*, human (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA), Integrin α 6/CD49f Alexa Fluor 488-*conjugated*, human (R&D Systems, Minneapolis, USA), Integrin α V/CD51 PE-*conjugated*, human (R&D Systems, Minneapolis, USA), Integrin β 1/CD29 PE-*conjugated*, human (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA), Integrin β 3/CD61 FITC-*conjugated*, human (Becton, Dickinson & Company, New Jersey, USA), phospho (T180/Y182) p38 MAPK *Antibody, polyclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), phospho SAPK/JNK (T183/Y185) *Antibody, polyclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), phospho (Y705) STAT3 *Antibody, monoclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA), V5 (D3H8Q) *Antibody, monoclonal, rabbit* (CST, Danvers, USA)

Die verwendeten Westernblot-Antikörper wurden je nach Herstellerangaben entweder in 2 % nfd Milchpulver TBS-T, 5 % BSA TBS-T oder in 1x Roti®-block (β -Actin) angesetzt. Die Verdünnung war jeweils 1:1000.

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Goat *Anti-Rabbit, polyclonal, Immunoglobulins/HRP* (DAKO, Hamburg), *Rabbit Anti-Mouse, polyclonal, Immunoglobulins/HRP* (DAKO, Hamburg), *Rabbit Anti-Goat, polyclonal, Immunoglobulins/HRP* (DAKO, Hamburg)

Die für den Western Blot benötigten sekundären Antikörper von DAKO wurden jeweils 1:1000 in 2 % nfd Milchpulver TBS-T angesetzt.

2.1.7 Puffer und Lösungen

Agarosegel (x %)	x g Agarose 100 ml 1x TBE
Ampicillin	Stammlösung 10 mg/ml dH ₂ O Endkonzentration 0,1 mg/ml
Anoden-/Kathodenpuffer	16 ml 10x Roti [®] -A bzw. Roti [®] -K 84 ml dH ₂ O 32 ml EtOH
DNA-Ladepuffer (blau)	0,125 g Bromphenolblau 0,125 g Xylencyanol FF 7,5 g Ficoll 400 auf 50 mL dH ₂ O
Ethidiumbromid-Lösung	2 µg EtBr/ml dH ₂ O
FM-Medium (2x)	65 % Glycerin 100 mM MgSO ₄ 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
IPTG	Stammlösung 200 mg/ml Endkonzentration 0,048 mg/ml
Kristallviolett-Lösung	5 mg/ml in 2 % Ethanol
Ladepuffer (6x)	350 mM Tris-HCl 34,4 % Glycerol 10 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,06 % Bromphenolblau

	eingestellt auf einen pH-Wert von 6,8
LB-Agar	15 g Bacto-Agar auf 1 L LB-Medium, autoklavieren
LB-Ampicillin/X-Gal/IPTG-Agar	5 ml Ampicillin (10 mg/ml) 0,12 ml IPTG (200 mg/ml) 1 ml X-Gal (20 mg/ml) auf 500 ml LB-Agar
LB-Medium (1x)	10 g Bacto- <i>Tryptone</i> 5 g Bacto- <i>Yeast-Extract</i> 10 g NaCl auf 1 l dH ₂ O (pH 7,5), autoklavieren
Lysepuffer zur Proteinextraktion	500 µl Puffer C (10x) 50 µl DTT (0,5 mM) 50 µl Protease-Inhibitor 50 µl Phosphatase-Inhibitor 4250 µl dH ₂ O
<i>Orange Dye</i> (5x)	30 % Sucrose 0,35 % Orange G
Puffer C (10x)	20 mM HEPES 0,2 M NaCl 0,5 mM MgCl ₂ 0,4 mM EDTA 1 % Triton X-100
Puffer nach Weise	1 Puffertablette in 1 L dH ₂ O gelöst
SOB-Medium	20 g Bacto- <i>Tryptone</i> 5 g Bacto- <i>Yeast-Extract</i>

	0,5 g NaCl auf 1 l dH ₂ O, autoklavieren 10 mM MgCl ₂ (steril filtriert) 10 mM MgSO ₄ (steril filtriert)
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glucose-Lösung (steril filtriert)
TBE-Puffer (1x)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na ₂ EDTA autoklavieren
Tfb I Puffer	10 mM CaCl ₂ 30 mM KAc 100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 15 % Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure, steril filtrieren
Tfb II Puffer	75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 10 mM NaMOPS (pH 7,0) 15 % Glycerin steril filtrieren
TBS (10x)	26 g Tris-HCl 4,24 g Tris 292,7 g NaCl auf 1 L mit dH ₂ O gelöst
TBS-T	1x TBS 0,1 % Tween 20

HMBS (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i> 5'-GGAGACCAGGAGTCAGACTGT-3' <i>Reverse</i> 5'-AAGTAGGCTGTGTGTGGGTG-3'
HPRT (61 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i> 5'-ATTGACAGTGGGAAAACAATGC-3' <i>Reverse</i> 5'-TCCAACACTTCGTGGGGTCC-3'
IFI27 (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i> 5'-GCTCCATTGGGTCTGCCATT-3' <i>Reverse</i> 5'-TTTGGGATAGTTGGCTCCTCG-3'
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
PDH (61 °C, 10,5,1)	<i>Forward</i> 5'-GACCAATGGACATGGAAACC-3' <i>Reverse</i> 5'-TGGCAACCGTAACAGACAAA-3'
POSTN (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i> 5'-GGAGGCAAACAGCTCAGAGT-3' <i>Reverse</i> 5'-AATCGCACCGTTTCTCCCTT-3'
PPIA (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i> 5'-ACGTGGTATAAAAGGGGCGG-3' <i>Reverse</i> 5'-TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG-3'
PTEN ORF	<i>Forward</i> 5'-CAGACATGACAGCCATCATC-3' <i>Reverse</i> 5'-TCAGACTTTTGTAAATTTGTGTATG-3'
PTEN _q (63 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i> 5'-TCCACAAACAGAACAAGATGC-3' <i>Reverse</i> 5'-TCTACTGTTTTTGTGAAGTACAG-3'
PTEN-Δ _q (62 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i> 5'-TCCACAAACAGAACAAGATGC-3' <i>Reverse</i> 5'-ACACACATCACATACATAAAG-3'
PTEN-Δ 2	<i>Reverse</i> 5'-CCAACCCCCACAAAATGTTTAA-3'
PTEN-ΔxBamHI	<i>Forward</i> 5'-GCTCGGATCCGCCCTTCACCATGACAG CCATCATCAAAGA-3'

PTEN- Δ xXhoI	<i>Reverse</i>	5'-TAGACTCGAGCGGCCGCCACTACTGAC CTTAAAATTTGGAGAAA-3'
PTV5R-EcoRI	<i>Forward</i>	5'-TAGGAATTCGGAATTGCCCTTCAC CATGAC-3'
PTV5R-BamHI	<i>Reverse</i>	5'-ACTGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGATGA-3'
RASGRF2 (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i>	5'-TCTCAAAGCACGCACAGGAT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-GAAGGTCTGGGTCTCGCAA-3'
SLAMF7 (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i>	5'-TGTGCTAGGTCACTCTGGCA-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CCTTTCCCCTTCCCCATGTT-3'
STK33 (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i>	5'-TTCGGTGAGACCAACCAATGT-3'
	<i>Reverse</i>	5'-ACTTTTCTTCAGTGGACGGCT-3'
TBP (66 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i>	5'-GGATAAGAGAGCCACGAACCAC-3'
	<i>Reverse</i>	5'-TTAGCTGCTGGAAAACCCAATTCTG-3'
TNFRSF1B (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i>	5'-CACCGGGAGCTCAGATTCTTC-3'
	<i>Reverse</i>	5'-GCTGCTACAGACGTTACGA-3'
T7	<i>Forward</i>	5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
M13	<i>Forward</i>	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
SP6	<i>Reverse</i>	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7 term.	<i>Reverse</i>	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
V5	<i>Reverse</i>	5'-TAAGCCTATCCCTAACCCCTC-3'
WLS (60 °C, 5,5,1)	<i>Forward</i>	5'-CCACAACGGCAGTGTCCTAC-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CCCCAAGGCACGAACCATTT-3'

2.1.10 Vektoren

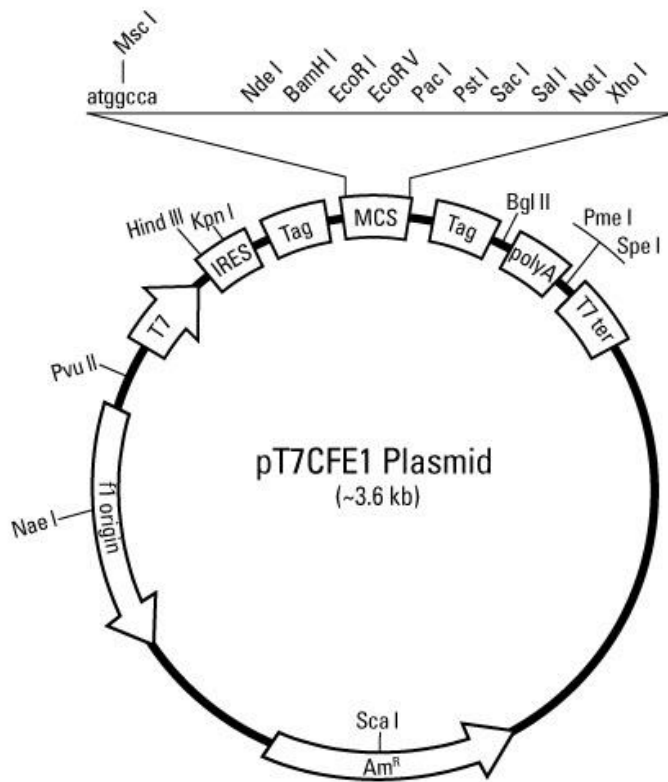


Abbildung 11: pT7CFE1 Vektor. Plasmid aus dem *1-Step Human Coupled IVT Kit* zur Herstellung von Proteinen im Reaktionsgefäß.

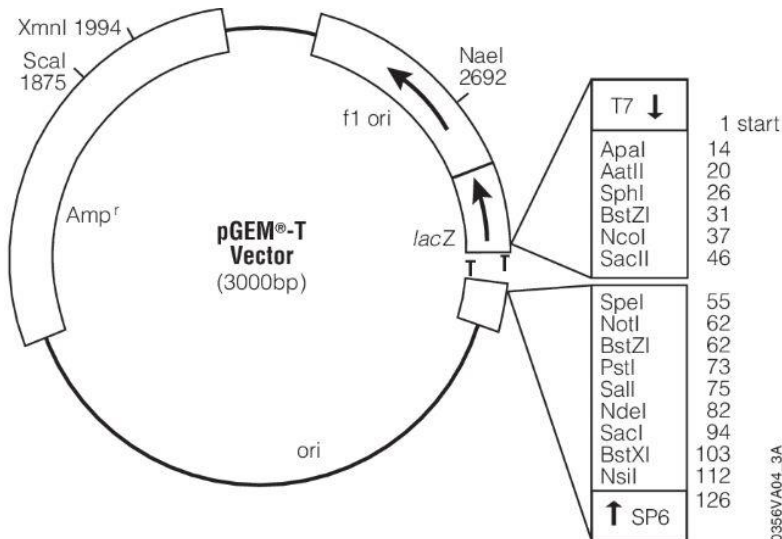


Abbildung 12: pGEM-T Vektor. Das pGEM-T Vektor System diente als Vehikel um DNA-Fragmente mittels TA-Klonierung in den Vektor einzubringen.

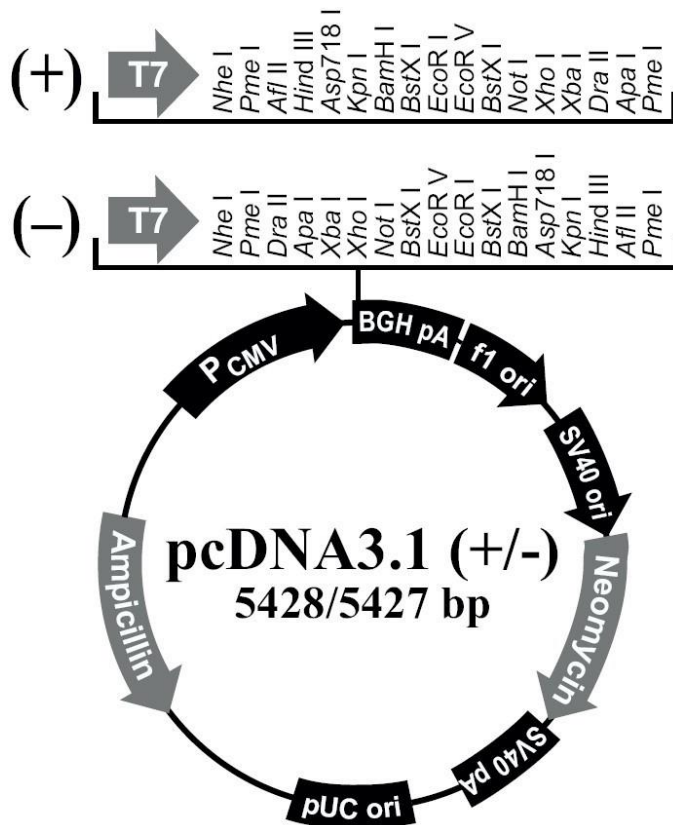


Abbildung 13: pcDNA3.1(+/-)-Vektor. Der pcDNA3.1(+/-)-Vektor dient als Vehikel für das Einbringen von Gensequenzen in eukaryotische Zelllinien.

2.1.11 Bakterienstämme

E. coli DH5α

F⁻, supE44, hsdR17, recA1, ΔlacU169,
 Φ80dlacZΔM15, endA1, gyrA96, (r_k⁻, m_k⁺),
 thi-1, relA1, λ-

2.1.12 Gewebeproben

Die verwendeten Gewebeproben von Patientinnen mit Mammakarzinom wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Jan G. Hengstler (Leibniz-Institut für Arbeitsforschung, TU Dortmund) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Mit den Gewebeproben war bereits eine RNA-Isolation mit anschließender cDNA-Synthese durchgeführt worden. Das *Follow-Up* der Patientinnen wurde der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit in Mainz zur statistischen Analyse zur Verfügung gestellt.

2.1.13 Kontinuierliche Zelllinien

786-O (*American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville Maryland)

Die Zelllinie 786-O weist eine epitheliale Morphologie auf. Diese wurde aus dem Primärtumor eines klarzelligem Adenokarzinoms eines 58-jährigen männlichen Patienten etabliert.

A498 (*American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville Maryland)

Diese Tumorzelllinie wurde aus dem Nierenzellkarzinom einer 52-jährigen weiblichen Patientin etabliert. Es handelt sich um Zellen epithelialer Herkunft.

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Steriles Arbeiten

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank kultiviert. Die hierzu benötigten Medien und Lösungen wurden zuvor im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und vor Gebrauch mit Reinigungsalkohol (Terralin liquid) desinfiziert. Alle Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wiesen keine Kontaminationen mit Mykoplasmen auf.

2.2.2 Kultivierung humaner Zelllinien

Die verwendeten humanen Zelllinien wurden alle mit dem Nährmedium RPMI 1640 kultiviert. Dies enthielt zusätzlich 10 % FCS, 1 % P/S und 2,5 % HEPES. Bei konfluentem Wachstum wurden die Zellen gesplittet und passagiert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen und die adhären Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Nach kurzer Inkubationszeit, welche für jede Zelllinie spezifisch ist, lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ab. Durch Zugabe von 9 ml Vollmedium wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und entweder in eine neue Zellkulturflasche überführt oder für weitere Versuche in 15 ml Falcons pipettiert. Die in späteren Versuchen verwendeten serumfreien Medien enthielten kein FCS als Zusatz. Für die Kultivierung von stabiltransfizierten Zellen wurde zusätzlich der Selektionsmarker G418 in einer Konzentration von 400 mg/ml zugegeben.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Auf die Neubauer Zählkammer wurde ein Deckglas aufgelegt und gegeneinander bewegt bis die Newtonschen Interferenzfarben zwischen Außenstegen und Deckglas sichtbar wurden. Es wurden 15 μl Zellsuspension an den Rand des Deckglases pipettiert. Durch Kapillarwirkung gelangte die Suspension unter das Deckglas. Anschließend wurden unter dem Mikroskop je vier 4x4 Quadrate ausgezählt. Lagen Zellen direkt auf den Begrenzungslinien, wurden diese nur auf zwei Seiten des Großquadrates gezählt. Der Mittelwert der Zellanzahl aus den vier Quadraten multipliziert mit dem Faktor 10^4 ergibt die Zellzahl pro Milliliter. Der Faktor ergibt sich aus dem Volumen eines 4x4 Quadrates der Neubauer Zählkammer welches 10^{-4} cm^3 entspricht.

2.2.4 Kryo-Konservierung

Zur Kryo-Konservierung der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in 9 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe in einem bestimmten Volumen Medium ($\sim 1 \times 10^6$ Zellen/ml) resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 10 % DMSO. Pro Kryogefäß wurde 1 ml Zellsuspension eingesetzt. Die Kryogefäße wurden im Isopropylbehälter bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryogefäße in ein $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmes Wasserbad gestellt. Die aufgetauten Zellen wurden mit 1 ml Medium verdünnt und anschließend in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 3 ml Medium resuspendiert und in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche ausplattiert, in der bereits 12 ml Vollmedium vorgelegt wurde.

2.2.5 Stabile Transfektion

Für die stabile Transfektion von pcDNA3.1-Konstrukten wurden 2×10^5 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte in 4 ml Medium ausplattiert, um eine Konfluenz von 70 % bis 90 % zu erreichen. Am nächsten Tag wurden 5 μg Endotoxin-freie Plasmid-DNA zusammen mit 10 μl P3000 in 125 μl Opti-MEM vereint. Parallel wurden in einem zweiten Eppendorf-Reaktionsgefäß 7,5 μl L3000 in 125 μl Opti-MEM vermengt. Die

beiden Reaktionsgemische wurden vereint und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die gesamten 250 µl tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und 4 ml Selektionsmedium zugegeben. Die Zellen wurden für mehrere Wochen bis zur vollständigen Selektion kultiviert und expandiert. Hierbei erfolgte alle 2 bis 3 Tage ein Wechsel des Mediums.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Zur Expressionsanalyse der Integrin-Rezeptoren wurde eine Messung am Durchflusszytometer durchgeführt. Die Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und anschließend gezählt. Pro Messansatz wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 300 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit DPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit 100 µl DPBS mit 1 % BSA resuspendiert. 10 µl des primären, Fluoreszenz-markierten Antikörpers wurden jeweils zu der Zellsuspension zugegeben. Als Kontrolle diente eine ungefärbte Zellsuspension. Des Weiteren wurden pro Zelllinie Einzelfärbungen zur Einstellung der Kompensation am Durchflusszytometer mitgeführt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4 °C wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl DPBS aufgenommen und am Durchflusszytometer FACS Calibur der Firma BD mit der Software CellQuest Pro analysiert. Die Auswertung erfolgte mit den Programmen FlowJo v10.2 und Microsoft Excel.

2.2.7 Migration in der Boyden-Kammer

Um eine Aussage bezüglich der chemotaktischen Aktivität der transgenen Zellen treffen zu können, wurde die Migration in Richtung verschiedener Komponenten der Extrazellulär-Matrix (EZM) untersucht. Die Zellen wurden 24 h vor dem Versuch auf serumfreies Medium umgestellt. Am Versuchstag wurden die Zellen abgelöst, einmal mit DPBS gewaschen und gezählt. Es wurden 6×10^5 Zellen bei 300 g für 5 min zentrifugiert und die Zellen in 2 ml serumfreies Medium resuspendiert. Die Boyden-Migrationskammer (48-Well) besteht aus einem unteren Teil, indem sich der Lockstoff befindet und einem oberen Teil, in welchen die Zellsuspension gefüllt wird. Die beiden Teile sind durch eine Polycarbonat-Membran, mit der Porengröße 8 µm, getrennt. Da die Porengröße weit unter der Zellgröße liegt, muss eine Zelle, die durch das Chemotaxin gelockt wird, aktiv durch die Poren migrieren und adhärert nach

Durchwanderung an der Unterseite der Membran. Die Vertiefungen im unteren Teil der Boyden-Migrationskammer wurden mit je 29 μl einer Chemotaxin-Lösung befüllt. Als Chemotaxin wurde entweder Fibronectin (10 $\mu\text{g/ml}$), Vitronectin (5 $\mu\text{g/ml}$), Laminin (50 $\mu\text{g/ml}$), Kollagen I (10 $\mu\text{g/ml}$) oder Kollagen IV (10 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Als Kontrolle diente serumfreies Medium. Anschließend wurde die Membran, welche zuvor in DPBS eingelegt wurde, vorsichtig mit der glänzenden Seite nach unten aufgebracht. Nachdem der Dichtungsring und der obere Teil der Migrationskammer aufgelegt wurden, wurde die Kammer mit sechs Schrauben fest verschlossen. In die Vertiefungen der oberen Migrationskammer wurden nun 50 μl der bereits vorbereiteten Zellsuspension pipettiert. Es wurden jeweils 4-fach Ansätze durchgeführt. Die Boyden-Migrationskammer wurde für 16 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension aus dem oberen Teil der Migrationskammer verworfen und die Schrauben gelöst. Die Membran wurde entnommen und zwischen zwei Klammern eingespannt. Die raue Seite der Membran wurde zweimal mit Puffer nach Weise gewaschen und durch Ziehen über einen Küchenschaber von Zellen befreit. Nachdem die Membran getrocknet war, wurden die Zellen auf der glänzenden Seite der Membran für 1 min in Methanol fixiert. Die Membran wurde erneut getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Färbe-Kit-System Hemacolor angefärbt. Hierzu wurde die Membran 3x durch die rötliche Lösung 2 und 6x durch die bläuliche Lösung 3 gezogen. Überschüssiges Färbemittel wurde im Puffer nach Weise ausgewaschen. Die Membran wurde nach dem Trocknen auf einen Objektträger gelegt und mit Immersionsöl eingedeckelt. Das Deckglas wurde mit Hilfe von Nagellack fixiert. Nach dem Trocknen konnte die Migrationskammer am Lichtmikroskop ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Rasterokulars, welches ein Quadrat von $10 \times 10 \text{ mm} = 100 \text{ mm}^2$ Kleinquadraten aufzeigt. In jedem Migrationsfeld wurden 10 Quadrate ausgezählt. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der Summen der 4 Migrationsfelder ermittelt und die Standardabweichung berechnet.

Die Reinigung der Boyden-Migrationskammern erfolgte mit einer 1 %igen Terg-a-Zyme Lösung. Hierzu wurde die erforderliche Menge an Terg-a-Zyme in Wasser unter Rühren und Erwärmung auf ca. 40 °C gelöst. Die Boyden-Migrationskammern wurden zunächst mit dH_2O gespült und anschließend über Nacht in der

Terg-a-Zyme Lösung eingelegt. Am nächsten Tag wurden die Migrationskammern mit dH₂O gespült und getrocknet.

2.2.8 Adhäsion an Komponenten der Extrazellular-Matrix

Mit Hilfe des Adhäsionsassays konnte die Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen an verschiedene Komponenten der Extrazellular-Matrix (EZM) untersucht werden. Hierzu wurden je 100 µl der EZM-Komponenten Fibronectin (10 µg/ml), Vitronectin (5 µg/ml), Laminin (50 µg/ml), Kollagen I (10 µg/ml) und Kollagen IV (10 µg/ml) in den entsprechenden Konzentrationen in eine *Pierce Maleic Anhydride Activated* 96-Well-Platte gegeben und über Nacht (üN) auf einem Schüttler inkubiert. Es wurden jeweils vierfach Ansätze durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Lösungen verworfen und die Platte zweimal mit je 100 µl Waschpuffer (DPBS + 0,05 % Tween 20) gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit je 200 µl pro Well Blockpuffer (DPBS + 0,5 % BSA) für 1 h im 37 °C-Inkubator blockiert. Währenddessen wurden die Zellen in Suspension gebracht und für den Versuch auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Blocklösung wurde entfernt und pro Well 50 µl Zellsuspension gegeben. Es folgte eine erneute Inkubation bei 37 °C für 1 h. Um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen wurde die Platte zweimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die adhärenierten Zellen durch Zugabe von 100 µl pro Well Roti[®]-Histofix 4,5 % für 15 min bei RT fixiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit 100 µl Waschpuffer. Im Anschluss konnten die fixierten Zellen mit 100 µl Kristallviolett-Lösung für 10 min bei RT gefärbt werden. Durch dreimaliges Waschen mit je 200 µl Waschpuffer wurde überschüssiges Färbemittel entfernt. Die Platte wurde an der Luft getrocknet und der Farbstoff durch Zugabe von 100 µl pro Well 2 %ige SDS-Lösung für 30 min gelöst. Die Detektion der Absorption wurde am ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

2.2.9 MTT-Assay

Für den MTT-Assay wurden je 5000 Zellen pro Well in 100 µl Vollmedium in eine 96-Well-Platte ausplattiert. Nach 24 h Inkubation im CO₂-Inkubator wurde das Vollmedium entfernt und je 100 µl serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 20 µl einer 0,5 %igen MTT-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 4 h wurde der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von je 100 µl DBPS gewaschen. Nach Entfernung der Waschlösung wurde der

umgesetzte Farbstoff durch Zugabe von 100 µl Isopropanol aus den Zellen gelöst. Die Platte wurde für 15 min auf dem Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im ELISA Reader bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

2.2.10 Proliferationsassay

Die Zellproliferation wurde mittels der BrdU-Inkorporation und anschließender Antikörper-vermittelter Detektion durchgeführt. Hierzu wurde das Kit-System der Firma Roche verwendet. Es wurden jeweils 5000 Zellen pro Well in 100 µl Vollmedium in einer 96-Well-Platte ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte der Wechsel auf 100 µl serumfreies Medium. Zusätzlich wurde ein Blank, welcher später nicht mit Anti-BrdU Antikörper behandelt wurde, mitgeführt. Alle Ansätze wurden vierfach durchgeführt. Am nächsten Tag erfolgte der Proliferationsassay. Hierzu wurde BrdU 1:100 in DPBS verdünnt und jeweils 10 µl pro Well gegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Lösungen aus der 96-Well-Platte vorsichtig entfernt und 200 µl *Fix-Denat*-Lösung pro Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Die Lösungen wurden entfernt und 100 µl Anti-BrdU Antikörper-Lösung pro Well auf die Zellen gegeben. In der Anti-BrdU Antikörper-Lösung wurde der Antikörper 1:100 in *Dilution Solution* verdünnt. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen verworfen und die 96-Well-Platte dreimal mit je 200 µl/Well 1x *Washing Solution* gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 100 µl Substratlösung pro Well für 15 min bei RT. Durch Reaktion des Substrates TMB mit der an dem Anti-BrdU Antikörper gekoppelten Peroxidase kommt es zu einer blauen Farbreaktion. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt. Durch den pH-Sprung verfärbte sich die Lösung gelb. Die 96-Well-Platte wurde für 1 min bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption im ELISA Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

2.2.11 *RealTime-Glo*TM Assay

Durch die Verwendung des *RealTime-Glo*TM Assays konnte eine Aussage über die Viabilität der Zellen im Zeitverlauf getroffen werden. Hierzu wurden 5000 Zellen pro Well in Triplikaten in eine schwarze 96-Well-Platte ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das *RealTime-Glo*TM Reagenz hinzugegeben und nach einer Inkubation von 1 h die Lumineszenz im GloMax Multi-

Detektionssystem gemessen. Anschließend wurde die Platte zurück in den Inkubator gestellt und jede weitere 30 min die Lumineszenz ermittelt. Nach einer Gesamtanzahl von 10 Messungen wurde der Versuch beendet. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

2.2.12 Cell Death Detection Assay

Der *Cell Death Detection Assay* eignet sich zur Analyse der Apoptoserate der Zellen. Zur Vorbereitung des *Cell Death Detection Assays* wurden 5×10^4 Zellen in eine 6-Well-Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen und die Zellen mit einem Zellschaber in 500 μ l Inkubationspuffer aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde die Probe bei 20000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss direkt im Assay verwendet. Für den Assay wurden am Tag zuvor je 100 μ l pro Well *Coating Solution* in die mitgelieferte 96-Well-Platte gegeben. Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung entfernt und es folgte eine Inkubation für 30 min bei RT mit 200 μ l Inkubationspuffer. Anschließend wurden die Wells dreimal mit je 300 μ l *Washing Solution* gewaschen. Es folgte die Auftragung von je 100 μ l Probe. Zusätzlich wurde ein Well als Hintergrund-Kontrolle, welche nur Inkubationspuffer enthielt, mitgeführt. Nach 90 min wurden die Lösungen entfernt und die Wells erneut dreimal mit je 300 μ l *Washing Solution* gewaschen. Pro Well wurden im Anschluss 100 μ l *Coating Solution* pipettiert und für 90 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen konnte die Detektion mit Hilfe von je 100 μ l pro Well *Substrate Solution* erfolgen. Hierzu wurde die Platte für etwa 10 min geschüttelt und die Absorption im *ELISA Reader* bei 405 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.3.1 Proteinextraktion aus Zellkulturen

Um eine Proteinextraktion aus Zellkulturen durchzuführen, wurden 5×10^5 Zellen in eine Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit 10 ml eiskaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurden 500 μ l Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgenommen. Während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis

wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße mehrmals mit Hilfe eines Vortex resuspendiert. Anschließend wurden die Zellysate bei 20000 g für 10 min bei 4 °C in der Mikro-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Protein-Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

2.3.2 Proteinextraktion aus Patientengewebe

Zur Extraktion von Proteinen aus Patientengewebe wurde ein gefrorenes Gewebestück von etwa 50 mg verwendet. Dieses wurde mit 500 µl vorgekühltem Lysepuffer versetzt und mit einem Ultraturrax zerkleinert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurde die Probe bei 700 g und 4 °C für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und anschließend mit einem Ultraschallstab mit 3x 10 Stößen weiter aufgeschlossen. Die Probe wurde bei 20000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Protein-Konzentrationsbestimmung und die Lagerung bei -20 °C.

2.3.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Protein-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem BCA Kit-System von Thermo Scientific. Die Proteinextrakte wurden jeweils 1:5 verdünnt, d.h. 15 µl Proteinextrakt wurde mit 60 µl dH₂O in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß versehen. Die Reaktionslösung wurde aus den Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt und 600 µl zu jeder Probe, sowie zu je 75 µl der Standards (Konzentrationsreihe A-I) gegeben. Anschließend wurden die Proben in eine 96-Well-Platte überführt. Es erfolgte eine dreifache Bestimmung mit je 200 µl. Die 96-Well-Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm mit dem *ELISA Reader* gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand der Standardreihe mit dem Programm Microsoft Excel ermittelt.

2.3.4 Proteinfällung und Lösen von Proteinen

Das Volumen für die erforderliche Menge von 100 µg an Proteinextrakt wurde mit dem neunfachen Volumen an vorgekühltem Aceton versehen. Die Proteine wurden über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden diese bei 20000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Aceton wurde verworfen und das Pellet in 25 µl 2x Ladepuffer gelöst.

2.3.5 SDS-PAGE

Für die Auftrennung der Proteine wurden Gele nach dem in Tabelle 1 aufgezeigten Pipettierschema gegossen, wobei zunächst das Trenngel gegossen wurde und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit 15 Taschen gesteckt. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurde ein 7,5 %iges oder ein 10 %iges Trenngel verwendet.

Tabelle 1: Pipettierschema SDS-PAGE

Pipettierschema für 2 Gele			
Reagenz	Trenngel (7,5 %)	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
30 % Acrylamid	2,5 ml	3,4 ml	830 µl
dH ₂ O	5,3 ml	3,8 ml	3,4 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,6 ml	2,6 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	-	630 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	4 µl	5 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	50 µl

Die bereits in Ladepuffer gelösten Proteine wurden für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Währenddessen wurden die Gele in die Laufkammer eingespannt, die Laufkammer mit 1x SDS-Rotiphorese Puffer gefüllt und vorsichtig die Kämmen entfernt. Die Proben wurden auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Die erste Geltasche wurde jeweils mit 4 µl *BenchMark* Marker und 3 µl *MagicMark* Marker beladen. Von den Proben wurden jeweils 10 µl eingesetzt. Die Proteine wurden zunächst bei 75 Volt aufgetrennt. Nach Übergang von der Sammelgelphase in die Trenngelphase wurde die Spannung auf 125 Volt erhöht. Nach Ablauf der SDS-PAGE wurden die Gele direkt geblottet.

2.3.6 Westernblot

Für den Westernblot wurden pro Gel eine PVDF-Membran und 12 Filterpapiere auf eine Größe von 9,5 cm x 6,5 cm zugeschnitten. Kurz vor Ende des Gellaufes wurden der Anodenpuffer und der Kathodenpuffer angesetzt. Die PVDF-Membran wurde zunächst in EtOH aktiviert und anschließend für 2 min in dH₂O gewaschen und für 5 min in Anodenpuffer äquilibriert. Es wurden sechs Filterpapiere in Kathodenpuffer und sechs Filterpapiere in Anodenpuffer getränkt. Im Anschluss erfolgte der Blot-Aufbau. Die Anode wurde mit Anodenpuffer befeuchtet und ein Sandwich aus sechs,

in Anodenpuffer getränkten Filterpapieren, PVDF-Membran, Gel und sechs, in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren gebaut. Um Luftblasen zu entfernen wurde ein dafür vorgesehener „*blotting roller*“ verwendet. Die Kathode wurde mit Kathodenpuffer befeuchtet und die Blot-Kammer geschlossen. Die Proteine wurden bei 25 Volt, 0,1 Ampere für 30 min auf die Membran übertragen.

2.3.7 Proteindetektion

Um spezifische Proteine auf der Membran detektieren zu können, wurden die Membranen nach dem Westernblot zunächst für 1 h in 2 % nfd Milch oder 5 % BSA (je nach Herstellerangaben) in TBS-T auf dem Schüttler inkubiert. Hierdurch wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach der Blockierung wurde die Membran in ein 50 ml Falcon überführt und über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper auf einem Rollenschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 1 auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde das *Western Lightning Plus ECL* Reagenz verwendet. Pro Membran wurden 2 ml *Oxidizing Reagent* mit 2 ml *Enhanced Luminol Reagent Plus* vermischt und auf die Membran für 1 min gegeben. Anschließend wurde die Membran von überschüssigen Reagenz befreit, zwischen zwei Folien gelegt und im Fluorochem Detektor die Chemilumineszenz detektiert. Falls die Membran noch ein weiteres Mal verwendet werden sollte, wurde diese nach der Proteindetektion gestrippt. Ansonsten wurde eine Coomassie-Brillant-Blau Färbung der Membran durchgeführt. Zum Strippen wurde die Membran auf dem Schüttler 5 min in dH₂O gewaschen, 20 min in 0,2 M NaOH inkubiert und erneut für 5 min in dH₂O gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit dem Programm *AlphaView SA* von *Protein Simple* quantifiziert und anschließend mit dem Programm Microsoft Office Excel ausgewertet.

2.3.8 Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Die Coomassie-Brillant-Blau Färbung der Membranen wurde mit Roti®-Blue durchgeführt. Hierzu wurden 60 ml dH₂O mit 20 ml MeOH vermischt und anschließend unter Rühren 20 ml Roti®-Blue zugegeben. Die Membran wurde für etwa 1 h mit 25 ml Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit einer Lösung welche 2,5 % EtOH und 7,5 % Essigsäure enthielt. Die Membranen wurden an der Luft getrocknet und dokumentiert.

2.3.9 Phospho-Kinase Array

Der *Human phospho-Kinase Array* bietet den Vorteil, dass man gleichzeitig den Phosphorylierungsstatus von 45 Kinasen in einer Proteinprobe analysieren kann. Für die Probenvorbereitung wurden die Zellen mit 600 µl Lysepuffer 6 für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Lysat für 5 min bei 14000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und eine Protein-Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Für den Array wurden je 300 µg Protein in 334 µl benötigt. Der Array besteht aus zwei Membranen (A und B), welche jeweils in ein Well einer 8-Well-Platte gelegt wurden. Durch Zugabe von 1 ml Array Puffer 1 wurden die Membranen für 1 h auf einem Kippschüttler blockiert. Währenddessen wurden die angesetzten Proteinproben mit 1666 µl Array Puffer 1 verdünnt. Die Blocklösung wurde verworfen und jeweils 1 ml Proteinlösung pro Membran in die 8-Well-Platte gegeben. Es folgte eine Inkubation ÜN bei 4 °C auf einem Kippschüttler. Am nächsten Tag wurden die Membranen A und B zusammen in eine Zellkulturschale überführt und mit 20 ml 1x Waschpuffer für 10 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die Membranen A und B wieder in die 8-Well-Platte gegeben. Zu der Membran A bzw. B wurden 20 µl des *Detection Antibody Cocktail A* bzw. B mit 1 ml 1x Array Puffer 2/3 gegeben und die Membranen für 2 h bei RT auf einem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut in Zellkulturschalen dreimalig für 10 min mit 20 ml 1x Waschpuffer gewaschen. Diesmal erfolgten die Waschschriffe jedoch in getrennten Schalen. Währenddessen wurde das Streptavidin-HRP in 1x Array Puffer 2/3 verdünnt. Die Membranen wurden zurück in die 8-Well-Platte gelegt und jeweils 1 ml des verdünnten Streptavidin-HRP zugegeben. Es folgte eine Inkubation auf dem Kippschüttler für 30 min. Anschließend wurden die Membranen erneut zusammen in einer Zellkulturschale dreimal mit 20 ml 1x Waschpuffer für je 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines *Chemi Reagent Mix*, welcher für 1 min auf die Membranen gegeben wurde. Im Anschluss wurden die Membranen von überschüssigem Reagenz befreit, zwischen zwei Folien gelegt und die Chemilumineszenz im Fluorochem Detektor dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der bereitgestellten Vorlage und dem Programm *AlphaView SA* von *Protein Simple*.

2.3.10 *In vitro* Translation (IVT)

Die *in vitro* Translation erfolgte mit dem Kit-System *1-Step Human Coupled IVT* von Thermo Scientific und dem dazugehörigen Vektor pT7CFE1. Nach erfolgreicher Klonierung der gewünschten Gensequenz in die MCS des Vektors wurde die IVT zur Herstellung von Proteinen im Reaktionsgefäß durchgeführt. Zunächst wurden die bei -80 °C gelagerten Reagenzien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 12,5 µl des HeLa-Lysates mit 2,5 µl der *Accessory Proteins* in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Danach wurden 5 µl Reaktionsmix und 2 µl des Vektors, welcher zuvor auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl eingestellt wurde, hinzugegeben. Nach der Zugabe von 3 µL Nuklease-freiem Wasser erfolgte die IVT bei 30 °C für mindestens 3 h. Die generierten Proteinlösungen wurden im Anschluss aliquotiert und bei -20 °C bis zur Verwendung im Westernblot gelagert.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

Zur Durchführung von Transformationsversuchen mussten zunächst chemokompetente *E. coli DH5α* hergestellt werden. Hierzu wurde ein ausgestrichener *E. coli DH5α* Klon von einer Agarplatte gepickt und eine 15 ml üN-Kultur im Schüttler bei 37 °C angesetzt. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte (OD) bei 550 nm gemessen. Durch Zugabe von SOB-Medium wurde die OD₅₅₀ auf 0,05 eingestellt. Es folgte eine Inkubation im Schüttler bei 37 °C bis die Kultur einen OD₅₅₀ von 0,5 erreichte. Im Anschluss wurde die Kultur in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei 1200 g für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml eiskaltem Tfb I Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min folgte eine erneute Zentrifugation bei 823 g für 6 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml eiskaltem Tfb II Puffer resuspendiert. Die Bakterien-suspension wurde in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Transformation chemokompetenter Zellen

Zur Durchführung der Transformation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes zu 80 µl chemokompetenten *E. coli DH5α*, welche zuvor auf Eis aufgetaut wurden, in ein Rund-Röhrchen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Anschließend wurden die Bakterien bei 42 °C für 50 sek im Wasserbad Hitze geschockt. Nach einer

Inkubation für 2 min auf Eis wurde 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden für 1 h im Inkubator bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden 200 - 350 µl Ansätze auf Ampicillin-haltige LB-Agar-Platten ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien-Klone die sich auf den Platten gebildet hatten hinsichtlich der erfolgreichen Integration des Plasmids in einer PCR analysiert.

2.4.3 Ansetzen von Dauerkulturen

Für die dauerhafte Kultivierung von Bakterienkulturen wurden 500 µl einer Bakterien-suspension zusammen mit 500 µl 2x FM-Medium versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolation wurden zuvor die Zellen in Zellkulturschalen ausplattiert. Die Isolation erfolgte mit dem *Peq GOLD Total RNA Kit* von PeqLab. Zu Beginn wurde das Kulturmedium abgesaugt und 500 µl *RNA Lysis Buffer T* auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden abgeschabt, in dem Lysepuffer aufgenommen und direkt auf die Säule einer *DNA Removing Column* gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 12000 g. Der Durchfluss wurde mit 500 µl 70 % Ethanol versetzt und auf die *Perfect Bind RNA Column* gegeben. Nach einer Zentrifugation von 10000 g für 1 min wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 500 µl *RNA Wash Buffer I* durch erneute Zentrifugation bei 10000 g für 15 sek gewaschen. Um verbliebende DNA-Kontaminationen zu entfernen wurde ein *DNase I* Verdau auf der Säule durchgeführt. Hierzu wurden auf die Säule 75 µl eines Gemisches aus 1,5 µl RNase-freier *DNase I* (20 U/µl) und 73,5 µl *DNase I Digestion Buffer* gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 400 µl *RNA Wash Buffer I* auf die Säule pipettiert und nach einer Inkubation von 5 min die Säule bei 10000 g für 5 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgte zweimal ein Waschschrift mit 600 µl *RNA Wash Buffer II* für 15 sek bei 10000 g. Die Elution der RNA erfolgte mit 55 µl RNase-freiem dH₂O. Nach einer Inkubation von 1 min wurde die RNA durch eine Zentrifugation bei 5000 g für 1 min eluiert. Die Quantifizierung der RNA-Konzentration erfolgte durch eine Messung am NanoDrop. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte ausschließlich in Form von bakteriellen Plasmiden. Je nach gewünschter Ausbeute wurde entweder eine Mini- oder eine Maxi-Präparation durchgeführt.

Mini-Präparation

Die Mini-Präparation erfolgte mit dem *NucleoSpin Plasmid* Kit von Macherey & Nagel. Hierzu wurden 5 ml einer Bakterien-Kultur bei 11000 g für 30 sek zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 250 µl A1 Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl A2 Puffer. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde durch Zugabe von 300 µl A3 Puffer die Lyse abgestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 11000 g für 10 min. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und auf eine DNA-Säule geladen. Die Säule wurde bei 11000 g für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgte ein Waschschriff mit 500 µl AW Puffer und ein zweiter mit 600 µl A4 Puffer. Im Anschluss wurde die Säule durch Zentrifugation bei 11000 g für 2 min getrocknet. Die Elution erfolgte mit 50 µl AE Puffer. Nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde die Plasmid-DNA bei 11000 g für 1 min eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop. Die Plasmid-DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation erfolgte mit dem *NucleoBond Xtra EF Plasmid* Kit von Macherey & Nagel. Hierzu wurde am Tag zuvor eine Maxi-Kultur von 300 ml mit Hilfe einer Mini-Kultur von 5 ml angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension bei 6000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 12 ml RES-EF Puffer, welcher zuvor mit RNase A supplementiert wurde, resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Die Lyse der Bakterien wurde durch Zugabe von 12 ml LYS-EF und fünfmaligen Invertieren durchgeführt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden 12 ml des NEU-EF Puffers zugegeben, das Röhrchen solange invertiert bis keine blaue Farbe mehr sichtbar war und für 5 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde die Säule mit 35 ml EQU-EF Puffer äquilibriert. Die lysierte Probe wurde durch dreimaliges Invertieren gemischt und anschließend auf die Säule gegeben. Nachdem die Probe die Säule passiert hat wurde diese mit 10 ml FIL-EF gewaschen. Im Anschluss wurde der

Filter der Säule entfernt und die Säule zunächst mit 90 ml ENDO-EF Puffer und hinterher mit 45 ml WASH-EF Puffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml ELU-EF Puffer. Zur Erhöhung der DNA-Konzentration wurde die DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol für 2 min bei RT gefällt. Der Kolben einer 30 ml Spritze wurde entfernt und ein *NucleoBond Finalizer* an die Spritze angebracht. Die gefällte DNA wurde in die Spritze gegeben und vorsichtig langsam mit dem Kolben hindurch gedrückt. Es folgte ein Waschschrift des *Finalizer* mit 4 ml 70 %igen Ethanols. Anschließend wurde der *Finalizer* durch mehrmaliges Durchdrücken von Luft getrocknet. Für die Elution wurde der *Finalizer* auf eine 1 ml Spritze gesteckt. Mit Hilfe von 600 µl TE-EF Puffer wurde die Plasmid-DNA zweimal eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei 4 °C.

2.5.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Die Umschreibung der isolierten mRNA in cDNA erfolgte mit der M-MLV reversen Transkriptase, welche aus dem murinen Retrovirus *Moloney murine leukemia virus* stammt. Die Synthese erfolgte durch Verwendung eines Oligo(dT)-Primers, welcher an die Poly(A)-Sequenz des 3'-Endes der mRNA bindet.

Es wurden 3 µg RNA in einem Ansatz von 20 µl mit RNase-freiem dH₂O verdünnt. Diese wurde für 10 min bei 70 °C im Thermocycler denaturiert. Anschließend wurden 20 µl eines Mastermix bestehend aus 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer, 3,5 µl dNTPs (10 mM/µl), 2 µl RNase-Inhibitor, 8 µl *First Strand Buffer*, 4 µl DDT (0,1 M) und 1,5 µl M-MLV reverse Transkriptase. Zusätzlich wurde für jede Versuchsreihe eine Negativkontrolle mitgeführt. Um DNA-Kontaminationen ausschließen zu können wurde ein Ansatz ohne Enzym angesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler für 90 min bei 37 °C und wurde im Anschluss für 10 min bei 90 °C abgestoppt. Bis zur Verwendung der cDNA-Proben wurden diese bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ermittlung der Nukleinsäuren-Konzentration erfolgte am NanoDrop. Für die Messung wurden 1,5 µl der eluierten RNA bzw. DNA eingesetzt. Als Referenz diente RNase-freies dH₂O beziehungsweise der Puffer in dem die DNA eluiert wurde. Die Konzentration und die Reinheit konnten anhand der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm bestimmt werden. Der Quotient von 260/280 liegt bei reiner RNA bei 2,0 und bei DNA zwischen 1,8 und 2,0.

2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) kann ein beliebiger Sequenzabschnitt spezifisch amplifiziert werden. Für die PCR-Reaktionen wurden 25 µl Ansätze nach folgendem Schema angesetzt.

2,5 µl	10x Reaktionspuffer
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	dNTPs (10 mM)
0,75 µl	<i>Forward</i> Primer (10 µM)
0,75 µl	<i>Reverse</i> Primer (10 µM)
0,15 µl	<i>HotStar Taq</i> Polymerase
16,35 µl	dH ₂ O
1 µl	DNA-template (<1 µg)

Die Oligonukleotide richteten sich jeweils nach den zu amplifizierenden Sequenzen. Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt.

Initiale Denaturierung	95 °C	15 min
------------------------	-------	--------

3-Step-Zyklus:

Denaturierung	94 °C	30 sek
<i>Annealing</i>	50 - 68 °C	60 sek
Elongation	72 °C	60 sek/kb DNA

Anzahl der Zyklen: 35

finale Elongation	72 °C	10 min
-------------------	-------	--------

Hierbei variierte die *Annealing*-Temperatur je nachdem welche Oligonukleotide verwendet wurden. Außerdem musste die Elongationszeit angepasst werden, wenn das zu erwartende Produkt größer als 1 kb war. Die Analyse der Amplifikate erfolgte durch Auftrennung von 5 - 10 µl der PCR-Produkte auf einem Agarosegel.

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in 0,8 % - 2 %-igen Agarosegelen in horizontalen Gelapparaturen, welche mit 1x TBE befüllt waren. Durch Anlegen einer Spannung von 80 - 130 Volt wanderten die negativ geladenen DNA-Moleküle zur Kathode. Die Proben wurden zuvor jeweils mit dem Ladepuffer *Orange Dye* versetzt. Neben den Proben wurden 5 µl eines geeigneten Markers aufgetragen. Nach Erreichen der Lauffront am Ende des Gels wurde der Lauf gestoppt und das Gel in ein Färbe-Bad mit Ethidiumbromid gelegt. Nach 15 - 20 min konnte die DNA mit Hilfe von UV-Licht visualisiert und das Gel am Dokumentationssystem fotografiert werden.

2.5.7 Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen

Die Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen diente der Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten bestimmter Größe. Dafür wurde das aufgetrennte Gel nach der Ethidiumbromid-Färbung mit 70 % UV-Licht bestrahlt und mit einem Einmal-Skalpell die gewünschte Bande ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean Up* Kit von Macherey & Nagel isoliert. Hierzu wurde das Gelstück zunächst gewogen. Anschließend wurden pro 100 mg 200 µl NTI Puffer zugegeben. Das Gelstück wurde im Heizblock bei 50 °C für 5 - 10 min aufgelöst und auf eine DNA-Säule gegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 11000 g für 30 sek. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule zweimal mit 700 µl NT3 Puffer und erneuter Zentrifugation gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule durch eine Zentrifugation von 11000 g und 1 min getrocknet. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 15 - 30 µl NE Puffer. Nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde die DNA bei 11000 g für 1 min von der Säule eluiert. Die Konzentration der DNA wurde am NanoDrop ermittelt.

2.5.8 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA-Proben erfolgte mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean Up* Kit von Macherey & Nagel. Zu der DNA-Probe wurde das zweifache Volumen des NTI Puffers gegeben. Im Anschluss wurde die Probe auf eine DNA-Säule pipettiert und bei 11000 g für 30 sek zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 700 µl NT3 Puffer und erneuter Zentrifugation. Die Säule wurde für 1 min bei 11000 g getrocknet. Anschließend konnte die DNA durch Zugabe von 15 - 30 µl NE Puffer eluiert werden.

Hierzu wurde nach einer Inkubation von 1 min bei RT die Säule bei 11000 g für 1 min zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am NanoDrop.

2.5.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung ermöglicht die Ermittlung der Basenabfolge einer DNA-Sequenz und wurde durch eine modifizierte Variante der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte ddNTPs verwendet, um Kettenabbrüche während der Amplifizierung hervorzurufen, welche im Anschluss im Sequenzierer gemessen und analysiert werden konnten. Die Durchführung erfolgte mit dem *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* von *Applied Biosystems*. Es wurden jeweils 10 µl Ansätze vorbereitet.

~1 µg	DNA-template
1 µl	Primer (5 µM)
1 µl	Sequenzierungspuffer
1 µl	<i>BigDye v3.1</i>
ad 10 µl	dH ₂ O

Die Sequenzierungsreaktion wurde anschließend im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt.

Initiale Denaturierung	96 °C	1 min
------------------------	-------	-------

3-Step-Zyklus:

Denaturierung	96 °C	10 sek
<i>Annealing</i>	50 °C	5 sek
Elongation	60 °C	4 min

Anzahl der Zyklen: 25

Die Reaktionsansätze wurden im Anschluss durch eine Ethanol-Fällung aufgereinigt und getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 15 µl Formamid gelöst und in dem *AbiPrism 3130 Genetic Analyzer* von *Applied Biosystems* analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm *Sequencher* von *Gene Codes*.

2.5.10 Fällung von DNA

Die Aufreinigung der Sequenzierungsreaktionen erfolgte durch eine Ethanol-Fällung. Dabei wurden die 10 µl des Sequenzierungsansatzes mit 10 µl dH₂O, 2 µl Natriumacetat (3 M, pH 5) und 55 µl Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde gevortext und für 30 min bei 18900 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen. Es folgte eine zweite Zentrifugation bei 18900 g für 15 min bei 15 °C. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Proben im Heizblock bei 55 °C getrocknet. Bis zur Sequenzierung konnten die getrockneten Proben bei -20 °C gelagert werden.

2.5.11 Klonierungsschritte

Die Klonierung ermöglicht es spezifische DNA-Fragmente in bestimmte Vektoren einzubringen. Sie setzt sich aus den Teilschritten Restriktion, Ligation und Transformation zusammen. Letzterer ist im Abschnitt 2.4 Mikrobiologische Methoden näher beschrieben.

2.5.11.1 Restriktion

Um DNA zu restringieren wurde je nach Angaben des Enzymherstellers (NEB) die gewünschte Menge DNA in einem 50 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Es folgte die Zugabe des vorgeschriebenen Puffers, möglichen Zusätzen und des Enzyms. Die Ansätze wurden im Wasserbad bei der vorgeschriebenen Temperatur üN inkubiert. Am nächsten Tag wurde die erfolgreiche Restriktion auf einem Agarosegel beurteilt und die Proben für die weitere Klonierung verwendet.

2.5.11.2 Dephosphorylierung von Vektoren

Vektoren, die mit nur einem Enzym restringiert wurden, wurden im Anschluss an ihren geschnittenen 5'-Enden dephosphoryliert um eine Religation zu verhindern. Dies sollte die Ausbeute in der nachfolgenden Ligation erhöhen. Hierzu wurden 25 µl eines Restriktionsansatzes in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit dem entsprechenden Puffer und 5 U der *Antarctic Phosphatase* (NEB) versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 5 min bei 65 °C.

2.5.11.3 Polyadenylierung von DNA-Fragmenten

Da bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten immer Polymerasen mit einer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität verwendet wurden, mussten die DNA-Fragmente für die TA-Klonierung zunächst noch am 3'-Ende mit einer *Taq* DNA Polymerase polyadenyliert werden. Hierzu wurden 15 µl DNA-Probe mit 1 µl dATP (2,5 mM), 1 µl *Taq* Polymerase, 4 µl Reaktionspuffer 10x und 19,5 µl dH₂O auf Eis versetzt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 72 °C im Thermocycler.

2.5.11.4 Ligation

Mit Hilfe der Ligation werden die Enden von einem DNA-Fragment mit den Enden eines restringierten Vektors kovalent verknüpft. Hierbei wurden 100 ng des Vektors in einem 1:3 - 1:5 Verhältnis zum DNA-Fragment verwendet. Die Ligation erfolgte entweder mit dem pGEM-T Vektor System, welches den restringierten Vektor, Reaktionspuffer und Ligase bereits mitlieferte oder mit der T4 DNA Ligase von NEB. In beiden Fällen wurden 10 µl Ansätze bestehend aus Vektor, DNA-Fragment, Reaktionspuffer und 1 µl Ligase angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei dem pGEM-T Vektor System üN bei 4 °C und bei Verwendung der T4 DNA Ligase üN bei 16 °C im Wasserbad. Um Religate ausschließen zu können, wurde immer ein Religat-Ansatz ohne DNA-Fragment mitgeführt. Am nächsten Tag wurde mit der Transformation des gesamten Ligationsansatzes fortgefahren.

2.5.12 Quantitative Echtzeit-PCR

Um die relative Expression verschiedener Gene zu bestimmen wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit Hilfe des *LightCycler 480 II* von Roche durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass spezifische Sequenzabschnitte amplifiziert werden und durch Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs, hier *SYBR Green*, quantifiziert werden können. Denn mit steigender DNA-Konzentration steigt auch die Menge an interkalierten *SYBR Green*. Der Zyklus, bei welcher das Signal signifikant den Schwellenwert übersteigt, wird *crossing point* (CP) genannt und spiegelt die exponentielle Phase der Amplifikation wieder. Der CP gibt somit Aufschluss über die cDNA-Konzentration wieder. Um eine relative Quantifizierung durchführen zu können wird bei jeder Echtzeit-PCR eine Standard-Verdünnungsreihe mitgeführt, dessen CPs als Referenz dienen. Die Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR erfolgte stets in Duplikaten mit folgendem Ansatz.

1 µl	cDNA (i.d.R. 1:20 verdünnt)
0,5 µl	<i>Forward</i> Primer (10 µM)
0,5 µl	<i>Reverse</i> Primer (10 µM)
5 µl	<i>LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix</i>
3 µl	dH ₂ O

Die Ansätze wurden in einer 96-Well-Platte pipettiert und diese im Anschluss mit einer Folie abgedeckt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in den *LightCycler 480* gelegt und folgendes Programm eingestellt. Die Bedingungen für die einzelnen Oligonukleotide sind in 2.1.9 wiederzufinden.

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
------------------------	-------	-------

3-Step-Zyklus:

Denaturierung	95 °C	5 - 10 sek
<i>Annealing</i>	60 - 66 °C	5 - 10 sek
Elongation	72 °C	1 sek

Anzahl der Zyklen: 40 - 45

Schmelzpunktanalyse	65 - 95 °C	je 5 sek / °C
---------------------	------------	---------------

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem amplifizierten Produkt auch um das Richtige handelt und keine Nebenprodukte entstanden sind, wurde im Anschluss der Amplifikation eine Schmelzpunktanalyse von dem *LightCycler 480* durchgeführt. Des Weiteren wurde bei der Etablierung von neuen Primer-Paaren zur weiteren Überprüfung das Produkt auf einem Agarosegel analysiert.

2.5.13 RNA-Seq

Die RNA-Sequenzierung ist eine Methode zur Bestimmung des gesamten Transkriptoms der Zelle. Dadurch ist eine Analyse aller funktional aktiven Elemente des Genoms möglich. Hierbei wird die zu untersuchende mRNA zunächst über magnetische *Beads* von anderen RNAs getrennt, um im Anschluss die mRNA in cDNA umzuschreiben. In weiteren Schritten wird die cDNA fragmentiert und an den Enden mit Adaptoren ligiert. Anschließend kann eine Sequenzierung durchgeführt werden. Die resultierenden

Reads werden mit Hilfe verschiedener bioinformatischer Programme analysiert und Referenzgenomen zugeordnet. Die RNA-Sequenzierung, *library preparation* sowie die bioinformatische Auswertung wurde von der Firma Star SEQ GmbH (Mainz) durchgeführt. Es wurden hierzu 3 µg isolierte RNA an die Firma auf Trockeneis gegeben.

2.6 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Migrations-, Adhäsions-, Viabilitäts- und Proliferationsanalysen wurden jeweils im 4-fach-Ansatz erstellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel und IBM-SPSS *Statistics 23*. Signifikante Unterschiede wurden mit einem *Student's T-test* ermittelt. Signifikanzen in der Analyse der Gewebeprobe wurden mittels des *Mann-Whitney U-test* analysiert. Überlebensanalysen wurden durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und die Signifikanzen über einen Log-Rank-Test erfasst. Bivariate Korrelationen wurden mittels Spearman-Rho-Analyse beurteilt. Statistische Signifikanzen wurden bei einem P-Wert von $< 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von PTEN- Δ auf Proteinebene

Die zehn Splice-Varianten von PTEN wurden von Sharrard *et al.* sowie von Agrawal *et al.* identifiziert. Sie wurden von ihnen in verschiedenen Geweben auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Agrawal *et al.*, 2005; Sharrard & Maitland, 2000). Ob auch eine Expression auf Proteinebene bei den Splice-Varianten stattfindet war daher nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht in wie weit die Splice-Variante PTEN- Δ von Zellen auf Proteinebene exprimiert wird. Dies wurde im Westernblot unter Verwendung des Protein-Tags V5, welcher N-terminal an das Protein fusioniert wurde, analysiert. Als Positivkontrollen fungierten in einer *in vitro* Translation (IVT) hergestellte PTEN-V5 bzw. PTEN- Δ -V5 Fusionsproteine. Die transgenen 786-O-Zellen zeigten sowohl für PTEN-V5 als auch für PTEN- Δ -V5 eine Expression auf Proteinebene, welche mit Hilfe eines Anti-V5 Antikörpers nachgewiesen wurde. Diese lag auf gleicher Höhe der IVT-hergestellten Fusionsproteine (Abbildung 14).

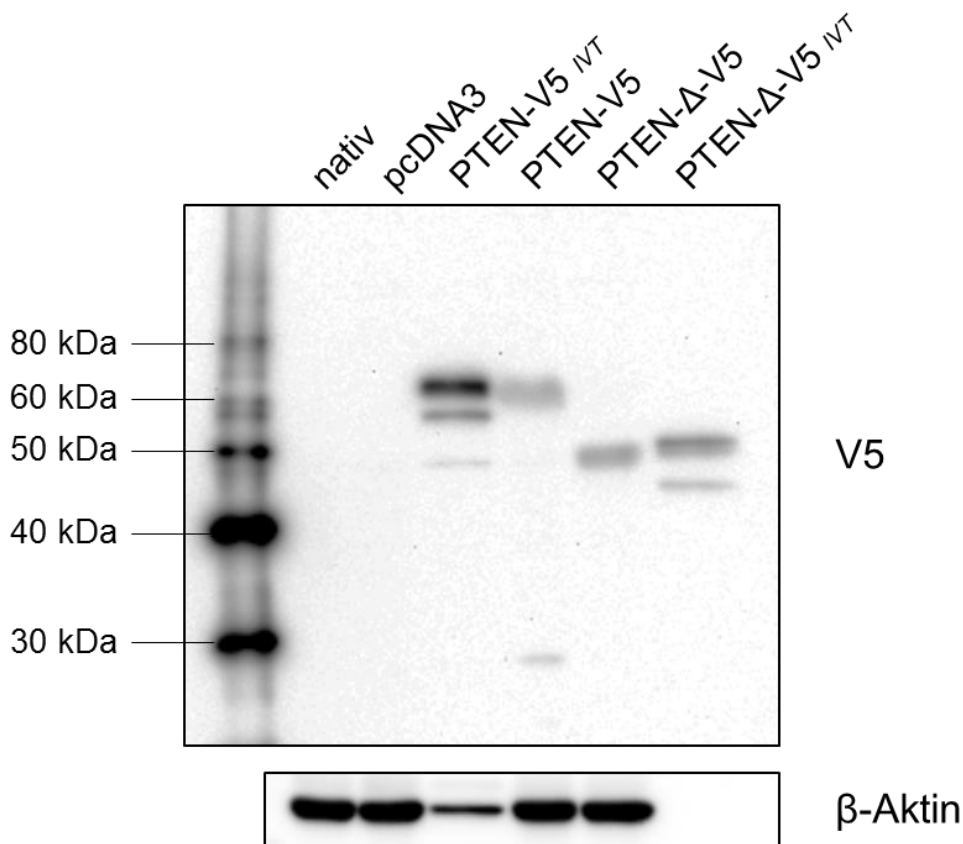


Abbildung 14: Nachweis der Expression von den V5-getaggten PTEN und PTEN- Δ in den transgenen 786-O-Zellen. Als Negativkontrolle wurden Proteinextrakte von nativen und Leervektor (pcDNA3)-transfizierten 786-O-Zellen aufgetragen. Die in einer *in vitro* Translation (IVT) hergestellten V5-getaggten Proteine PTEN-V5 und PTEN- Δ -V5 dienen als Positivkontrolle. Als Ladekontrolle wurde nach Detektion mit einem Anti-V5 Antikörper β -Aktin auf dem Blot detektiert.

3.2 Expression von PTEN- Δ in den transgenen Zellen

Die Analyse der Bedeutung von PTEN- Δ für die Tumorprogression des Nierenzellkarzinoms sollte *in vitro* in den zwei NZK-Zelllinien 786-O und A498 erfolgen. Um einen Vergleich zwischen PTEN und der Splice-Variante PTEN- Δ in den nachfolgenden funktionellen Assays vollziehen zu können, wurden sowohl PTEN als auch PTEN- Δ -überexprimierende Zellen generiert. Während die Zelllinie 786-O eine *Nonsense*-Mutation im PTEN-Gen aufweist, exprimiert die Zelllinie A498 PTEN endogen. Nach der Transfektion und klonalen Selektion der transgenen Zellen wurde die erfolgreiche Expression von PTEN bzw. PTEN- Δ in einer Block-PCR nachgewiesen. Es konnten für die Zelllinie 786-O jeweils vier Klone generiert werden (Abbildung 15, Abbildung 16).

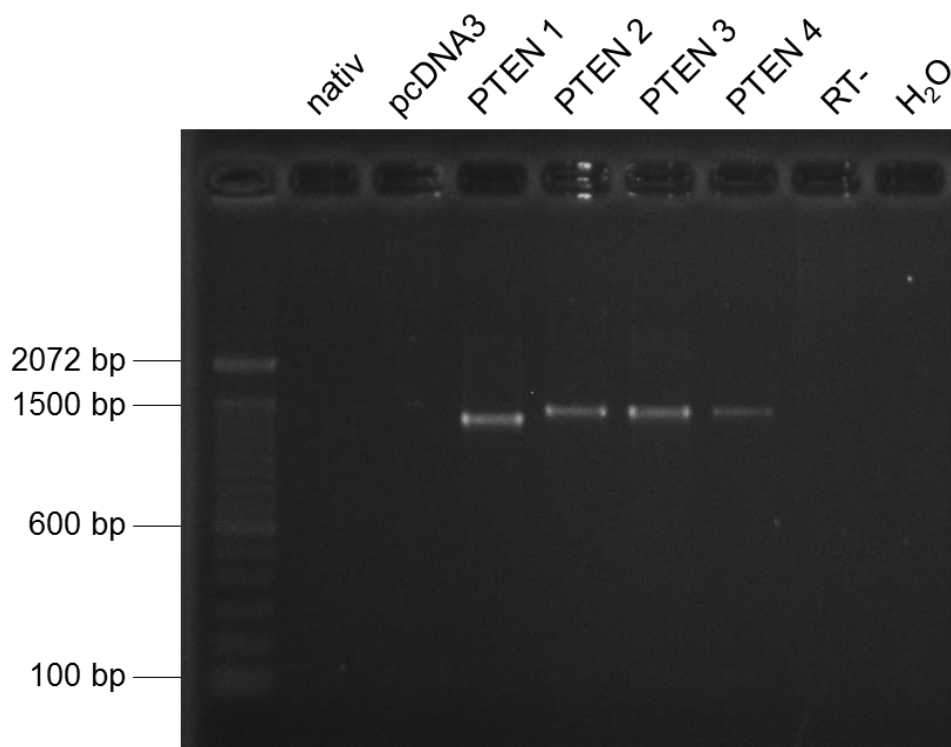


Abbildung 15: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von PTEN in 786-O-Zellen. Der Nachweis erfolgte durch Verwendung der Oligonukleotide T7 *Forward* und PTENq *Reverse*. Als Kontrollen wurden native 786-O-Zellen, Leervektor-transfizierte (pcDNA3)-Zellen und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT-) mitgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel mit einem 100 bp Marker aufgetrennt.

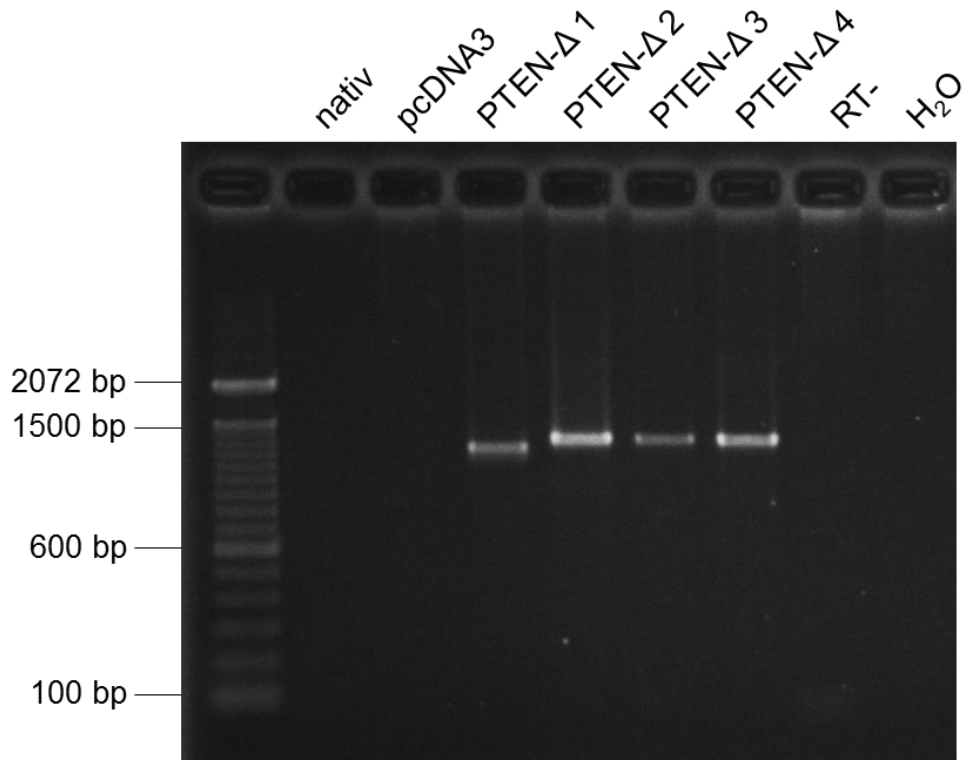


Abbildung 16: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von PTEN- Δ in 786-O-Zellen. Der Nachweis erfolgte durch Verwendung der Oligonukleotide T7 *Forward* und PTEN- Δ 2 *Reverse*. Als Kontrollen wurden native 786-O-Zellen, Leervektor-transfizierte (pcDNA3)-Zellen und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT-) mitgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel mit einem 100 bp Marker aufgetrennt.

Die Expression der transgenen PTEN und PTEN- Δ 786-O-Zellen wurde im Anschluss mittels einer quantitativen PCR untersucht. Die Klone der Zelllinie 786-O zeigten alle eine Steigerung der Expression. Die stärkste Überexpression zeigten die PTEN 3 Zellen mit einer 6,7-fachen Steigerung im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Die übrigen Klone zeigten eine 4-fache Steigerung der Expression bei PTEN 1, eine 2,9-fache Steigerung bei PTEN 2 und eine 2,3-fache Expressionssteigerung bei PTEN 4 (Abbildung 17). Die Überexpressionen bei den PTEN- Δ -Klonen waren deutlich stärker. Es konnte eine 135-fache Steigerung bei PTEN- Δ 1, eine 28-fache Steigerung bei PTEN- Δ 2, eine 11-fache Steigerung bei PTEN- Δ 3 und eine 34-fache Steigerung bei PTEN- Δ 4 im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 18).

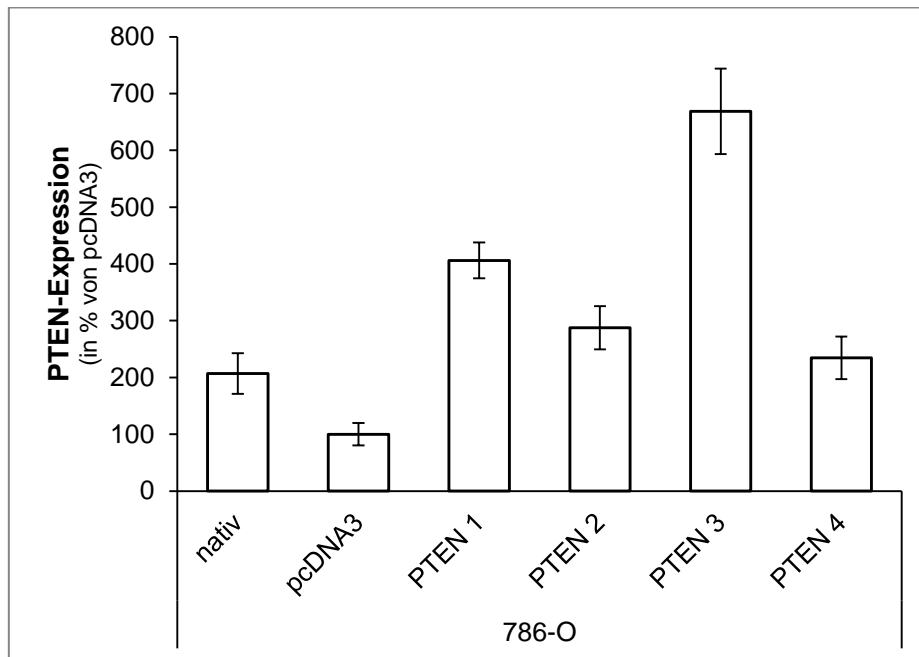


Abbildung 17: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN in den transgenen 786-O-Zellen. Dargestellt ist die PTEN-Expression der transgenen Klone bezogen auf die Expression der pcDNA3-Zellen. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Angegeben sind die auf die Haushaltsgene PDH und HPRT normalisierten Expressionen und der Fortpflanzungsfehler.

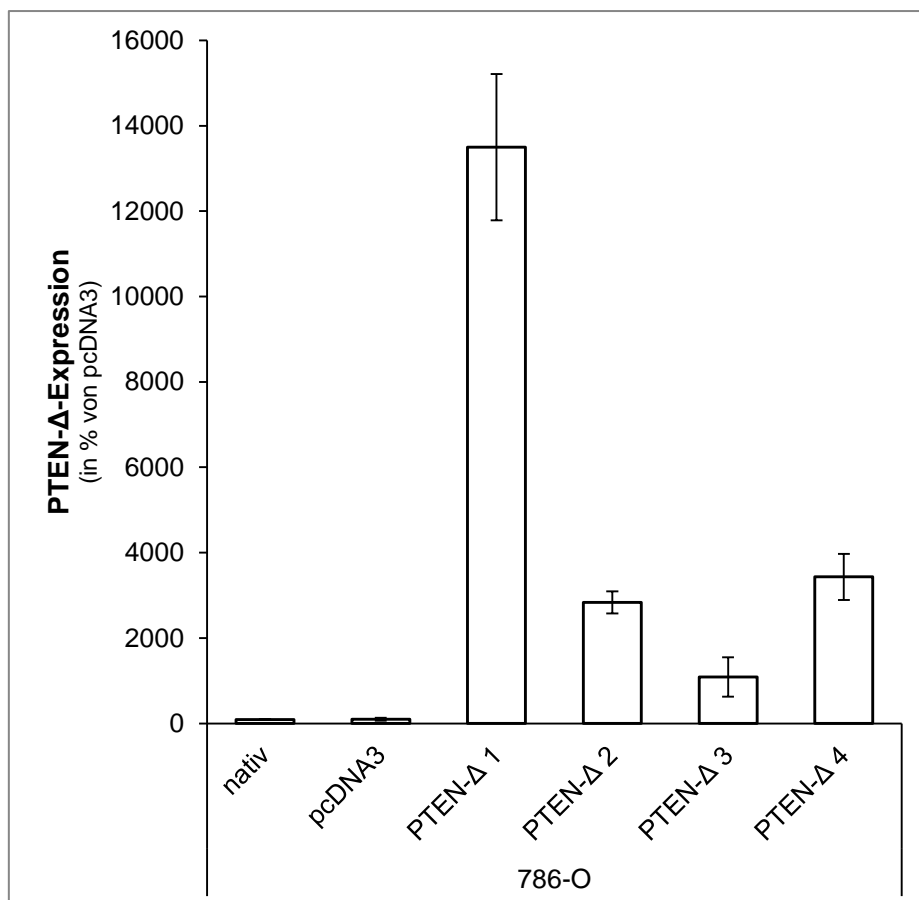


Abbildung 18: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN-Δ in den transgenen 786-O-Zellen. Dargestellt ist die PTEN-Δ-Expression der transgenen Klone bezogen auf die Expression der pcDNA3-Zellen. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Angegeben sind die auf die Haushaltsgene B2M und TBP normalisierten Expressionen und der Fortpflanzungsfehler.

Neben der Zelllinie 786-O wurden die Zellen der Zelllinie A498 mit PTEN und PTEN- Δ transfiziert und klonal selektioniert. Nach erfolgreicher Selektion wurden die generierten Klone in einer Block-PCR analysiert (Abbildung 19). Insgesamt konnte für die Zelllinie A498 ein PTEN-Klon sowie drei PTEN- Δ -Klone generiert werden.

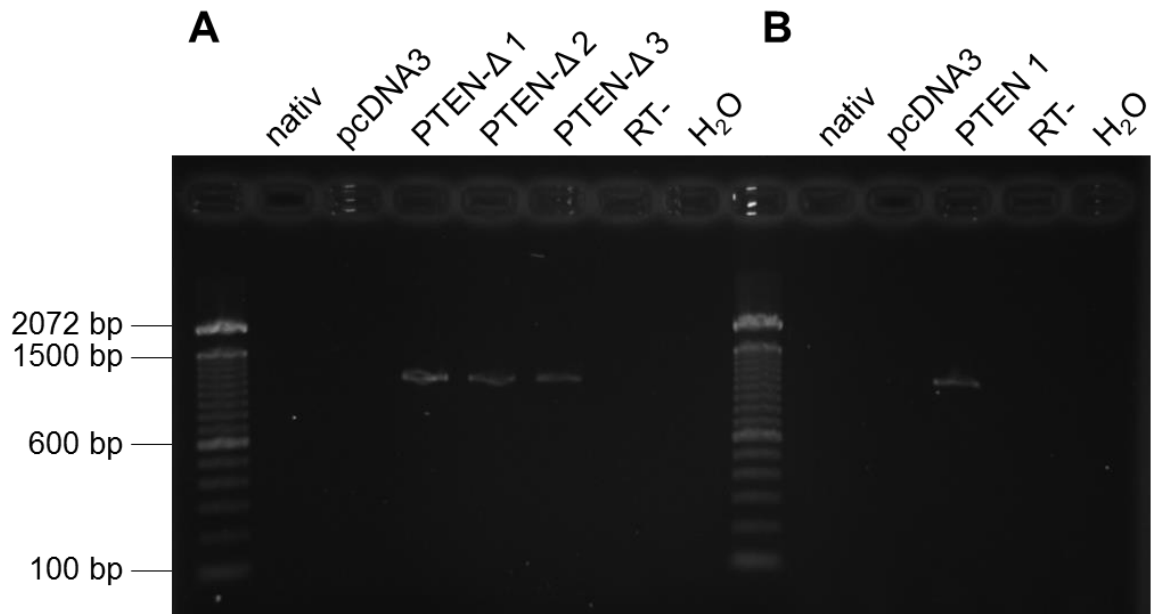


Abbildung 19: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von PTEN (B) und PTEN- Δ (A) in A498-Zellen. Der Nachweis erfolgte durch Verwendung der Oligonukleotide T7 *Forward* und PTEN- Δ 2 *Reverse* (A) oder PTENq *Reverse* (B). Als Kontrollen wurden native 786-O-Zellen, Leervektor-transfizierte (pcDNA3)-Zellen und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT-) mitgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel mit einem 100 bp Marker aufgetrennt.

Die positiven Klone der Block-PCR wurden im Anschluss in einer qPCR quantifiziert. Für den PTEN 1-Klon der A498-Zellen konnte eine 1,4-fache Überexpression nachgewiesen werden (Abbildung 20). Die transgenen PTEN- Δ A498-Zellen wiesen ebenfalls alle eine Überexpression auf. In den PTEN- Δ 1-Zellen kam es zu einer 5,9-fachen Steigerung der Expression. Die Expression bei PTEN- Δ 2 war 2,2-fach erhöht und bei den PTEN- Δ 3-Zellen zeigte sich eine 1,2-fache Steigerung der PTEN- Δ -Expression (Abbildung 21).

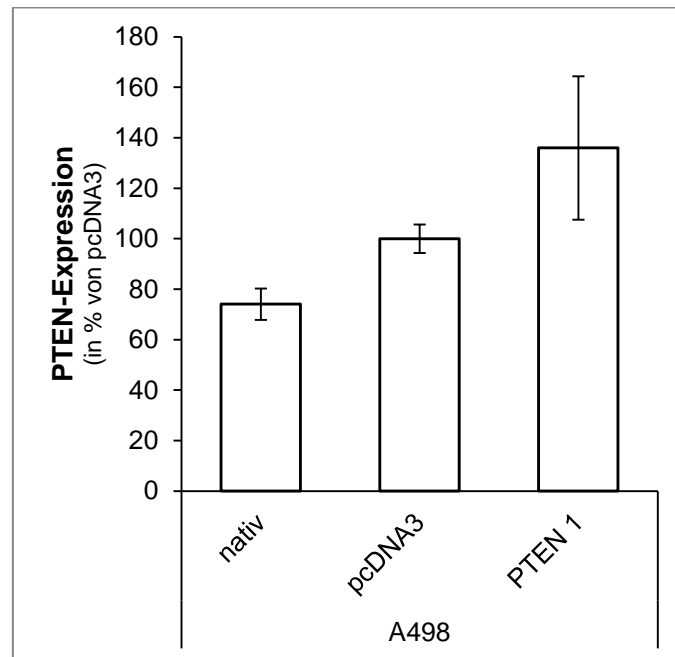


Abbildung 20: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN in den transgenen A498-Zellen. Dargestellt ist die PTEN-Expression der transgenen Klone bezogen auf die Expression der pcDNA3-Zellen. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Angegeben sind die auf die Haushaltsgene B2M und HPRT normalisierten Expressionen und der Fortpflanzungsfehler.

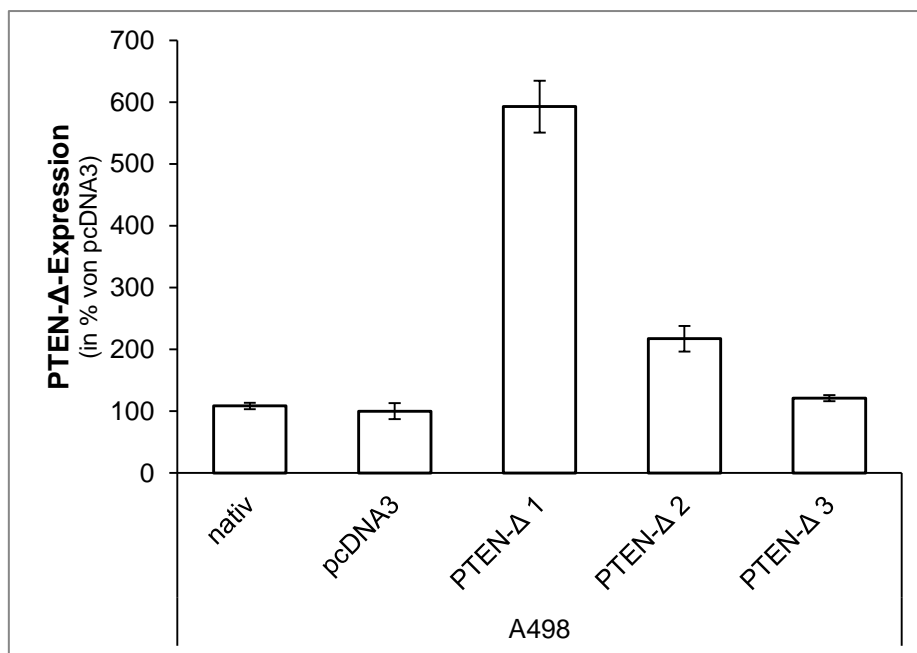


Abbildung 21: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN-Δ in den transgenen A498-Zellen. Dargestellt ist die PTEN-Δ-Expression der transgenen Klone bezogen auf die Expression der pcDNA3-Zellen. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Angegeben sind die auf die Haushaltsgene B2M und HPRT normalisierten Expressionen und der Fortpflanzungsfehler.

Die nachfolgenden funktionellen Assays und Analysen wurden für die Zelllinie 786-O jeweils mit den vier PTEN- bzw. PTEN-Δ-Klonen und für die Zelllinie A498 jeweils mit dem einen PTEN- und den drei PTEN-Δ-Klonen sowie mit nativen und Leervektor-transfizierten (pcDNA3)-Zellen durchgeführt.

3.3 Bedeutung von PTEN- Δ für die Prozesse der Tumorprogression

3.3.1 Einfluss von PTEN- Δ auf die chemotaktische Migration

Migrationsprozesse spielen bei der Tumorprogression, insbesondere bei der Dissemination der Tumorzellen und Entwicklung von Metastasen, eine wichtige Rolle. Das chemotaktische Migrationspotential in Richtung der Extrazellulär-Matrix-Komponenten Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Kollagen I und IV wurde in einer Boyden-Migrationskammer für die transgenen PTEN- Δ - sowie PTEN-Klone der Zelllinien 786-O und A498 analysiert. Als Vergleich wurden native Zellen sowie Leervektor-transfizierte Zellen (pcDNA3) mitgeführt.

Die Migration in Richtung Fibronectin war bei den transgenen Zellen der Zelllinie 786-O sowohl bei PTEN als auch bei PTEN- Δ im Vergleich zu den nativen und den pcDNA3-transfizierten Zellen erniedrigt. Eine signifikante Reduktion des Migrationspotentials konnte bei PTEN 1 auf 54 % ($p = 0,007$) und bei PTEN 4 auf 49 % ($p = 0,005$) festgestellt werden. Bei den zwei weiteren PTEN-Klonen 2 und 3 war die Migration ebenfalls verringert auf 77 % und 76 %. Bei den PTEN- Δ -transgenen 786-O Zellen war die Migration in Richtung Fibronectin ähnlich stark reduziert. Bei PTEN- Δ 1 kam es zu einer Reduktion auf 61 % ($p = 0,013$), bei PTEN- Δ 2 auf 62 % ($p = 0,003$) und bei PTEN- Δ 3 auf 49 % ($p < 0,001$). Lediglich bei den PTEN- Δ 4-Zellen erfolgte nur eine leichte Reduktion auf 86 %. Die nativen 786-O-Zellen wiesen ein ähnliches Migrationsverhalten wie die pcDNA3-Zellen auf (Abbildung 22).

Das Migrationspotential in Richtung Fibronectin der transgenen A498-Zellen, welche endogen PTEN exprimieren, zeigte bei den PTEN- Δ -Klonen eine starke Reduktion. Bei PTEN- Δ 1 kam es zu einer Reduktion auf 34 % ($p = 0,001$), bei PTEN- Δ 2 auf 56 % ($p = 0,036$) und bei PTEN- Δ 3 auf 40 % ($p = 0,016$). Dagegen zeigte sich in den transgenen PTEN 1 A498-Zellen kein eindeutiger Effekt. Es kam zu einer leicht erhöhten Migration um 15 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Die nativen A498-Zellen wiesen ebenfalls eine leichte Erhöhung des Migrationspotentials auf (Abbildung 23).

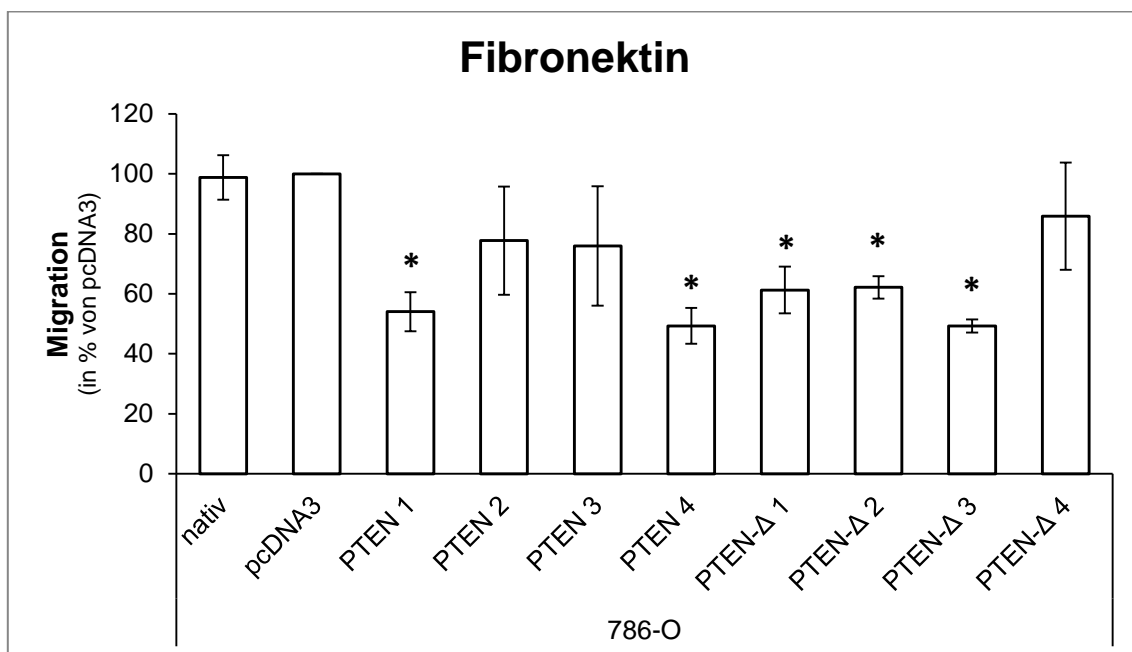


Abbildung 22: Migration der PTEN- und PTEN-Δ-Klone in Richtung Fibronectin der Zelllinie 786-O. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Fibronectin verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

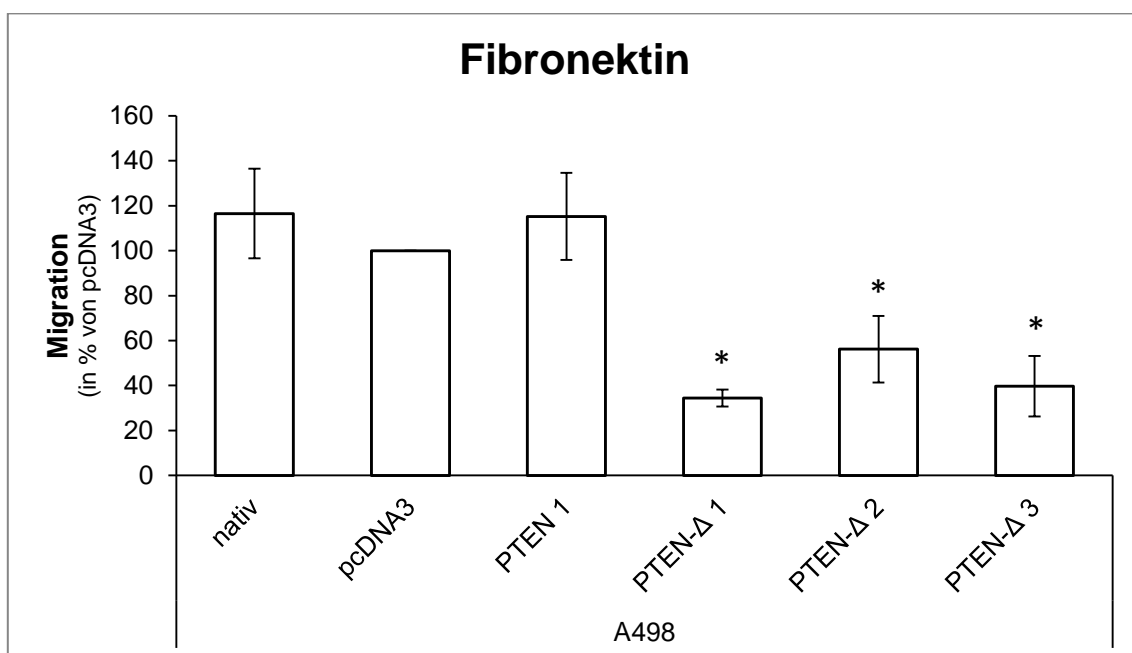


Abbildung 23: Migration der PTEN- und PTEN-Δ-Klone in Richtung Fibronectin der Zelllinie A498. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Fibronectin verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Neben Fibronectin spielt auch Vitronectin als EZM-Komponente eine wichtige Rolle in zellulären Adhäsions- und Migrationsprozessen. Die Untersuchung der Migration in

Richtung von Vitronektin zeigte ein ähnliches Bild zu Fibronektin in den transgenen 786-O-Zellen. Die PTEN-Klone der 786-O-Zellen wiesen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen ein reduziertes Migrationspotential auf. Bei PTEN 1 erfolgte eine Reduktion auf 60 % ($p = 0,023$), bei PTEN 2 auf 71 % ($p < 0,001$), bei PTEN 3 auf 86 % und bei PTEN 4 auf 55 % ($p < 0,001$). Im Vergleich dazu zeigten die PTEN- Δ -Klone eine noch stärkere Reduktion der Migration. Hier kam es zu einer Reduktion auf 54 % ($p = 0,009$) bei PTEN- Δ 1, auf 55 % ($p = 0,015$) bei PTEN- Δ 2, auf 56 % ($p = 0,004$) bei PTEN- Δ 3 sowie auf 68 % bei PTEN- Δ 4. Die nativen 786-O-Zellen wiesen ein ähnliches Migrationspotential wie die pcDNA3-Zellen auf (Abbildung 24).

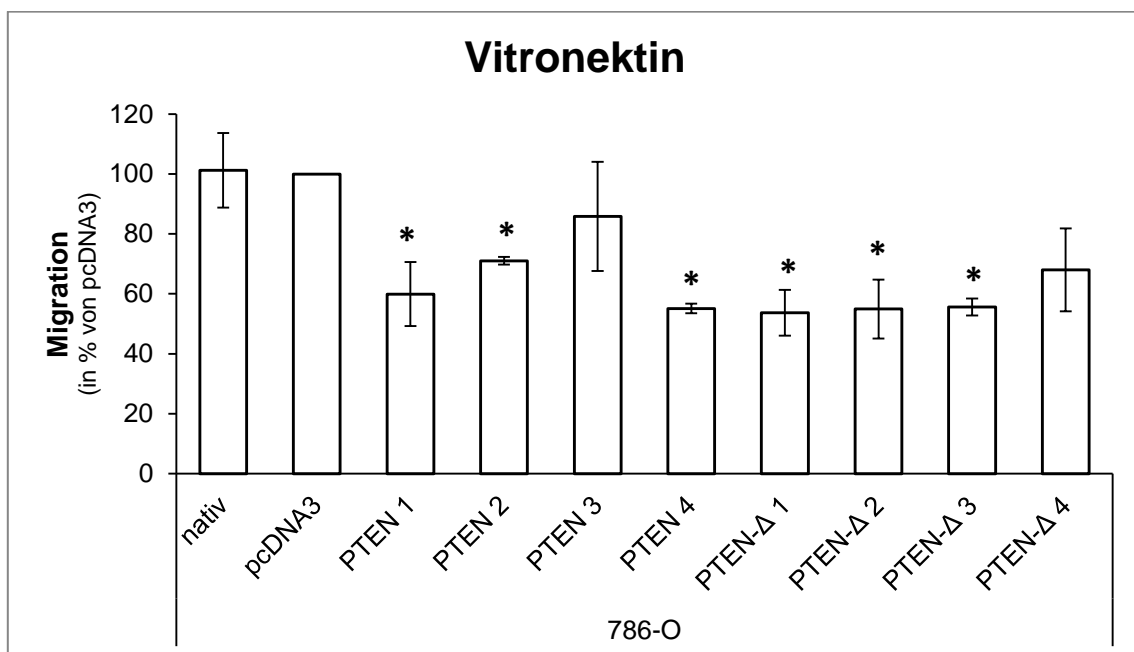


Abbildung 24: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Vitronektin der Zelllinie 786-O. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Vitronektin verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Migrationsverhalten der A498-Zellen in Richtung Vitronektin war in allen transgenen Klonen reduziert. Die nativen A498-Zellen zeigten im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen eine leicht erhöhte Migration auf. Bei den PTEN 1-Zellen kam es zu einer leichten Reduktion des Migrationspotentials auf 75 %. Die Reduktion der Migration bei den PTEN- Δ -Klonen war im Vergleich zu den 786-O-Zellen deutlich stärker. In den PTEN- Δ 1-Zellen kam es zu einer Erniedrigung auf 34 % ($p = 0,004$), den PTEN- Δ 2-Zellen auf 58 % ($p = 0,023$) und in den PTEN- Δ 3 war die Migration auf 46 % ($p = 0,024$) verringert (Abbildung 25).

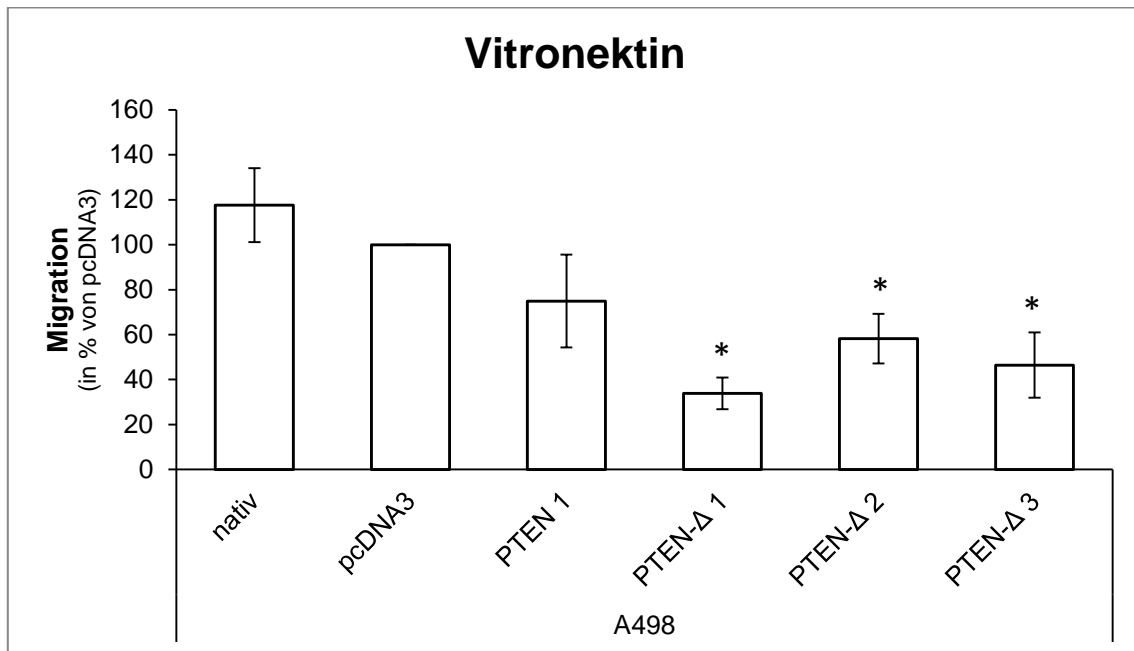


Abbildung 25: Migration der PTEN- und PTEN-Δ-Klone in Richtung Vitronektin der Zelllinie A498. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Vitronektin verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die EZM-Komponente Laminin induzierte ähnlich wie Fibronektin und Vitronektin ein reduziertes Migrationsverhalten in den transgenen PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie 786-O. Während die nativen Zellen nahezu kein Unterschied zu den pcDNA3-Zellen aufwiesen, kam es bei PTEN 1 und PTEN 3 zu einer starken Reduktion auf 18 % ($p < 0,001$). Die weiteren zwei PTEN-Klone zeigten eine verringerte Migration auf 58 % ($p = 0,01$) bei PTEN 2 sowie auf 54 % ($p = 0,004$) bei PTEN 4. In den transgenen PTEN-Δ-Zellen kam es ebenfalls zu einem reduzierten Migrationspotential. PTEN-Δ 1 wies eine Reduktion auf 44 % ($p = 0,004$), PTEN-Δ 2 auf 52 % ($p = 0,013$), PTEN-Δ 3 auf 45 % ($p < 0,001$) und PTEN-Δ 4 auf 61 % ($p = 0,008$) auf (Abbildung 26).

Die Migration in Richtung Laminin war bei den nativen A498-Zellen sowie bei den PTEN 1-Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen der Zelllinie A498 um etwa 30 % erhöht. Dagegen zeigten die PTEN-Δ-Klone eine starke Reduktion des Migrationspotentials. In den PTEN-Δ 1-Zellen kam es zu einem Absinken des Migrationsverhaltens auf 36 % ($p = 0,013$). Die PTEN-Δ 2-Zellen wiesen eine Reduktion auf 52 % ($p = 0,039$) auf und die PTEN-Δ 3-Zellen auf 15 % ($p = 0,003$) auf (Abbildung 27).

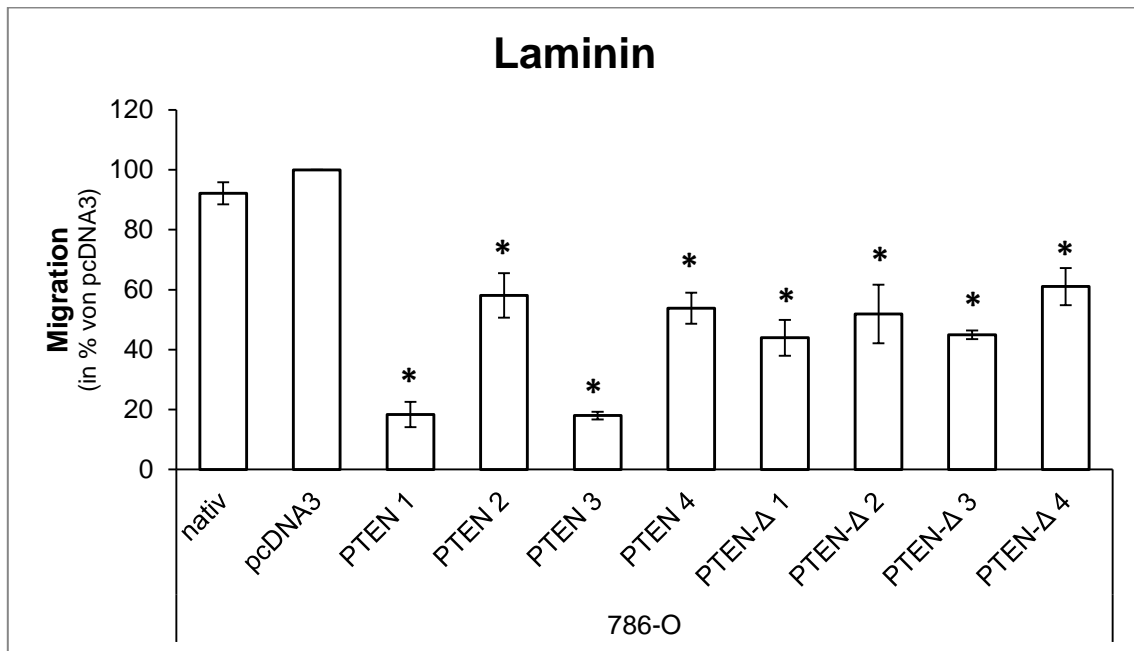


Abbildung 26: Migration der PTEN- und PTEN-Δ-Klone in Richtung Laminin der Zelllinie 786-O. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Laminin verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

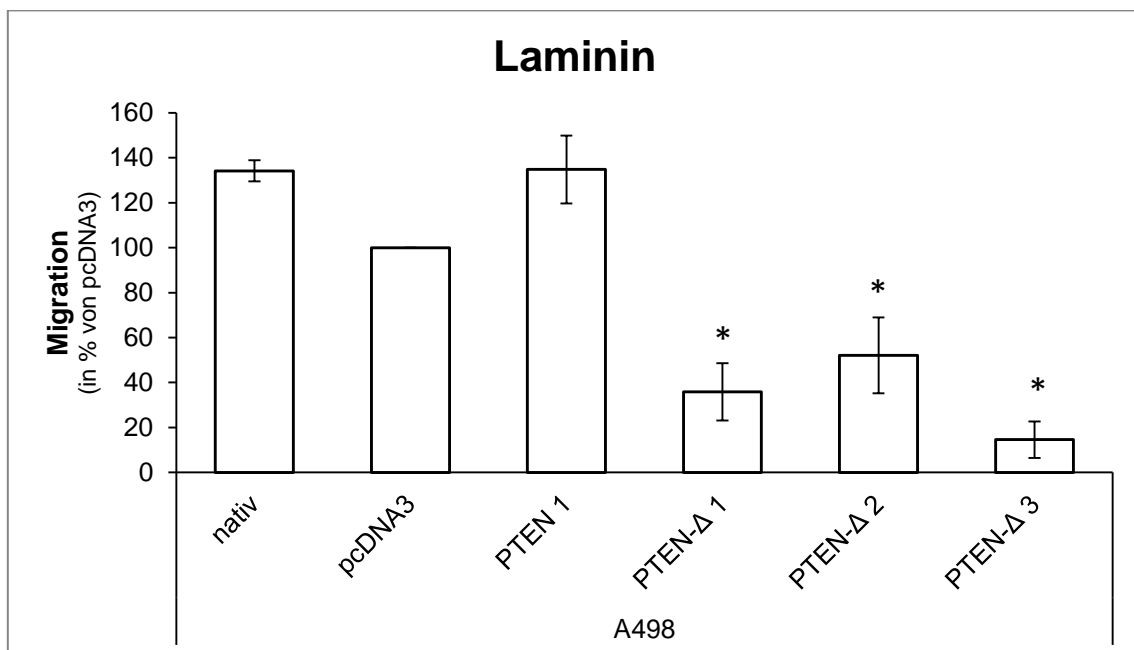


Abbildung 27: Migration der PTEN- und PTEN-Δ-Klone in Richtung Laminin der Zelllinie A498. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Laminin verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Neben den bereits untersuchten EZM-Komponenten spielen die Kollagene ebenso eine wichtige Rolle in der Regulierung und Induktion von zellulären Prozessen, welche

die Tumorprogression beeinflussen können. Daher wurde das Migrationsverhalten der transgenen Zellen in Richtung von Kollagen I und IV bestimmt. Die transgenen PTEN- und PTEN- Δ -Klone der 786-O-Zellen wiesen alle eine reduzierte Migration in Richtung von Kollagen I im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. In den PTEN-Klonen kam es zu einer Reduktion auf 53 % ($p = 0,022$) bei PTEN 1, auf 71 % ($p = 0,024$) bei PTEN 2, auf 52 % ($p = 0,009$) bei PTEN 3 sowie auf 63 % ($p = 0,022$) bei PTEN 4. Das reduzierte Migrationsverhalten der PTEN- Δ -Klone war relativ ähnlich zu den PTEN-Klonen. Es erfolgte eine Verringerung der Migration auf 54 % ($p = 0,002$) bei PTEN- Δ 1, auf 59 % ($p = 0,027$) bei PTEN- Δ 2, auf 57 % ($p = 0,001$) bei PTEN- Δ 3 sowie auf 61 % ($p = 0,003$) bei PTEN- Δ 4. Die nativen 786-O-Zellen zeigten im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen nur eine geringe Reduktion der Migration (Abbildung 28).

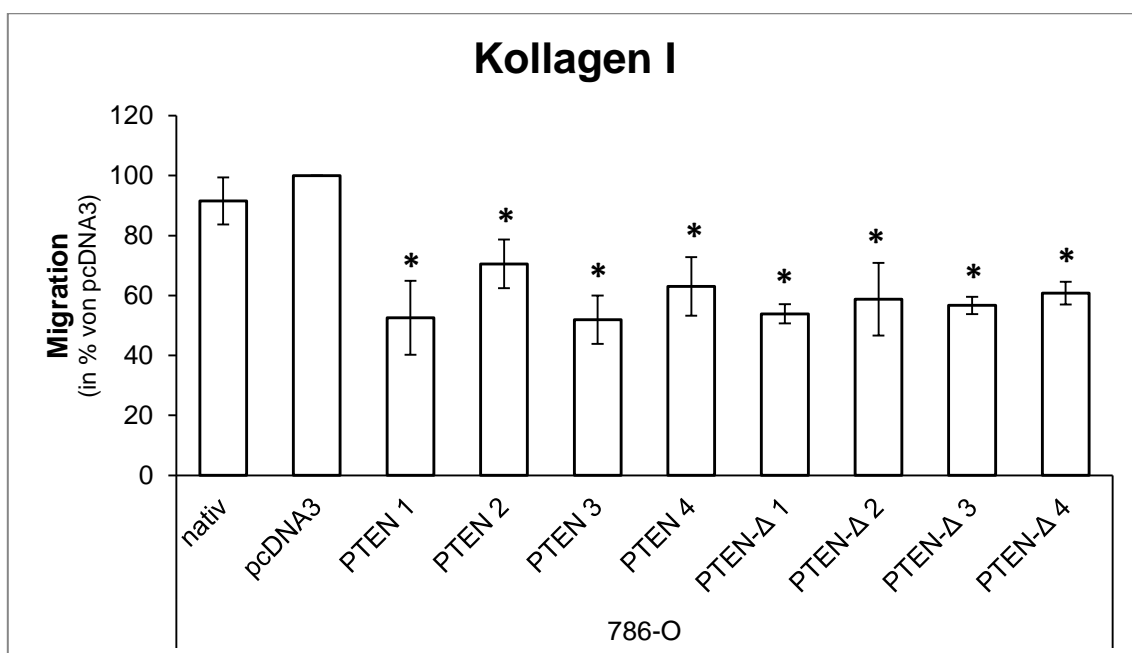


Abbildung 28: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Kollagen I der Zelllinie 786-O. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Kollagen I verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Migrationsverhalten der transgenen A498-Zellen in Richtung Kollagen I wies ein ähnliches Bild wie die anderen EZM-Komponenten auf. Die nativen A498-Zellen und die PTEN 1-Zellen zeigten beide ein höheres Migrationspotential, wobei die Steigerung in den nativen Zellen mit einer Erhöhung von 32 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen am höchsten war. In allen drei PTEN- Δ -Klonen konnte eine reduzierte

Migration nachgewiesen werden. Die PTEN- Δ 1-Zellen wiesen die stärkste Reduktion der Migration mit einer Verringerung auf 56 % ($p = 0,001$) auf. Bei den PTEN- Δ 2-Zellen zeigte sich eine Reduktion auf 80 % ($p = 0,02$) und bei PTEN- Δ 3-Zellen auf 64 % ($p = 0,002$) im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 29).

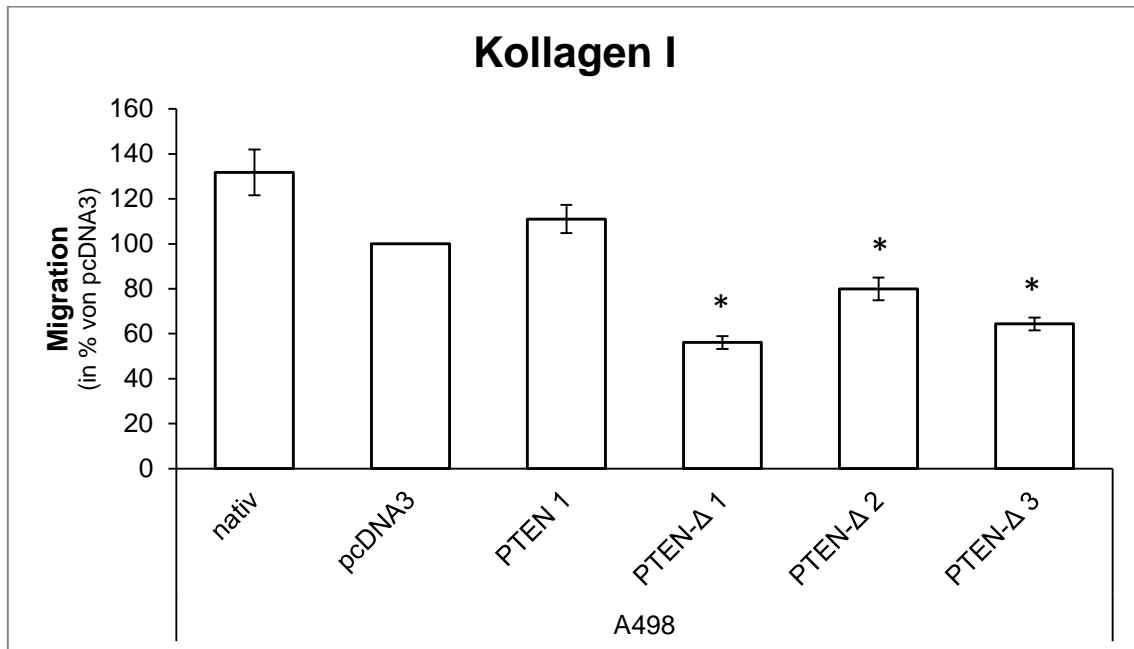


Abbildung 29: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Kollagen I der Zelllinie A498. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Kollagen I verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die EZM-Komponente Kollagen IV induzierte bei Verwendung als Chemotaxin in Migrationsversuchen ein reduziertes Migrationsverhalten sowohl in den PTEN- als auch in den PTEN- Δ -Klonen. In den transgenen PTEN 786-O-Zellen kam es zu einer Reduktion der Migration auf 56 % ($p = 0,01$) bei PTEN 1, auf 65 % ($p = 0,016$) bei PTEN 2, auf 44 % ($p = 0,009$) bei PTEN 3 und auf 66 % ($p = 0,024$) bei PTEN 4. Das reduzierte Migrationspotential in den PTEN- Δ -Klonen war ähnlich stark. Die Verringerung der Migration lag bei PTEN- Δ 1 bei 50 % ($p = 0,005$), bei PTEN- Δ 2 bei 52 % ($p = 0,019$), bei PTEN- Δ 3 bei 46 % ($p = 0,005$) und bei PTEN- Δ 4 bei 54 % ($p = 0,002$). Die nativen 786-O-Zellen zeigten im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen eine leichte Reduktion der Migration (Abbildung 30).

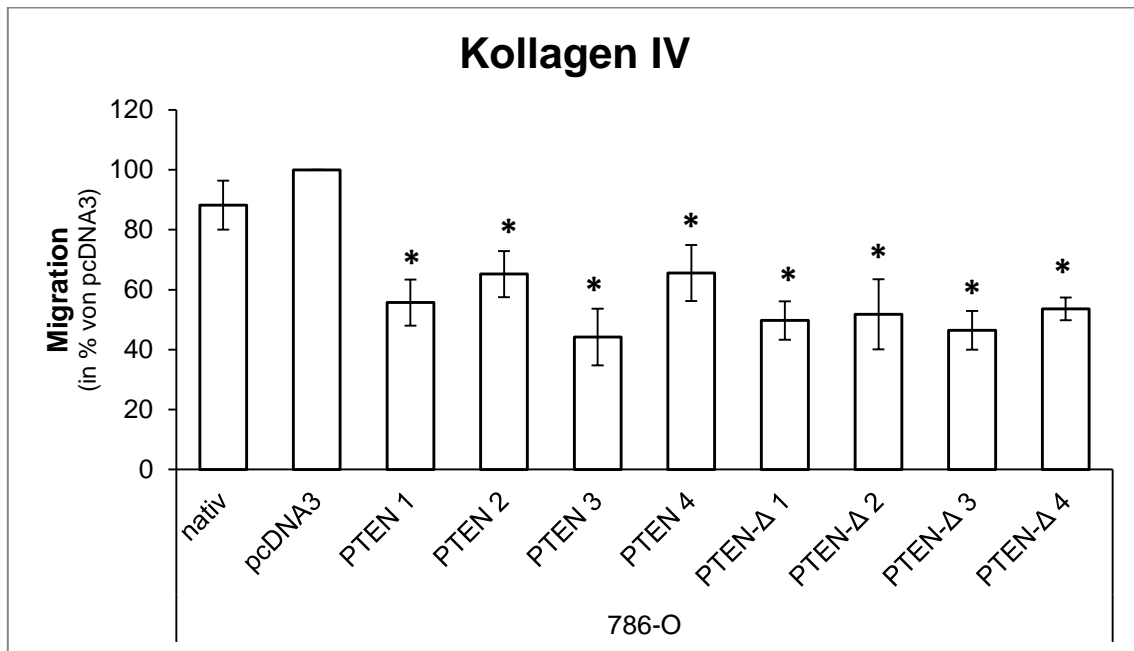


Abbildung 30: Migration der PTEN- und PTEN-Δ-Klone in Richtung Kollagen IV der Zelllinie 786-O. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Kollagen IV verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die transgenen A498-Zellen zeigten bei der Migration in Richtung Kollagen IV ein ähnliches Migrationsverhalten wie zuvor bei den bereits untersuchten EZM-Komponenten. Die nativen A498-Zellen und die PTEN 1-Zellen wiesen eine leicht höhere Migration im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. Dagegen zeigten die PTEN-Δ-Klone eine starke Reduktion der Migration in Richtung Kollagen IV. Bei PTEN-Δ 1 kam es zu einer Verringerung des Migrationspotentials auf 48 % ($p < 0,001$), bei PTEN-Δ 2 auf 77 % ($p = 0,006$) und bei PTEN-Δ 3 war die Migration auf 52 % ($p = 0,002$) reduziert (Abbildung 31).

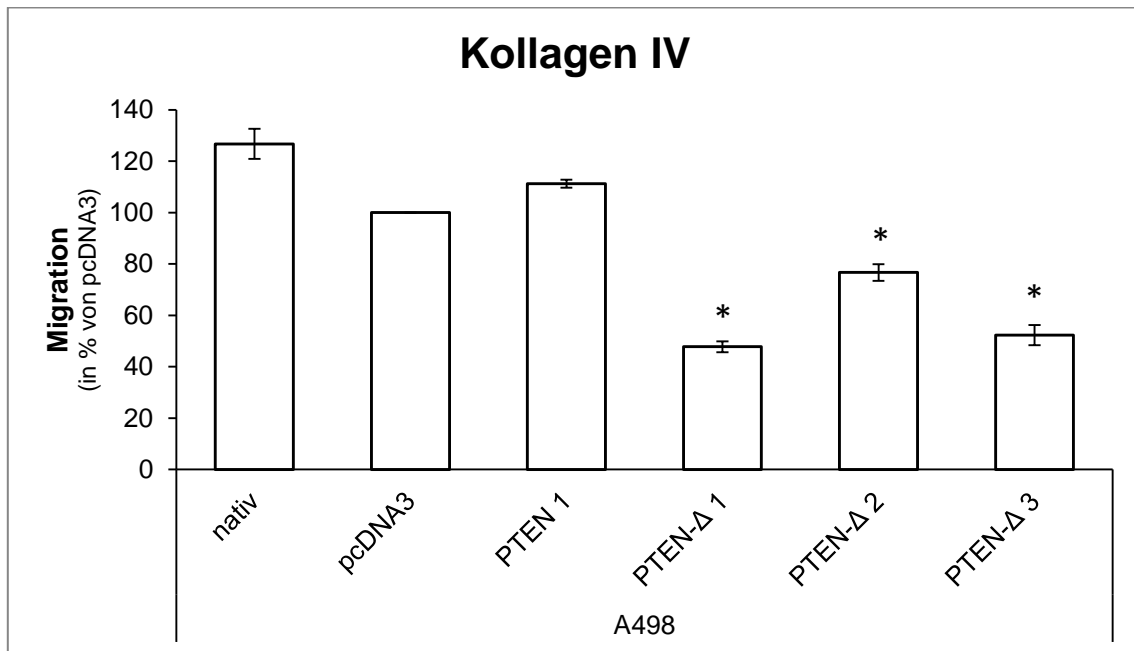


Abbildung 31: Migration der PTEN- und PTEN-Δ-Klone in Richtung Kollagen IV der Zelllinie A498. Das Migrationspotential der Zellen wurde über 16 h in einer Boyden-Migrationskammer ermittelt. Als Chemotaxin wurde Kollagen IV verwendet. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Migration der transgenen 786-O-Zellen zeigte für alle untersuchten EZM-Komponenten eine Reduktion im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Fasst man die Werte der einzelnen Klone zusammen zeigt sich, dass die Migration in Richtung Fibronectin zu einer Reduktion auf 64 % ($p = 0,017$) bei PTEN und auf 65 % ($p = 0,019$) bei PTEN-Δ führt. Bei dem Chemotaxin Vitronectin kam es zu einer Reduktion auf 68 % ($p = 0,018$) bei PTEN und auf 58 % ($p = 0,001$) bei PTEN-Δ. Ebenso induzierten die Chemotaxine Laminin (PTEN: 37 %, $p = 0,01$; PTEN-Δ: 50 %, $p = 0,001$), Kollagen I (PTEN: 60 %, $p = 0,002$; PTEN-Δ: 58 %, $p < 0,001$) und Kollagen IV (PTEN: 58 %, $p = 0,004$; PTEN-Δ: 50 %, $p < 0,001$) eine signifikante Reduktion des Migrationspotentials in den transgenen Zellen (Abbildung 32). Bei den transgenen A498-Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild für PTEN-Δ, jedoch nicht für PTEN. Während das Migrationsverhalten der transgenen PTEN A498-Zellen in Richtung der EZM-Komponenten nur leichte Unterschiede zu den pcDNA3-Zellen aufwies, war die Migration der PTEN-Δ A498-Zellen deutlich reduziert. Hier kam es bei der Migration in Richtung der Chemotaxine Fibronectin (PTEN-Δ: 43 %, $p = 0,013$), Vitronectin (PTEN-Δ: 46 %, $p = 0,017$), Laminin (PTEN-Δ: 34 %, $p = 0,026$), Kollagen I (PTEN-Δ: 67 %, $p = 0,042$) und Kollagen IV (PTEN-Δ: 59 %, $p = 0,044$) zu einer signifikanten Verringerung des Migrationspotentials im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 33).

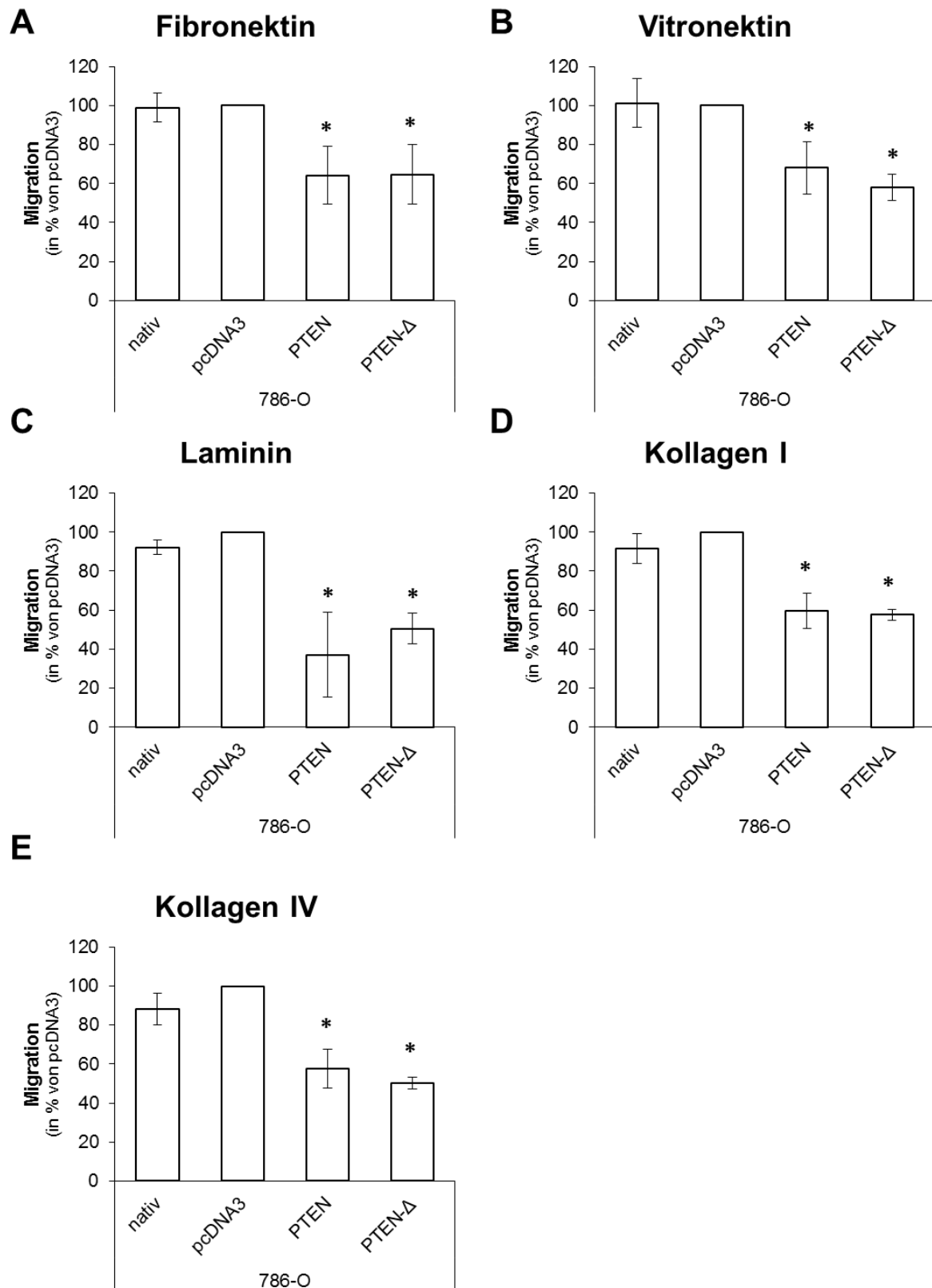


Abbildung 32: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Migration in Richtung verschiedener EZM-Komponenten der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen für die Chemotaxine Fibronektin (A), Vitronektin (B), Laminin (C), Kollagen I (D) und Kollagen IV (E). Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

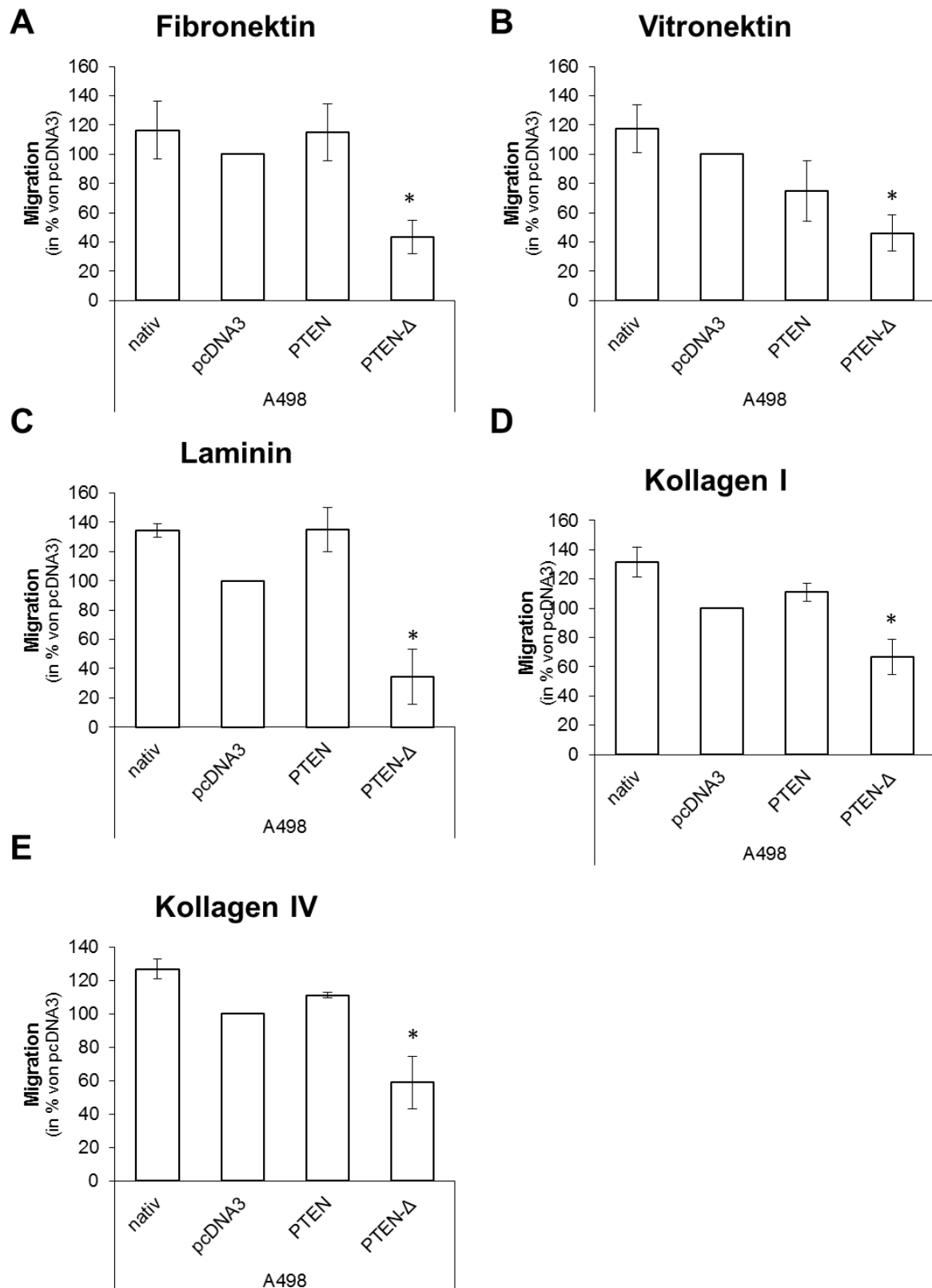


Abbildung 33: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Migration in Richtung verschiedener EZM-Komponenten der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen für die Chemotaxine Fibronektin (A), Vitronektin (B), Laminin (C), Kollagen I (D) und Kollagen IV (E). Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.2 Einfluss von PTEN- Δ auf die Adhäsion an Komponenten der Extrazellulär-Matrix

Neben der Migration spielen auch Adhäsionsvorgänge eine bedeutende Rolle während der Tumorprogression. Die Tumorzellen können durch Veränderung ihres Adhäsionspotentials gegenüber der Extrazellulär-Matrix ihre Interaktion mit dem Mikromilieu beeinflussen. Die Adhäsion der transgenen Zellen der Zelllinie 786-O und A498 wurde an den EZM-Komponenten Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Kollagen I und Kollagen IV untersucht. Als Kontrolle diente die Adhäsion an BSA. Hier zeigten sich sowohl für die 786-O-Zellen (Abbildung 34) als auch für die A498-Zellen (Abbildung 35) nur minimale Abweichungen von maximal 10 % (786-O) bzw. 15 % (A498) im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen.

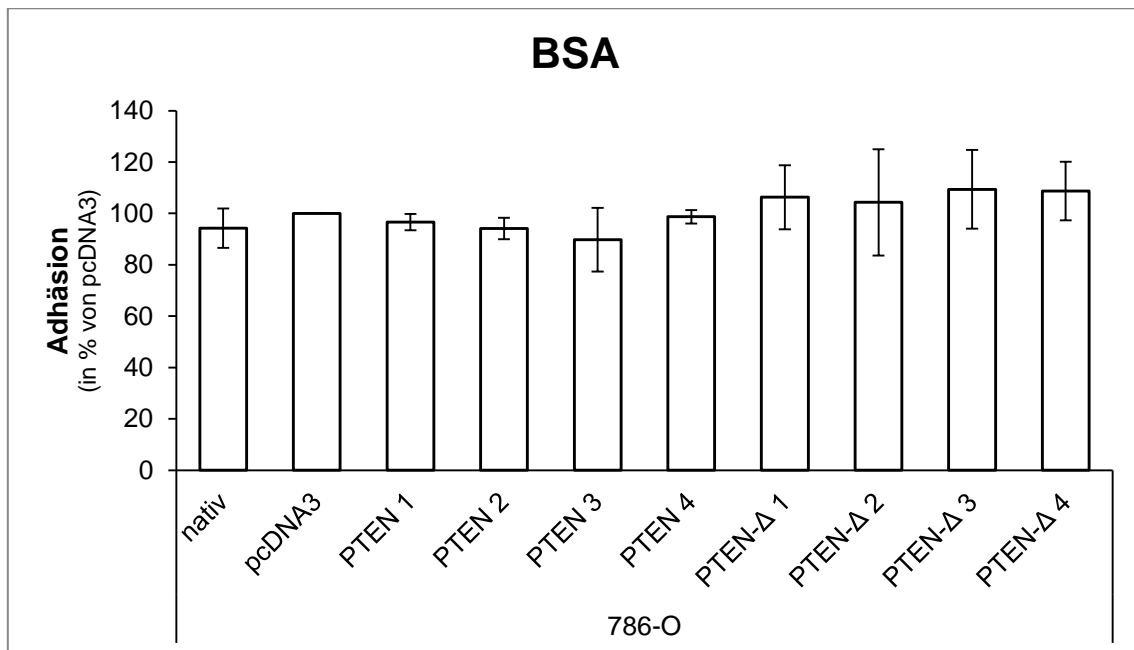


Abbildung 34: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an BSA. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

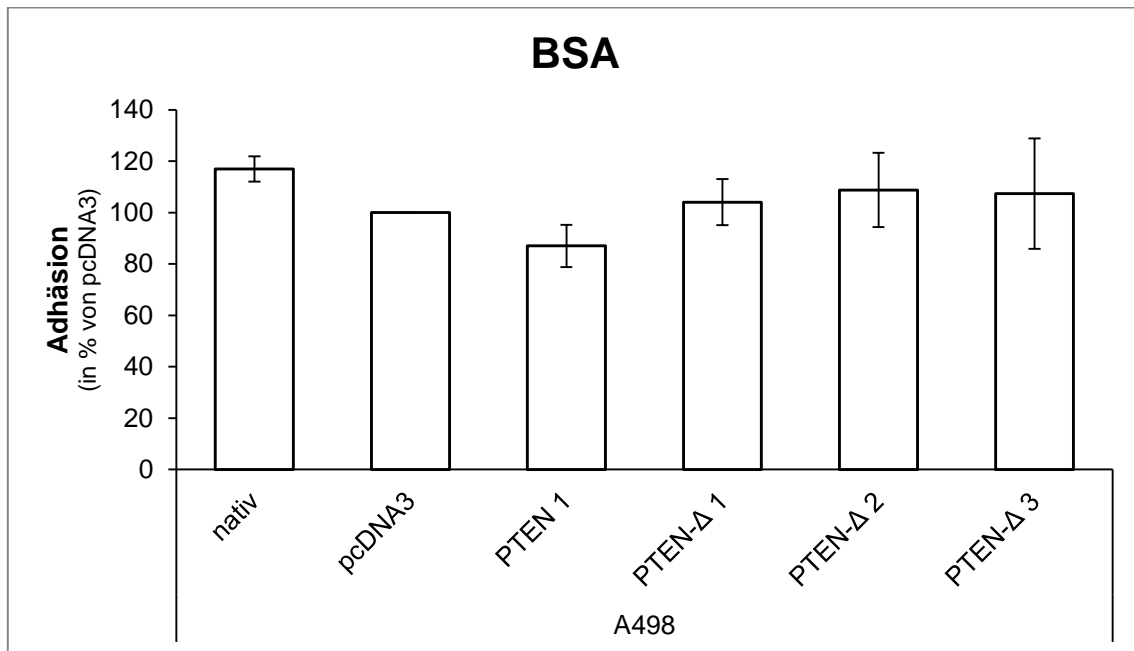


Abbildung 35: Adhäsion der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie A498 an BSA. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Adhäsionspotential an der EZM-Komponente Fibronectin der transgenen PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie 786-O war im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen in allen Klonen leicht erniedrigt. Bei PTEN 1 erfolgte die stärkste Reduktion auf 69 %. Die Adhäsion der Klone PTEN 2 und PTEN 3 waren signifikant auf 77 % ($p < 0,001$) und 82 % ($p < 0,001$) reduziert. Dagegen zeigte PTEN 4 nur eine minimale Reduktion der Adhäsion auf 98 %. PTEN-Δ induzierte ebenfalls eine leicht verringerte Adhäsion an Fibronectin. Das Adhäsionspotential sank auf 87 % ($p = 0,041$) bei PTEN-Δ 1, auf 97 % bei PTEN-Δ 2, auf 92 % bei PTEN-Δ 3 und auf 84 % bei PTEN-Δ 4. Die nativen 786-O-Zellen unterschieden sich in ihrer Adhäsionsfähigkeit an Fibronectin im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen nur minimal. Sie wiesen eine leicht erhöhte Adhäsion um 5 % auf (Abbildung 36).

Die Adhäsion an Fibronectin der A498-Zellen zeigte vergleichend mit den 786-O-Zellen ein ähnliches Bild, jedoch kam es hier zu einer stärkeren Reduktion des Adhäsionspotentials. Während die nativen A498-Zellen eine leicht reduzierte Adhäsion um 13 % aufwiesen, war die Adhäsion in den PTEN-transgenen Zellen auf 61 % ($p = 0,037$) signifikant reduziert. Die PTEN-Δ-Klone zeigten ebenfalls eine Reduktion der Adhäsion auf. Bei PTEN-Δ 1 kam es zu einer Verringerung auf 90 %. Die Adhäsion

von PTEN- Δ 2 war auf 70 % ($p = 0,047$) und von PTEN- Δ 3 auf 71 % reduziert (Abbildung 37).

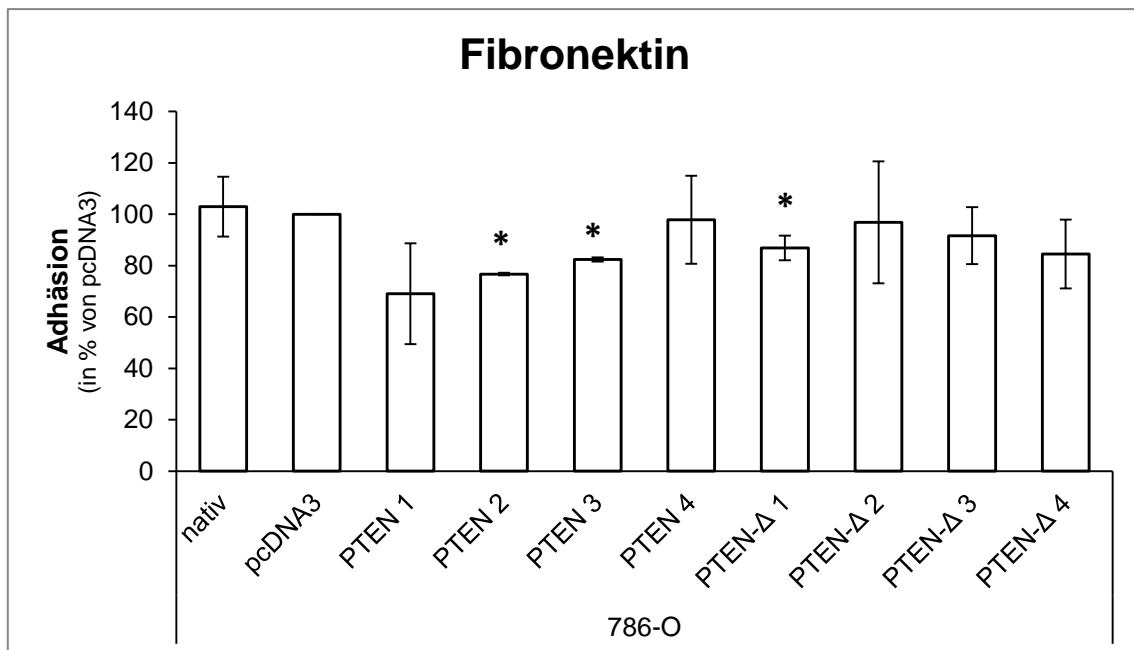


Abbildung 36: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Fibronektin. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

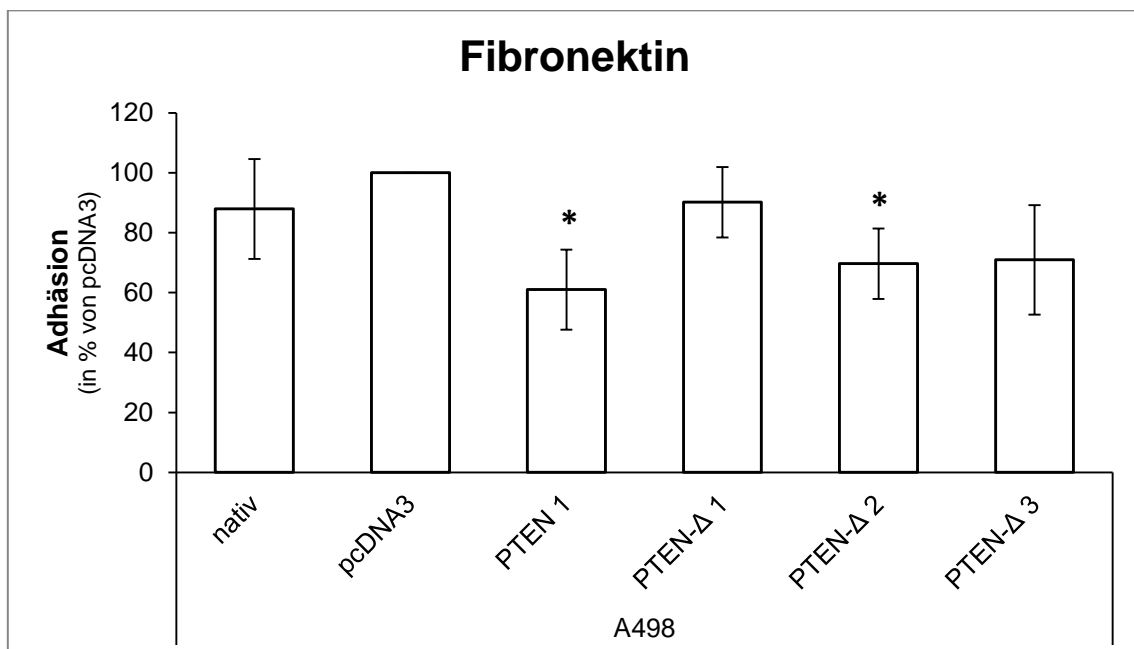


Abbildung 37: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 an Fibronektin. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Adhäsionsverhalten der transgenen PTEN und PTEN- Δ 786-O-Zellen gegenüber Vitronektin war im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen erniedrigt. Die nativen 786-O-Zellen zeigten nur eine leicht erhöhte Adhäsion an Vitronektin. Bei den PTEN-Klonen kam es zu einer Reduktion der Adhäsion auf 72 % bei PTEN 1, auf 74 % ($p = 0,028$) bei PTEN 2, auf 79 % ($p = 0,011$) bei PTEN 3 und auf 88 % bei PTEN 4. Die Adhäsion an Vitronektin war bei den PTEN- Δ -Klonen ähnlich stark. Hier kam es zu einer Verringerung der Adhäsion auf 79 % bei PTEN- Δ 1, auf 85 % bei PTEN- Δ 2, auf 74 % bei PTEN- Δ 3 und auf 74 % bei PTEN- Δ 4 (Abbildung 38).

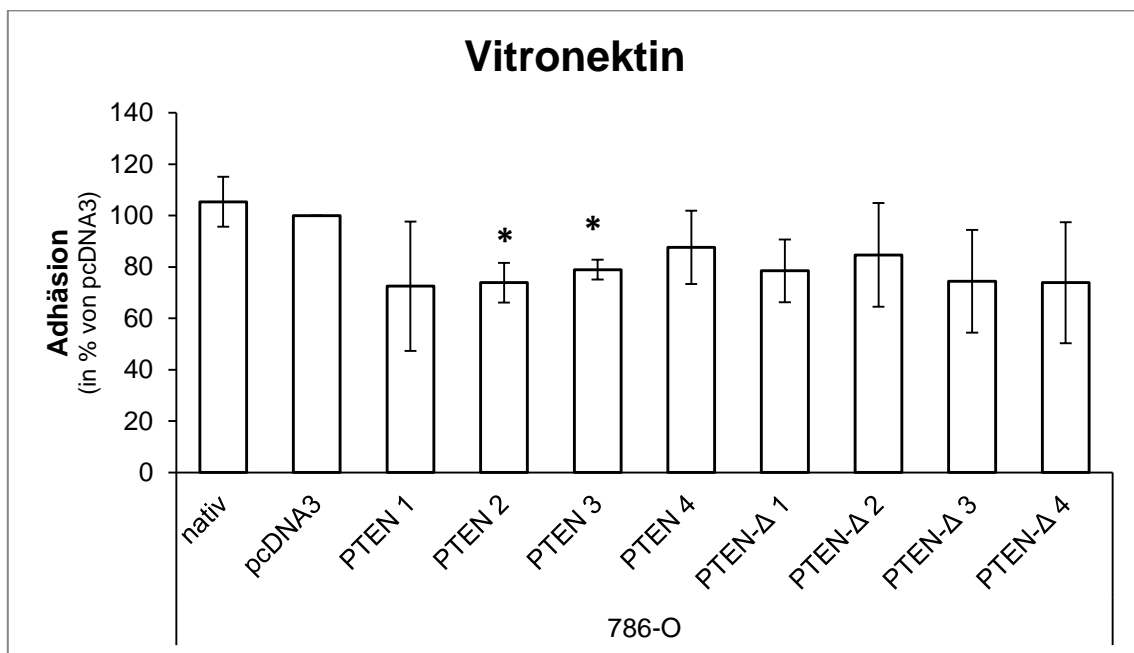


Abbildung 38: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Vitronektin. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanz wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Adhäsion an Vitronektin war in den transgenen A498-Zellen ebenfalls im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen erniedrigt. In den PTEN A498-Zellen kam es zu einer Reduktion der Adhäsion auf 50 % ($p = 0,034$). Bei den PTEN- Δ -Klonen wiesen erneut PTEN- Δ 2 und PTEN- Δ 3 eine stärker reduzierte Adhäsion im Vergleich zu PTEN- Δ 1 auf. Die Reduktion der Adhäsion bei PTEN- Δ 1 lag bei 90 %. PTEN- Δ 2 wies eine Verringerung auf 58 % ($p = 0,027$) und PTEN- Δ 3 auf 60 % ($p = 0,039$) auf. Die nativen A498-Zellen zeigten ein ähnliches Adhäsionsverhalten wie die pcDNA3-Zellen (Abbildung 39).

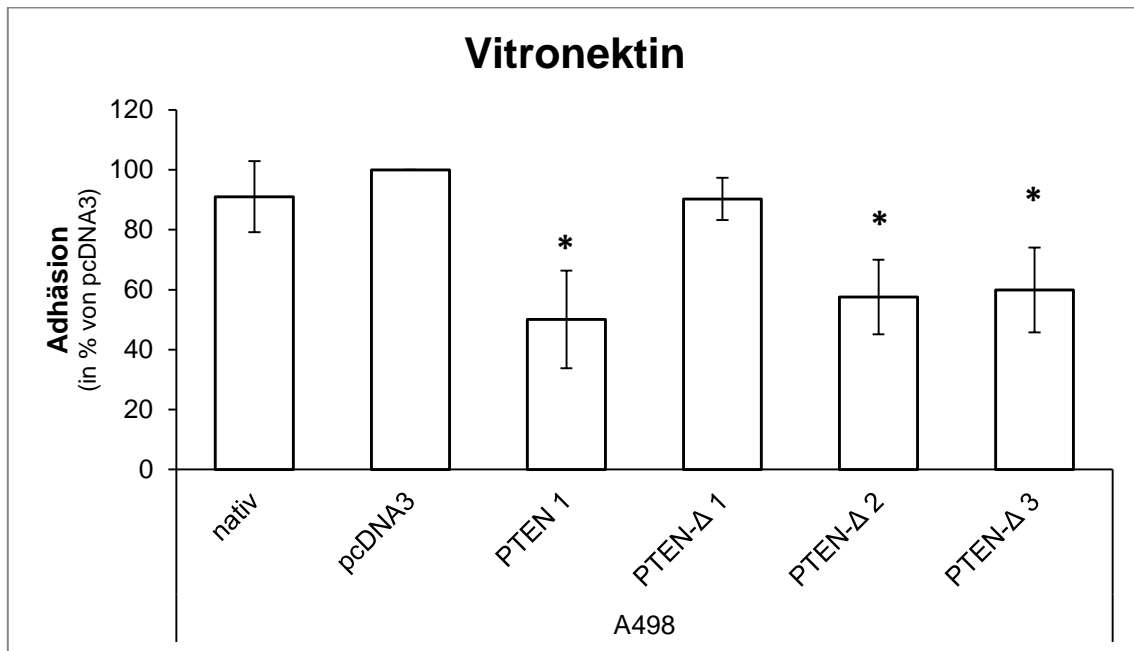


Abbildung 39: Adhäsion der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie A498 an Vitronektin. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Adhäsion an Laminin war, wie auch an den EZM-Komponenten Fibronektin und Vitronektin, in den transgenen 786-O-Zellen erniedrigt. Die nativen 786-O-Zellen zeigten eine leichte Reduktion der Adhäsion. In den PTEN-Klonen kam es zu einer verringerten Adhäsion auf 49 % ($p = 0,035$) bei PTEN 1, auf 67 % bei PTEN 2, auf 64 % ($p = 0,005$) bei PTEN 3 und auf 86 % bei PTEN 4. Die reduzierte Adhäsion in den PTEN-Δ-Klonen war im Vergleich zu PTEN weniger intensiv. Es konnten Reduktionen auf 76 % ($p = 0,009$) bei PTEN-Δ 1, auf 87 % bei PTEN-Δ 2, auf 66 % PTEN-Δ 3 und auf 70 % bei PTEN-Δ 4 nachgewiesen werden (Abbildung 40).

Das Adhäsionsverhalten der transgenen A498-Zellen gegenüber Laminin war in den nativen A498-Zellen sowie in den PTEN-Δ 1-Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen unverändert. In den PTEN A498-Zellen kam es zu einer reduzierten Adhäsion auf 41 % ($p = 0,011$). Die beiden PTEN-Δ-Klone 2 und 3 wiesen ebenfalls eine stark reduzierte Adhäsion von 48 % ($p = 0,029$) und 39 % ($p = 0,006$) auf (Abbildung 41).

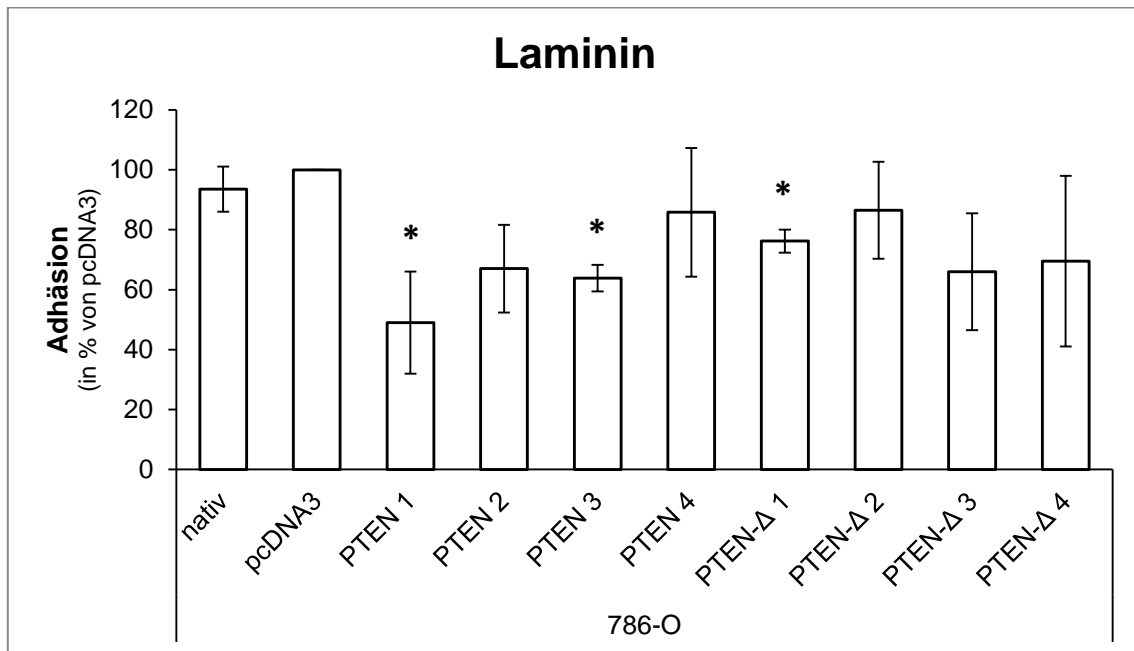


Abbildung 40: Adhäsion der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie 786-O an Laminin. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

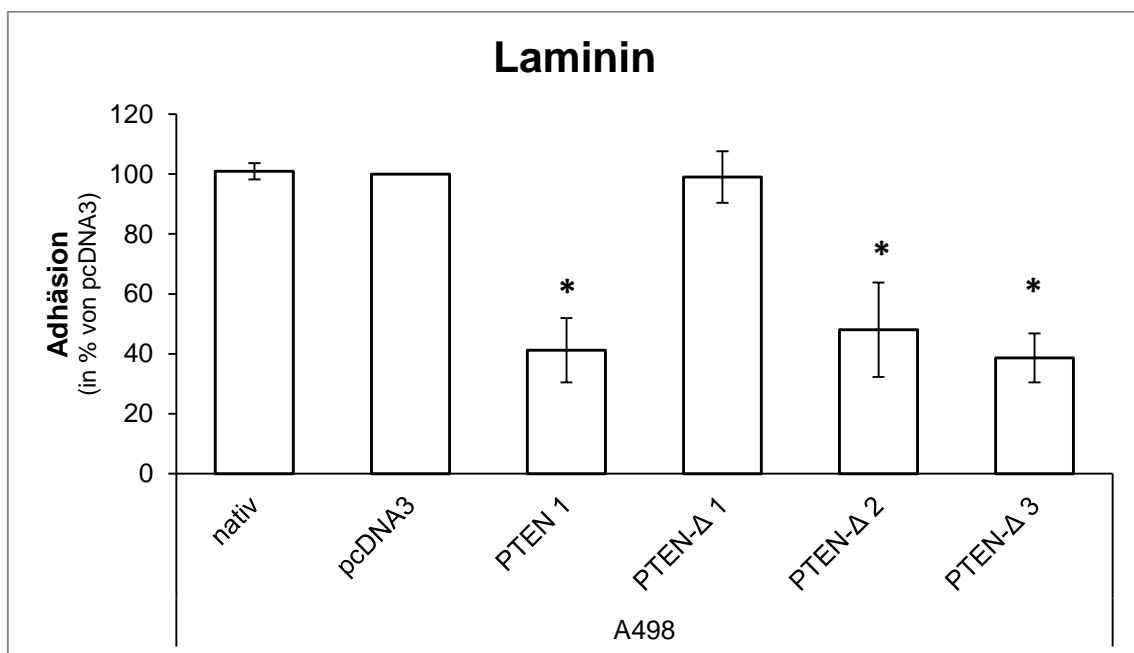


Abbildung 41: Adhäsion der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie A498 an Laminin. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Neben den EZM-Komponenten Fibronectin, Vitronectin und Laminin wurde auch die Adhäsion an den Kollagenen I und IV der transgenen Zellen bestimmt. Hier zeigte sich für die 786-O-Zellen sowohl in den PTEN- als auch in den PTEN-Δ-Klonen erneut eine

Reduktion des Adhäsionspotentials. Die nativen Zellen wiesen eine leicht erhöhte Adhäsion im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. Bei PTEN 1 kam es zu einer Reduktion der Adhäsion auf 53 % ($p = 0,024$), bei PTEN 2 auf 70 % ($p = 0,045$), bei PTEN 3 auf 74 % ($p = 0,02$) und bei PTEN 4 zu einer leichten Verringerung auf 96 %. Die Adhäsion an Kollagen I war bei PTEN- Δ 1 auf 83 %, bei PTEN- Δ 2 auf 92 %, bei PTEN- Δ 3 auf 82 % und bei PTEN- Δ 4 auf 77 % reduziert (Abbildung 42).

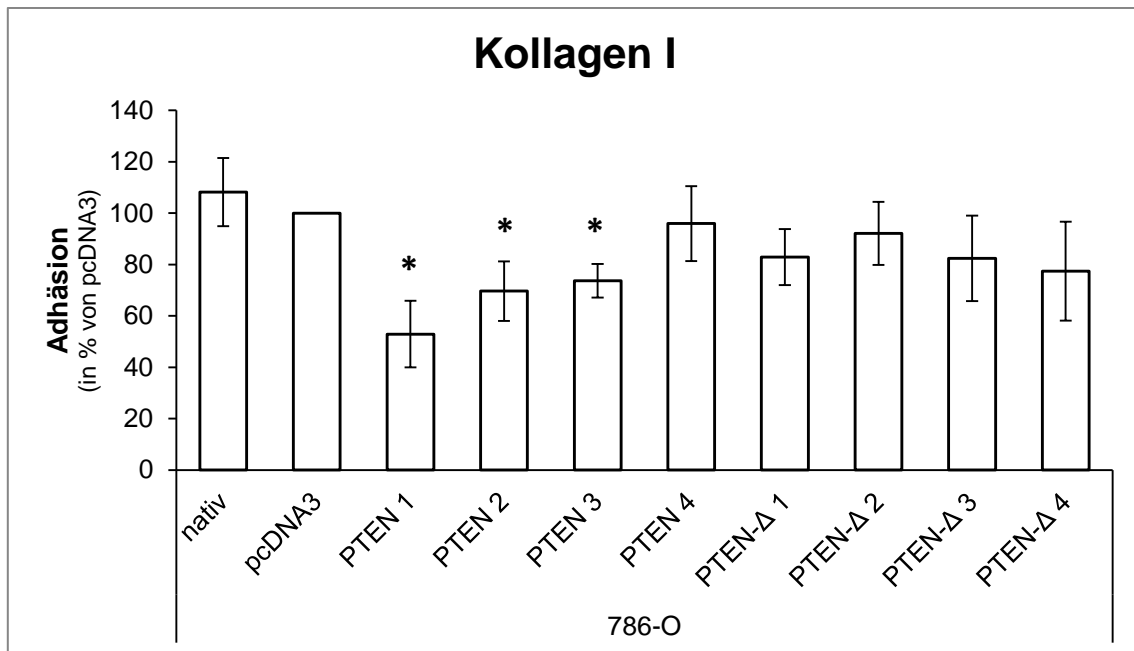


Abbildung 42: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Kollagen I. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die transgenen A498-Zellen zeigten ein ähnliches Adhäsionsverhalten an Kollagen I wie bereits an den anderen EZM-Komponenten. Während die nativen A498-Zellen nur eine leichte Abweichung im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen aufzeigten, war die Adhäsion der PTEN 1 A498-Zellen auf 55 % ($p = 0,047$) reduziert. Die Adhäsion der PTEN- Δ -Klone war bei PTEN- Δ 1 auf 87 %, bei PTEN- Δ 2 auf 65 % und bei PTEN- Δ 3 auf 63 % verringert (Abbildung 43).

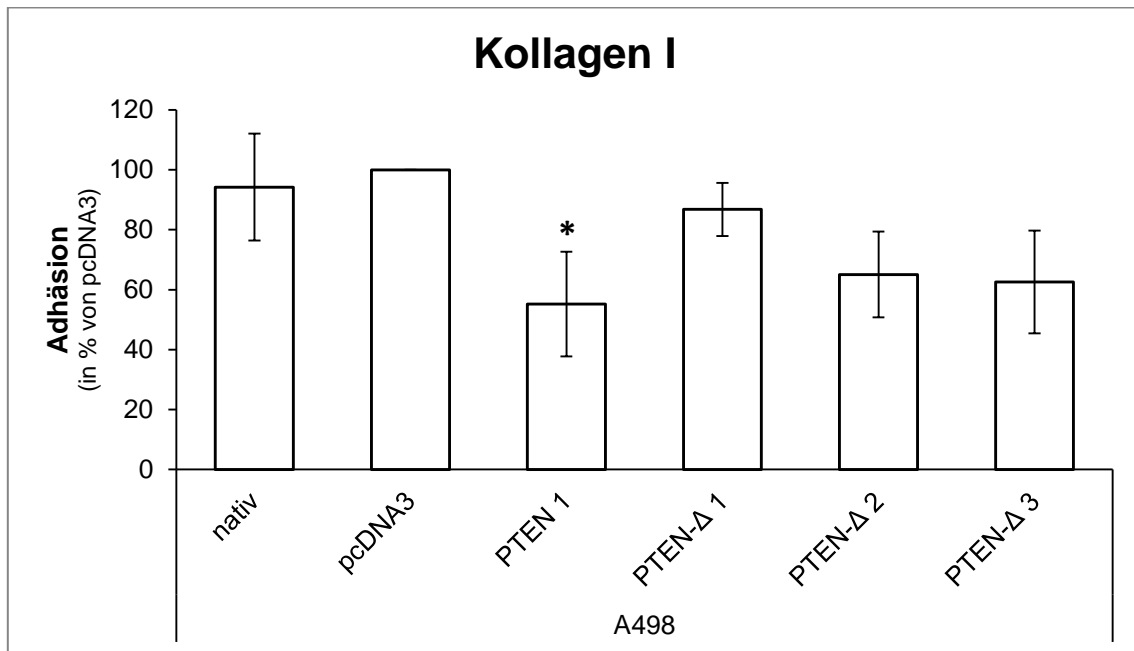


Abbildung 43: Adhäsion der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie A498 an Kollagen I. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Adhäsion an Kollagen IV zeigte ebenfalls eine Reduktion in den transgenen Klonen der Zelllinie 786-O. Bei PTEN kam es zu einer Verringerung der Adhäsion auf 68 % bei PTEN 1, auf 78 % bei PTEN 2 und auf 77 % ($p = 0,015$) bei PTEN 3. Die PTEN 4 786-O-Zellen wiesen erneut die geringste Reduktion auf 97 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. PTEN-Δ induzierte eine Reduktion der Adhäsion an Kollagen IV. Das Adhäsionspotential sank auf 87 % bei PTEN-Δ 1, auf 93 % bei PTEN-Δ 2, auf 87 % bei PTEN-Δ 3 und auf 81 % bei PTEN-Δ 4. Die nativen 786-O-Zellen zeigten eine leicht erhöhte Adhäsion im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf (Abbildung 44).

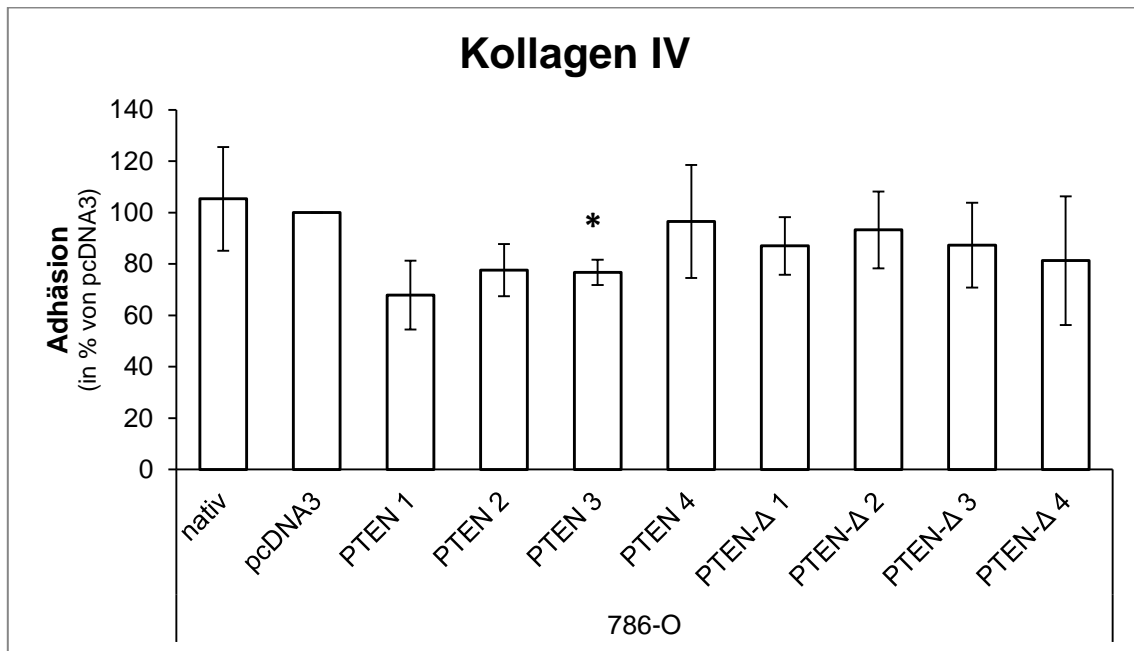


Abbildung 44: Adhäsion der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie 786-O an Kollagen IV. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Adhäsionsverhalten der transgenen A498-Zellen gegenüber Kollagen IV war wie bei den anderen untersuchten EZM-Komponenten erniedrigt. Bei den PTEN 1 A498-Zellen kam es zu einer Reduktion der Adhäsion auf 55 % ($p = 0,032$). Die PTEN-Δ-Klone zeigten eine verringerte Adhäsion an Kollagen IV. Die Adhäsion fiel bei PTEN-Δ 1 auf 93 %, bei PTEN-Δ 2 auf 62 % und bei PTEN-Δ 3 auf 50 % ($p = 0,022$) ab. Die nativen A498-Zellen wiesen ein ähnliches Adhäsionspotential wie die pcDNA3-Zellen auf (Abbildung 45).

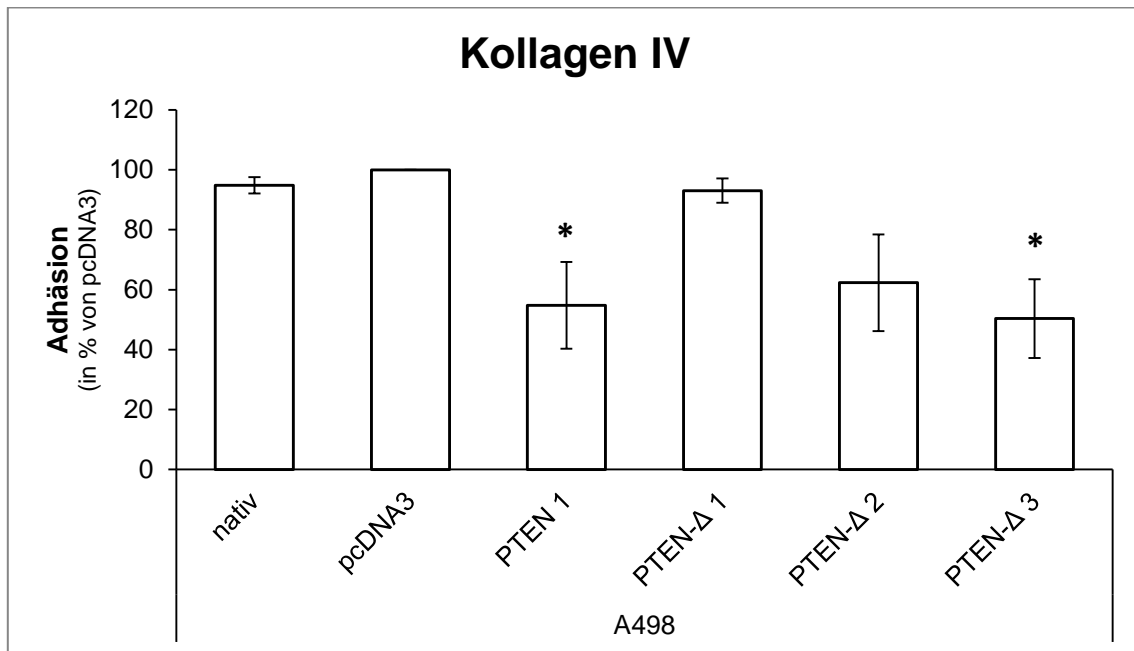


Abbildung 45: Adhäsion der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie A498 an Kollagen IV. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Adhäsion an den untersuchten EZM-Komponenten war in allen transgenen PTEN- und PTEN-Δ-Zellen der Zelllinien 786-O und A498 erniedrigt. Jedoch waren die Reduktionen bei der Zelllinie A498 deutlich stärker. Fasst man die einzelnen Klone der Zelllinie 786-O zusammen, zeigte sich bei allen EZM-Komponenten eine signifikante Reduktion der Adhäsion bei PTEN-Δ. Bei den jeweiligen EZM-Komponenten kam es zur Senkung der Adhäsion an Fibronectin auf 82 % bei PTEN und auf 90 % ($p = 0,035$) bei PTEN-Δ. Die anderen EZM-Komponenten wiesen ähnliche Reduktionen auf: Vitronectin (PTEN: 78 %, $p = 0,008$; PTEN-Δ: 78 %, $p = 0,003$), Laminin (PTEN: 66 %, $p = 0,021$; PTEN-Δ: 75 %, $p = 0,011$), Kollagen I (PTEN: 73 %; PTEN-Δ: 84 %, $p = 0,013$) und Kollagen IV (PTEN: 80 %, $p = 0,043$; PTEN-Δ: 87 %, $p = 0,014$). Die nativen 786-O-Zellen zeigten jeweils ein ähnliches Adhäsionsverhalten wie die pcDNA3-Zellen (Abbildung 46). Bei den A498-Zellen wiesen PTEN und PTEN-Δ eine Reduktion der Adhäsion an Fibronectin (PTEN: 61 %, $p = 0,037$; PTEN-Δ: 77 %), an Vitronectin (PTEN: 50 %, $p = 0,034$; PTEN-Δ: 69 %), an Laminin (PTEN: 41 %, $p = 0,011$; PTEN-Δ: 61 %), an Kollagen I (PTEN: 55 %, $p = 0,034$; PTEN-Δ: 71 %) und an Kollagen IV (PTEN: 55 %, $p = 0,032$; PTEN-Δ: 69 %) auf. Die nativen A498-Zellen wiesen eine ähnliche Adhäsion an den EZM-Komponenten im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf (Abbildung 47).

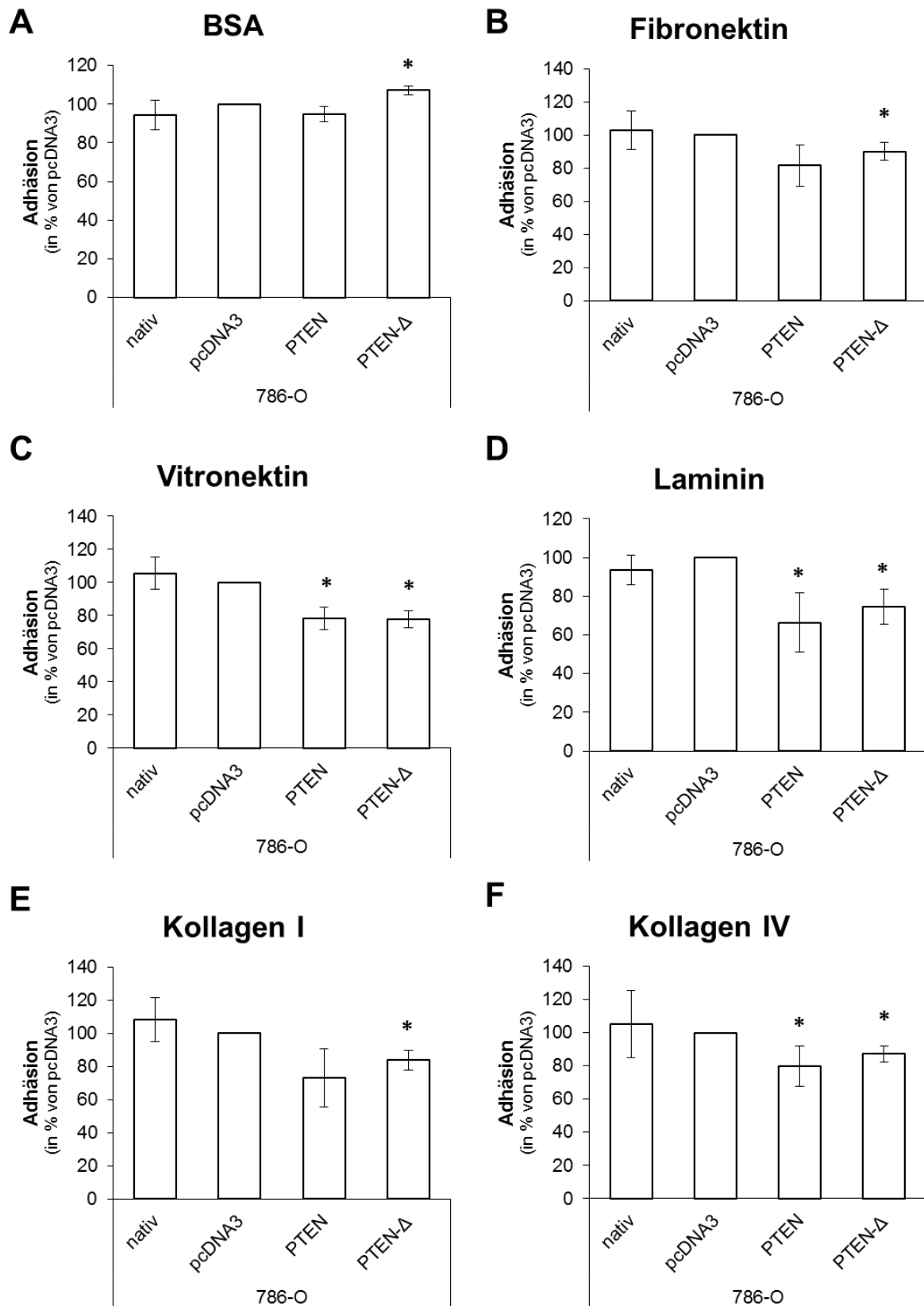


Abbildung 46: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Adhäsion der Zelllinie 786-O an verschiedenen EZM-Komponenten. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen für BSA (A) und die EZM-Komponenten Fibronektin (B), Vitronektin (C), Laminin (D), Kollagen I (E) und Kollagen IV (F). Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

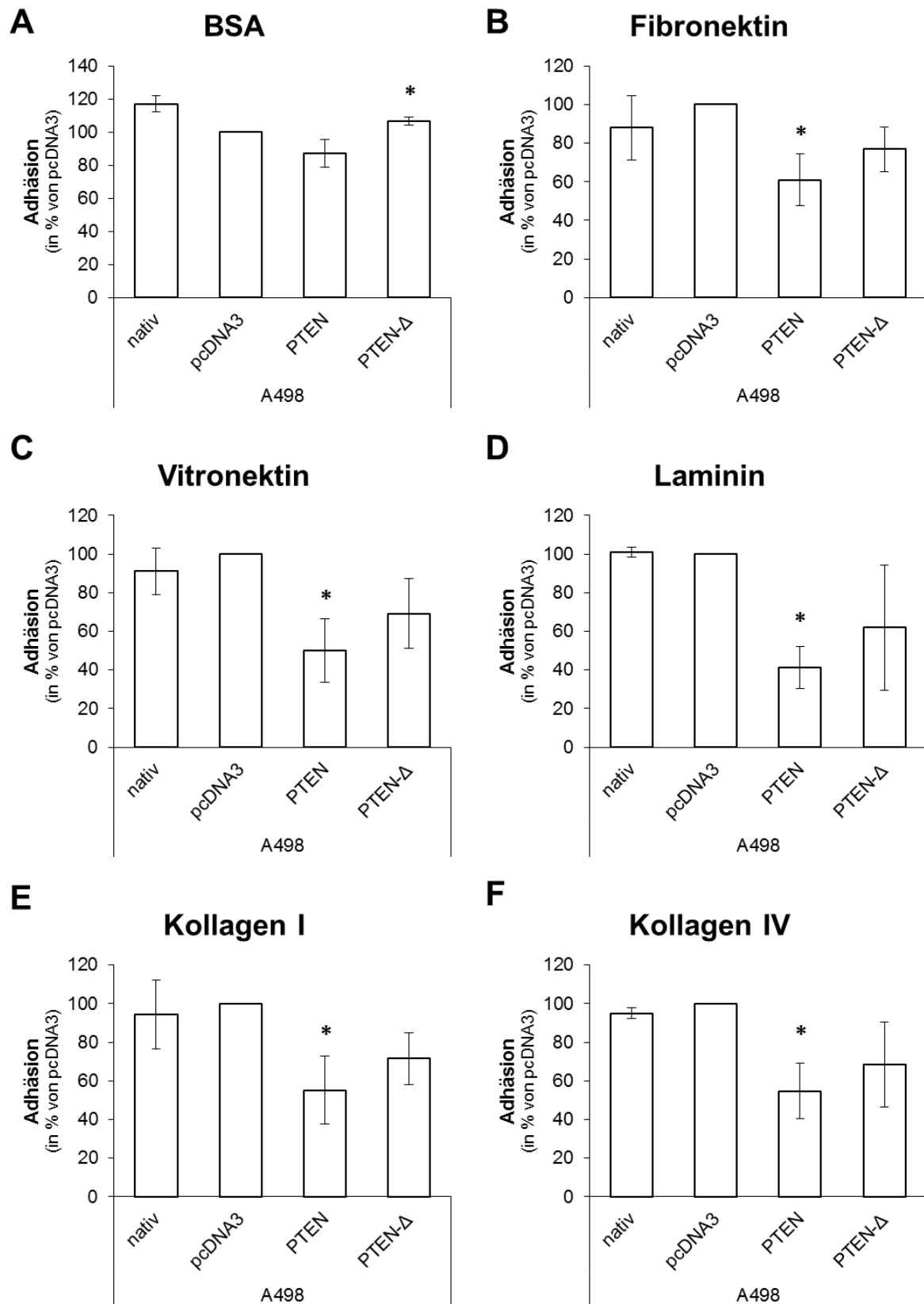


Abbildung 47: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Adhäsion der Zelllinie A498 an verschiedenen EZM-Komponenten. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen für BSA (A) und die EZM-Komponenten Fibronektin (B), Vitronektin (C), Laminin (D), Kollagen I (E) und Kollagen IV (F). Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.3 Einfluss von PTEN- Δ auf die Integrin-Expression

Zelluläre Prozesse wie Migration und Adhäsion werden vor allem über transmembranäre Rezeptoren vermittelt. Durch Bindung von extrazellulären Liganden an ihre Rezeptoren werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, welche Einfluss auf die Expression von beteiligten Genen nehmen und so die zellulären Prozesse modifizieren. Zu diesen Rezeptoren gehören vor allem die Integrine, welche sich als Heterodimer jeweils aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten funktional zusammensetzen. Um den Einfluss von PTEN- Δ und PTEN auf die Integrine zu untersuchen, wurden im Durchflusszytometer die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV sowie $\beta 1$ und $\beta 3$ in den transgenen PTEN- und PTEN- Δ -Zellen der Zelllinien 786-O und A498 analysiert. Es wurden jeweils zwei Untereinheiten gleichzeitig durch Verwendung eines FITC- bzw. PE-gekoppelten Antikörpers detektiert (Abbildung 48 A-D). Pro Messung wurden 15.000 Events analysiert. Die relativen Expressionen aus drei Versuchen wurden durch Ermittlung der Mediane und in Bezug-Setzung auf die pcDNA3-Zellen bestimmt.

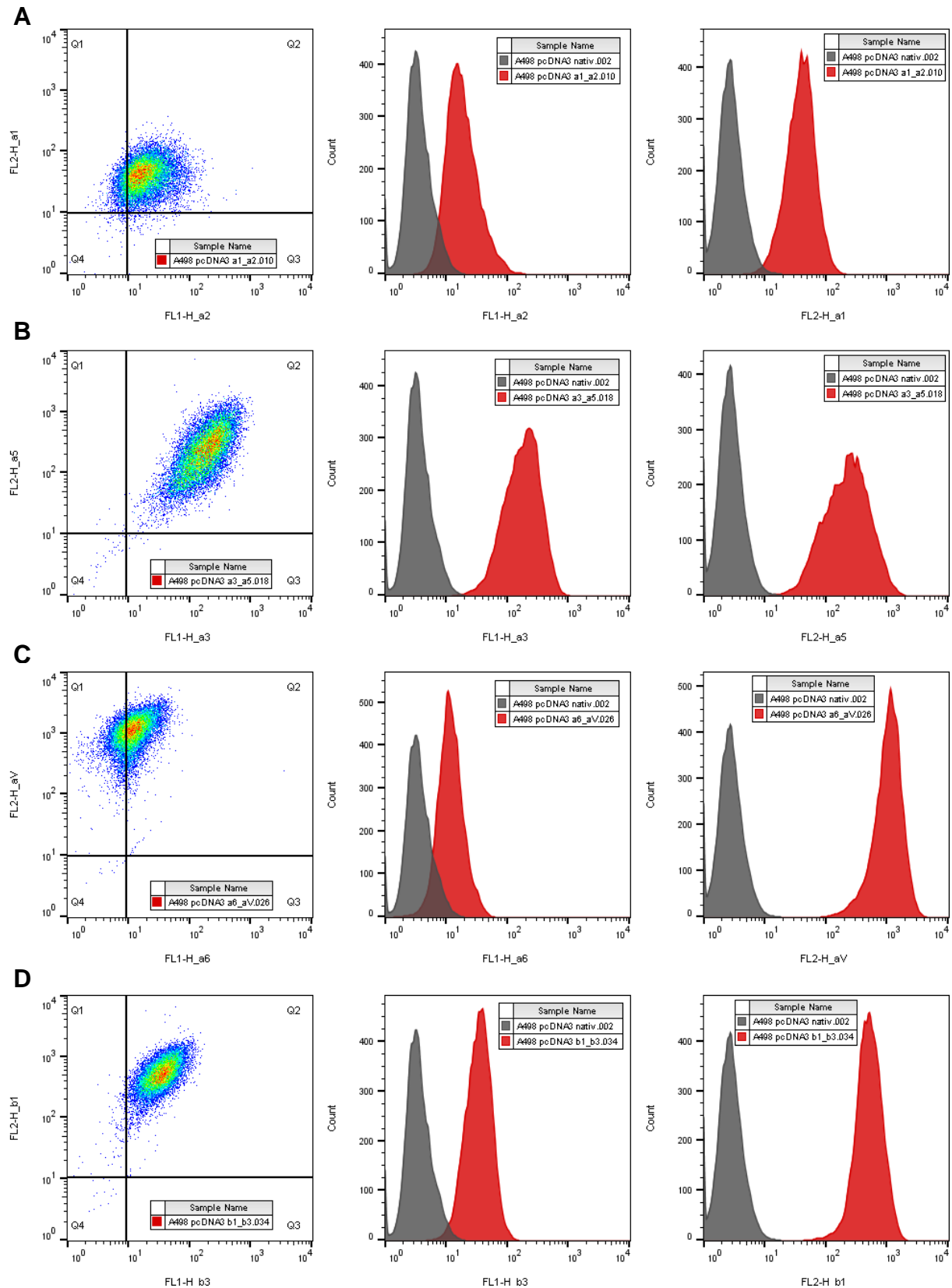


Abbildung 48: Durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Integrin-Untereinheiten. Es erfolgten jeweils Doppelfärbungen. Dargestellt sind die jeweiligen Messungen im *Dotplot* sowie im Histogramm für Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ (A), $\alpha 3$ und $\alpha 5$ (B), $\alpha 6$ und αV (C) und $\beta 1$ und $\beta 3$ (D) der pcDNA3-Zellen der Zelllinie A498 (rot hinterlegt). Als Kontrolle wurden ungefärbte pcDNA3-Zellen mitgeführt (grau hinterlegt).

In der Zelllinie 786-O induzierte PTEN sowie auch PTEN- Δ eine Reduktion der Integrin α 1-Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Die Expression war in den PTEN-Klonen auf 55 % ($p = 0,003$) bei PTEN 1, auf 61 % ($p = 0,029$) bei PTEN 2 und auf 62 % ($p = 0,014$) bei PTEN 3 signifikant erniedrigt. Bei PTEN 4 kam es zu einer leichten Verringerung der α 1-Expression auf 91 %. Die PTEN- Δ -Klone zeigten ebenfalls eine reduzierte Expression der Untereinheit auf. Während PTEN- Δ 1 (100 %) und PTEN- Δ 2 (85 %) nur leichte bzw. keine Reduktionen aufwiesen, war die α 1-Expression bei PTEN- Δ 3 auf 64 % ($p = 0,016$) und bei PTEN- Δ 4 auf 56 % ($p = 0,008$) reduziert. Die nativen 786-O-Zellen wiesen nur eine leicht verringerte Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf (Abbildung 49).

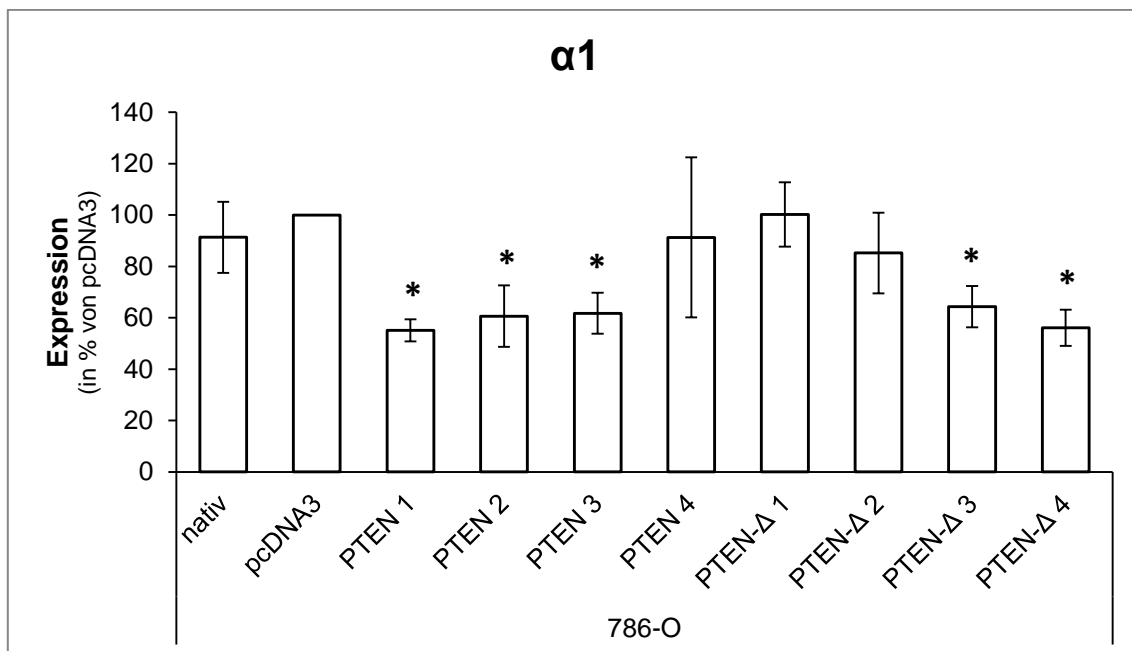


Abbildung 49: Expression der Integrin-Untereinheit α 1 in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Integrin α 1-Expression war in den transgenen A498-Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen vorwiegend reduziert. Während die PTEN 1 A498-Zellen nur eine leichte Reduktion auf 81 % ($p = 0,022$) aufwiesen, konnte in den PTEN- Δ 2-Zellen eine Verringerung der Expression auf 18 % ($p < 0,001$) und bei PTEN- Δ 3 auf 50 % ($p = 0,02$) nachgewiesen werden. Die Integrin α 1-Expression der nativen A498-Zellen und der PTEN- Δ 1-Zellen war im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen nur leicht verändert (Abbildung 50).

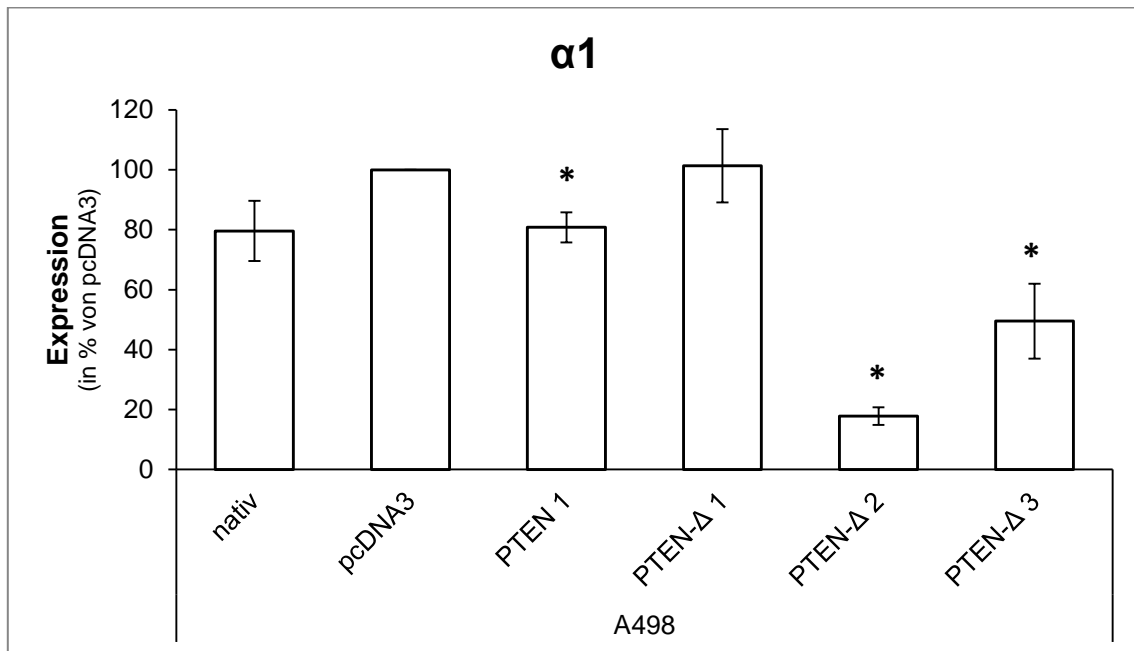


Abbildung 50: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 1$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die transgenen PTEN und PTEN- Δ 786-O-Zellen induzierten ebenso eine veränderte Integrin $\alpha 2$ -Expression. Insgesamt kam es zu einer leichten Erhöhung der Expression bei PTEN 2 auf 112 %, bei PTEN 3 auf 116 % ($p = 0,023$) und bei PTEN 4 auf 134 %. Dagegen zeigte PTEN 1 eine leichte Reduktion der Integrin $\alpha 2$ -Expression auf 79 % ($p = 0,024$). Die PTEN- Δ -Klone zeigten alle eine gesteigerte Expression auf 118 % ($p = 0,021$) bei PTEN- Δ 1, auf 122 % ($p = 0,015$) bei PTEN- Δ 2, auf 154 % ($p = 0,002$) bei PTEN- Δ 3 und auf 115 % ($p = 0,031$) bei PTEN- Δ 4. Die Expression der nativen 786-O-Zellen war im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen um 42 % gesteigert (Abbildung 51).

Die Integrin $\alpha 2$ -Expression der transgenen A498-Zellen zeigte keinen eindeutigen Trend im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Während PTEN und PTEN- Δ 2 eine gesteigerte Expression auf 170 % ($p = 0,006$) bzw. auf 126 % aufwiesen, war die $\alpha 2$ -Expression in den übrigen zwei PTEN- Δ -Klonen reduziert. PTEN- Δ 1 war im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf 61 % ($p = 0,02$) und PTEN- Δ 3 auf 62 % ($p = 0,038$) verringert. Die Expression der nativen A498-Zellen war ebenfalls auf 56 % ($p = 0,032$) reduziert (Abbildung 52).

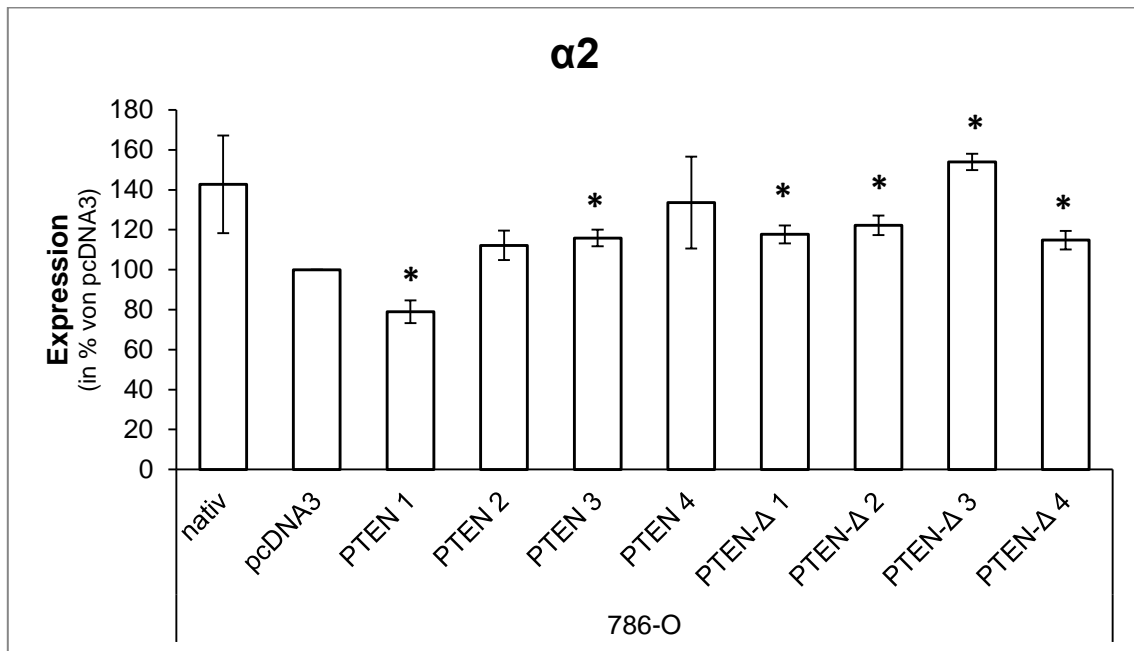


Abbildung 51: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 2$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

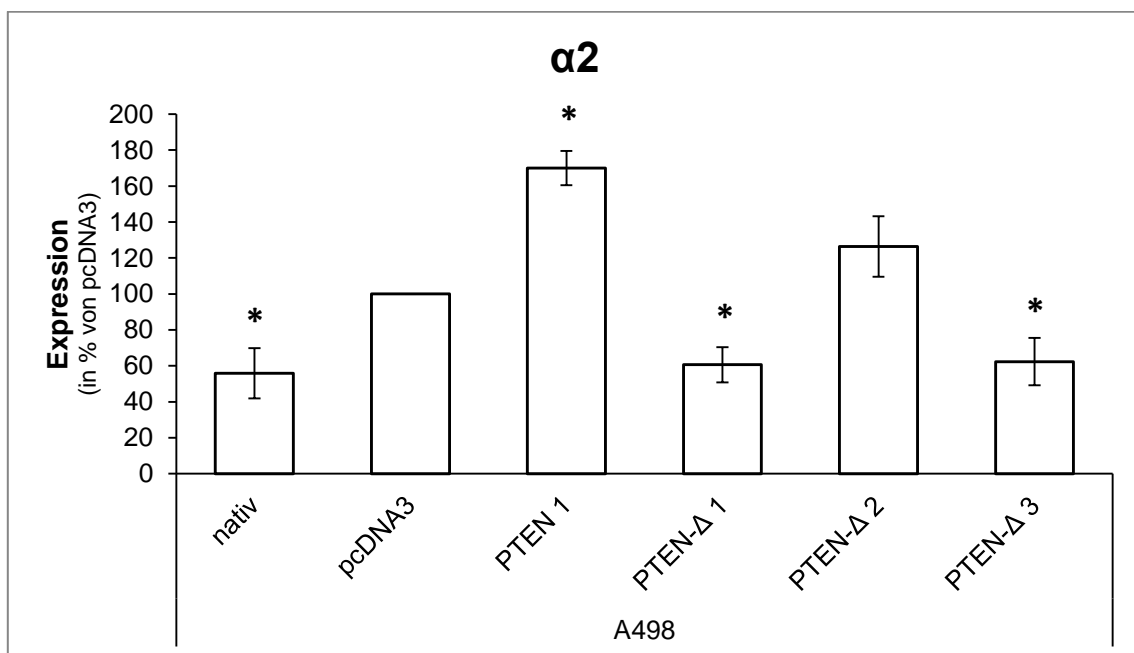


Abbildung 52: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 2$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die transgenen 786-O-Zellen induzierten eine Veränderung der Integrin $\alpha 3$ -Expression. Während es in den PTEN-Klonen sowohl zu leichten Reduktionen und Steigerungen der Expression kam, induzierte PTEN- Δ in allen Klonen eine verstärkte Integrin

$\alpha 3$ -Expression. Bei PTEN 1 kam es zu einer Reduktion auf 63 % und bei PTEN 3 auf 87 %. Dagegen war die $\alpha 3$ -Expression bei PTEN 2 und PTEN 4 auf 124 % bzw. 216 % ($p < 0,001$) im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen erhöht. Die Expression der nativen 786-O-Zellen wies nur eine leichte Erhöhung um 16 % auf. PTEN- Δ induzierte eine signifikante Steigerung der Integrin $\alpha 3$ -Expression bei PTEN- Δ 2 auf 133 % ($p = 0,045$) und bei PTEN- Δ 3 auf 216 % ($p = 0,024$). In den Klonen PTEN- Δ 1 und PTEN- Δ 4 kam es ebenfalls zu einer verstärkten Expression auf 177 % und 173 % (Abbildung 53).

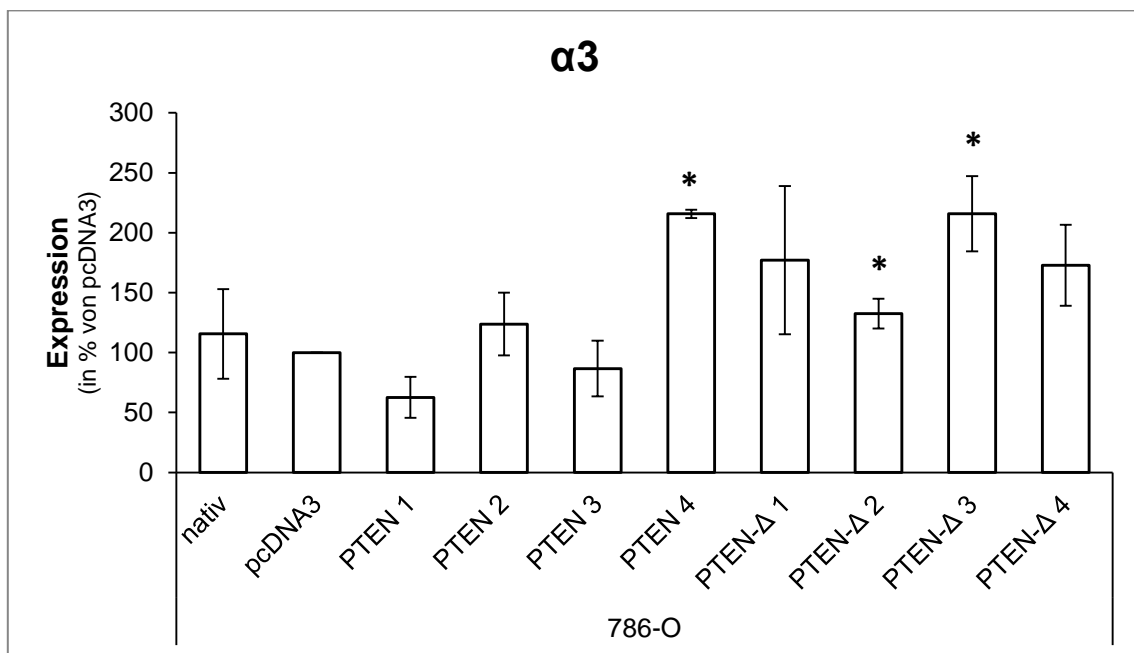


Abbildung 53: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die transgenen A498-Zellen zeigten im Vergleich zu den 786-O-Zellen ein gegensätzliches Bild. Hier induzierte PTEN 1 eine leichte Erhöhung der Integrin $\alpha 3$ -Expression um 15 %. In zwei von den PTEN- Δ -Klonen kam es zu einer Reduktion der Expression auf 31 % ($p = 0,039$) und 45 % ($p = 0,007$). Dagegen zeigte PTEN- Δ 2 eine verstärkte Integrin $\alpha 3$ -Expression auf 142 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. Die nativen A498-Zellen wiesen ebenfalls eine reduzierte Expression auf (38 %, $p = 0,024$) (Abbildung 54).

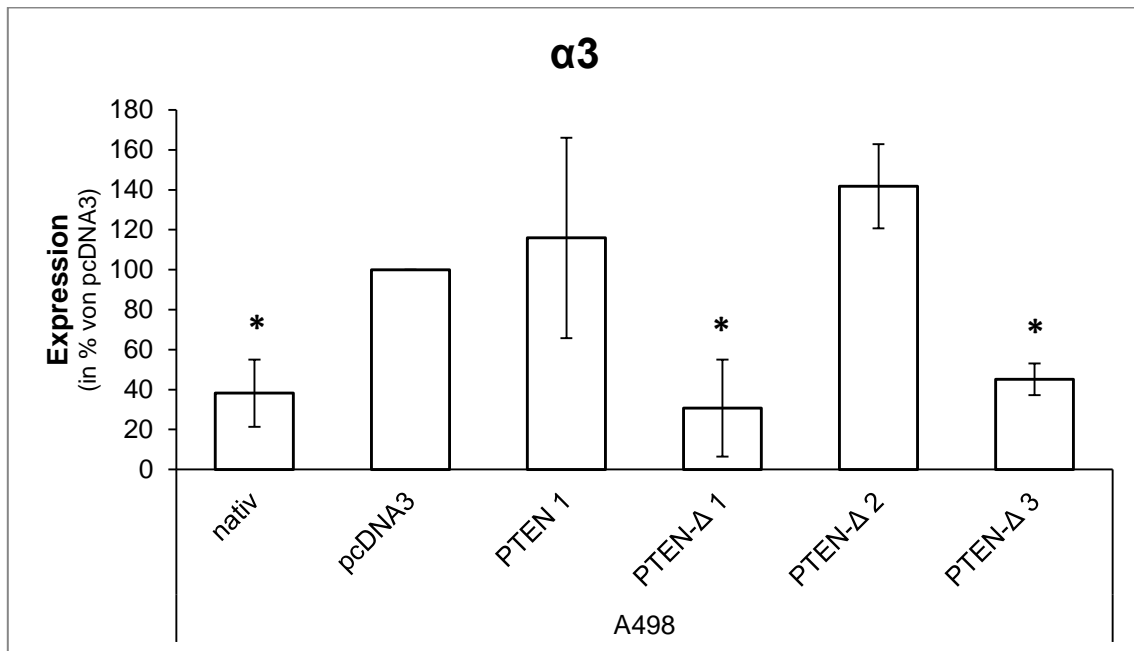


Abbildung 54: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ war sowohl in den transgenen PTEN als auch in den transgenen PTEN- Δ 786-O-Zellen reduziert. Einzig der Klon PTEN 4 zeigte eine gesteigerte Expression auf 142 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. PTEN 1 induzierte eine Reduktion auf 23 % ($p = 0,003$), PTEN 2 auf 76 % ($p = 0,019$) und PTEN 3 war auf 38 % ($p = 0,006$) reduziert. Die PTEN- Δ -Klone wiesen eine Reduktion der Integrin $\alpha 5$ -Expression auf 61 % ($p = 0,047$) bei PTEN- Δ 1, auf 69 % ($p = 0,023$) bei PTEN- Δ 2, auf 76 % bei PTEN- Δ 3 und auf 92 % bei PTEN- Δ 4 auf. Die nativen 786-O-Zellen zeigten eine leicht reduzierte Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 55).

Die Integrin $\alpha 5$ -Expression unterschied sich in den A498-Zellen vor allem in den PTEN- Δ -Klonen. In den PTEN 1 A498-Zellen war die Expression auf 137 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen erhöht. Die Integrin $\alpha 5$ -Expression der nativen A498-Zellen betrug 34 % der Expression der pcDNA3-Zellen. Die PTEN- Δ -Klone induzierten eine Reduktion der Expression. Bei PTEN- Δ 1 kam es zu einer Reduktion auf 32 % ($p = 0,005$) und bei PTEN- Δ 3 auf 42 % ($p = 0,005$). Dagegen war PTEN- Δ 2 in seiner Expression mit einem Wert von 98 % nahezu unverändert im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 56).

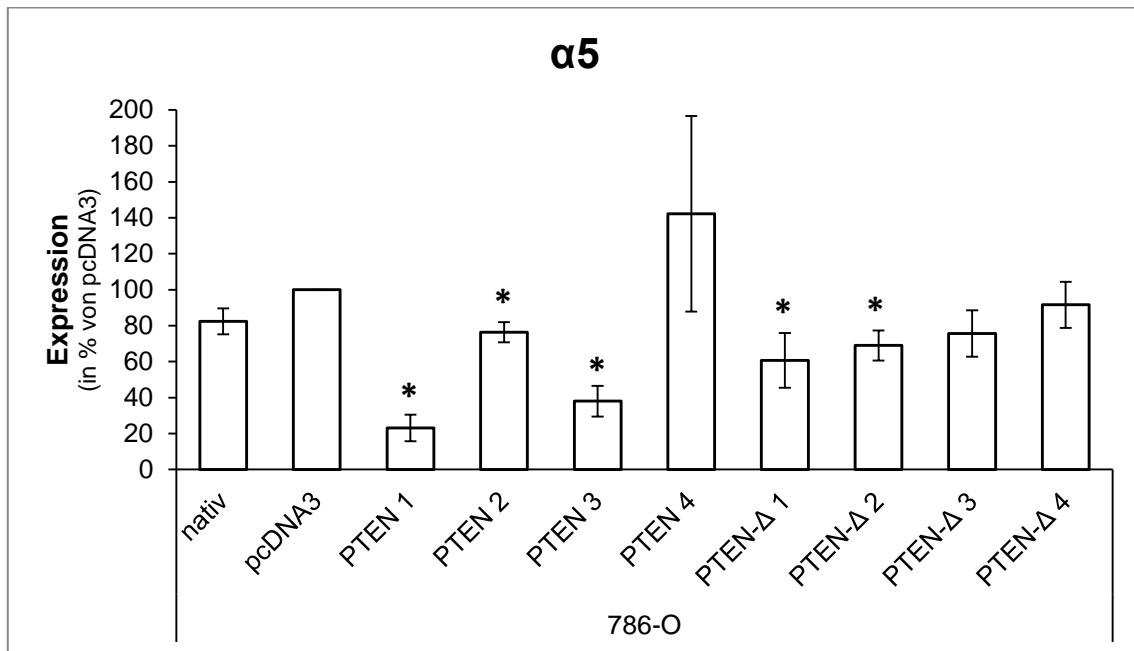


Abbildung 55: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

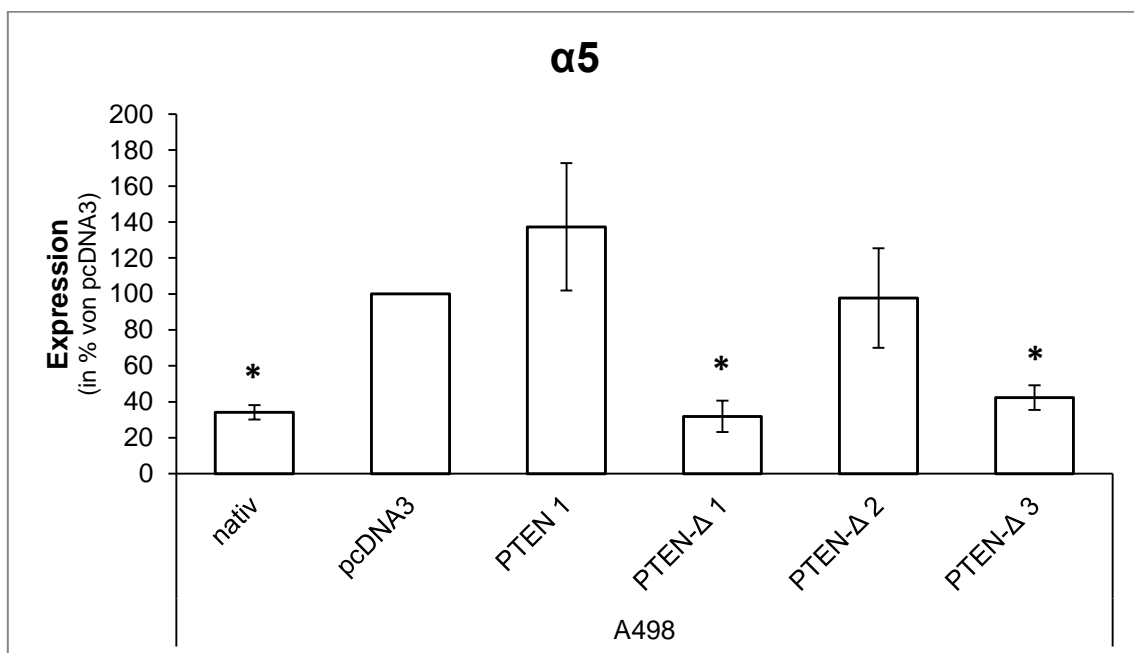


Abbildung 56: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Integrin $\alpha 6$ -Expression war in den transgenen PTEN und PTEN- Δ 786-O-Zellen nur geringfügig verändert. Die nativen 786-O-Zellen zeigten keine Veränderung im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. PTEN induzierte entweder nur eine leicht erhöhte

Expression bei PTEN 2 auf 104 % und bei PTEN 4 auf 116 % oder eine leichte Reduktion der Integrin $\alpha 6$ -Expression auf 64 % ($p = 0,001$) bei PTEN 1 und auf 80 % bei PTEN 3. Die PTEN- Δ -Klone wiesen alle eine leicht erhöhte Expression mit einer maximalen Steigerung von 30 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf (Abbildung 57).

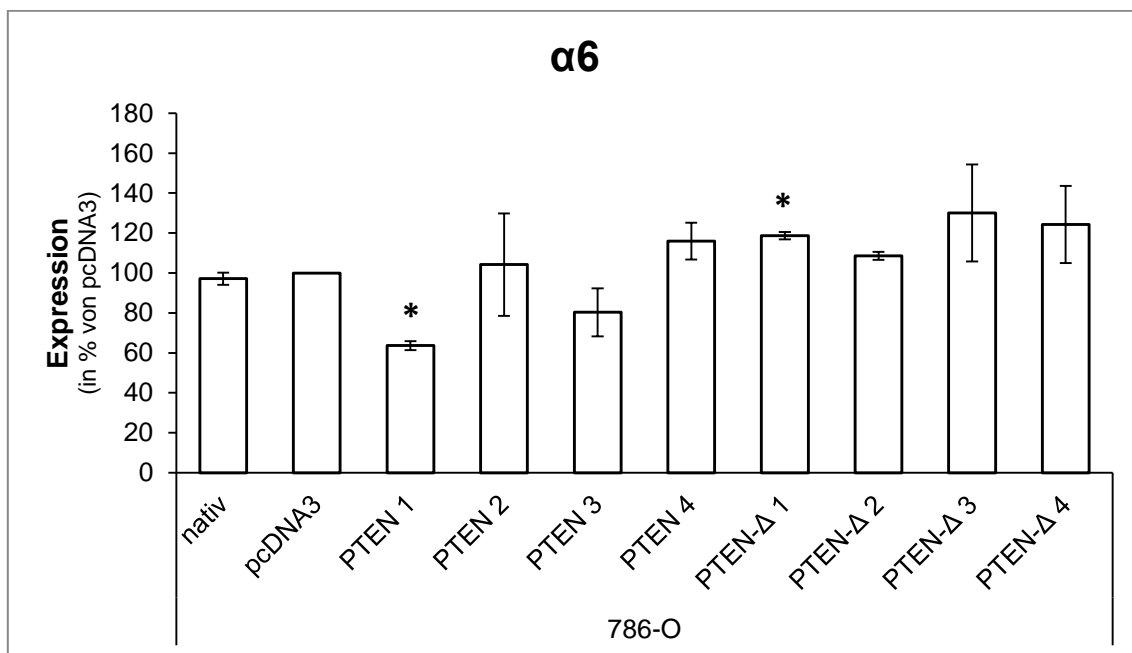


Abbildung 57: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 6$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Zelllinie A498 wies im Gegensatz zu den 786-O-Zellen eine Reduktion der Integrin $\alpha 6$ -Expression in den PTEN- Δ -Klonen auf. Bei PTEN- Δ 1 kam es zu einer Reduktion auf 68 % ($p = 0,024$) und bei PTEN- Δ 3 auf 64 % ($p = 0,025$). Die PTEN- Δ 2-Zellen wiesen nur eine leicht reduzierte Expression mit einem Wert von 94 % auf. Die transgenen PTEN A498-Zellen zeigten eine leicht erhöhte Expression von 141 %. Die Integrin $\alpha 6$ -Expression der nativen A498-Zellen betrug 68 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 58).

In den transgenen 786-O-Zellen schwankte die Integrin αV -Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen nur um maximal 29 %. Es kam in allen PTEN- und PTEN- Δ -Klonen zu einer leichten Erhöhung der Expression mit Ausnahme von PTEN 1, welche eine leichte Reduktion auf 77 % aufwies. Die Integrin

α V-Expression der nativen 786-O-Zellen betrug 134 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 59).

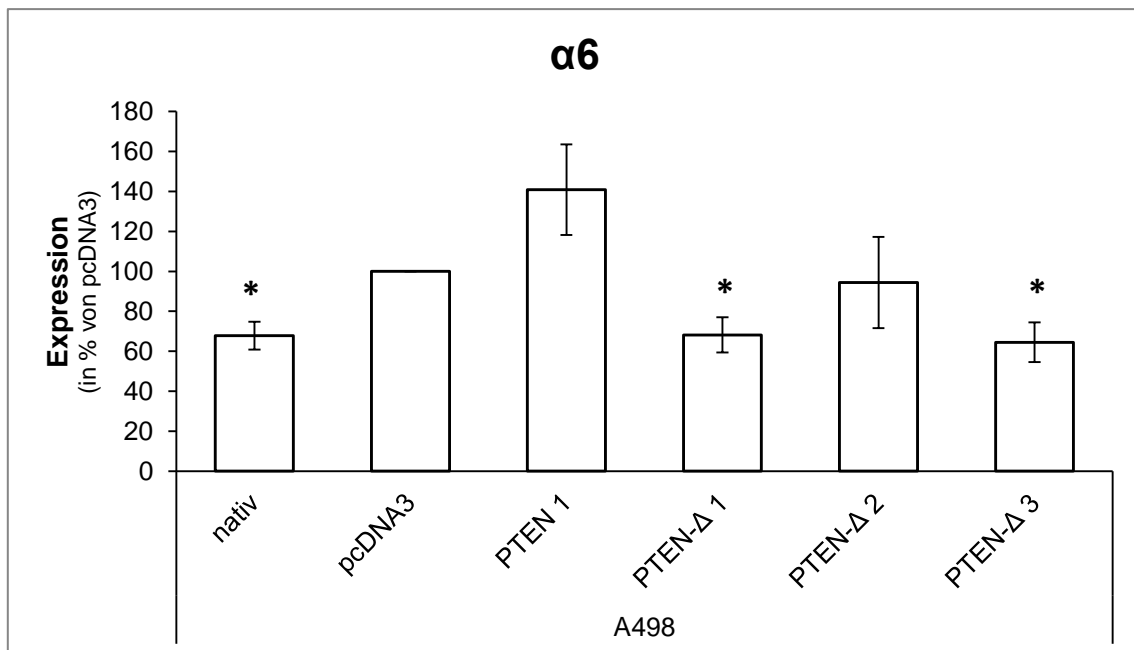


Abbildung 58: Expression der Integrin-Untereinheit α 6 in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

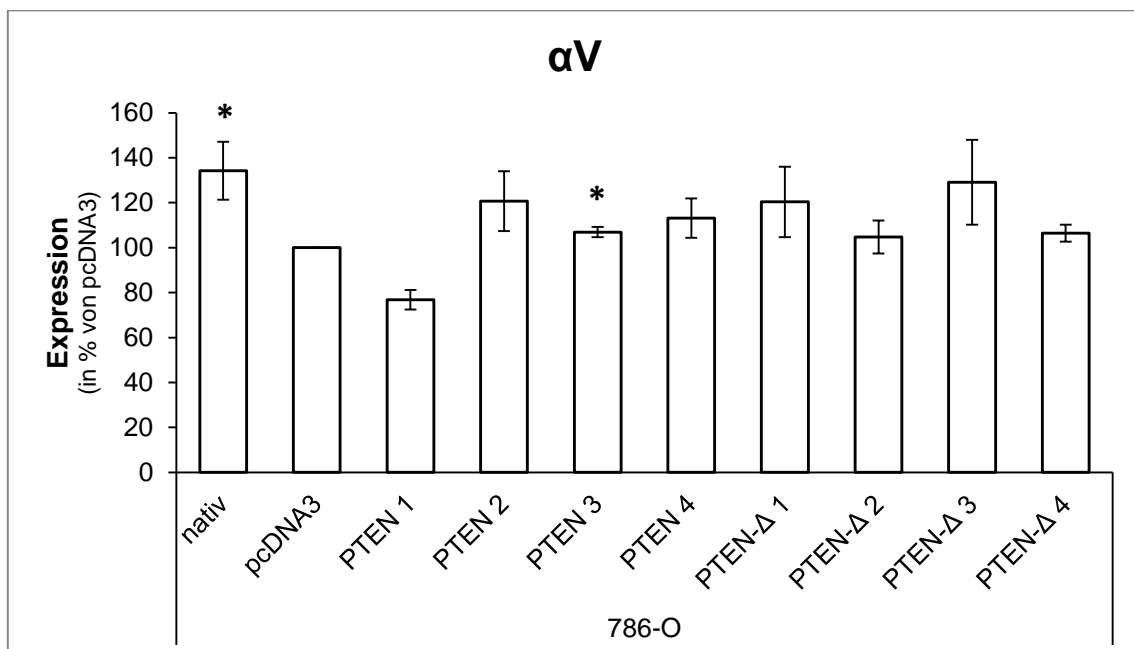


Abbildung 59: Expression der Integrin-Untereinheit α V in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die transgenen PTEN und PTEN- Δ A498-Zellen induzierten in allen Klonen eine leichte Reduktion der Integrin α V-Expression um maximal 19 %. Lediglich die PTEN- Δ 2-Zellen zeigten eine stärkere Reduktion der Expression auf 39 % ($p = 0,004$) auf. Die Integrin α V-Expression der nativen A498-Zellen betrug 58 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 60).

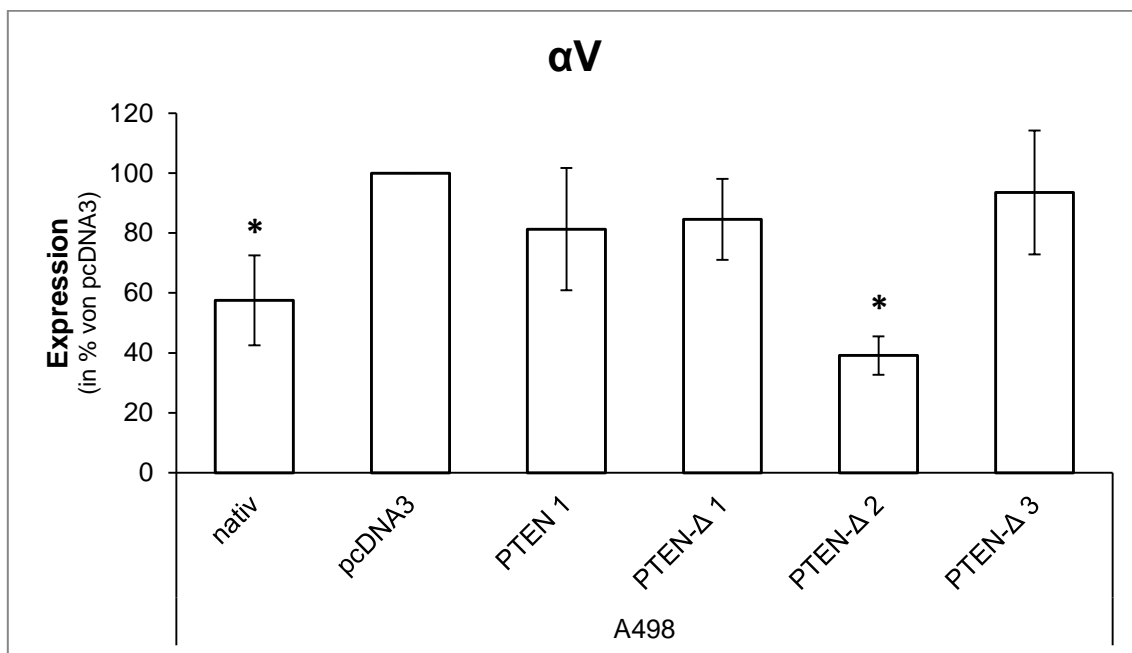


Abbildung 60: Expression der Integrin-Untereinheit α V in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Neben den α -Integrin-Untereinheiten wurde auch die Expression von den beiden β -Untereinheiten 1 und 3 analysiert. Die Expression von β 1 zeigte in den transgenen PTEN 786-O-Zellen keinen eindeutigen Trend. Während PTEN 2 und PTEN 3 keinen großen Unterschied zu den pcDNA3-Zellen aufwiesen, war die Expression bei PTEN 1 auf 63 % ($p = 0,019$) reduziert und bei PTEN 4 auf 175 % erhöht. PTEN- Δ induzierte eher eine gesteigerte Integrin β 1-Expression, welche sich vor allem bei PTEN- Δ 1 mit einem Wert von 179 % ($p = 0,023$) und bei PTEN- Δ 3 mit einer Steigerung auf 155 % zeigt. PTEN- Δ 2 zeigte keine Veränderung zu den pcDNA3-Zellen und bei PTEN- Δ 4 war eine leicht gesteigerte Expression um 18 % zu beobachten (Abbildung 61).

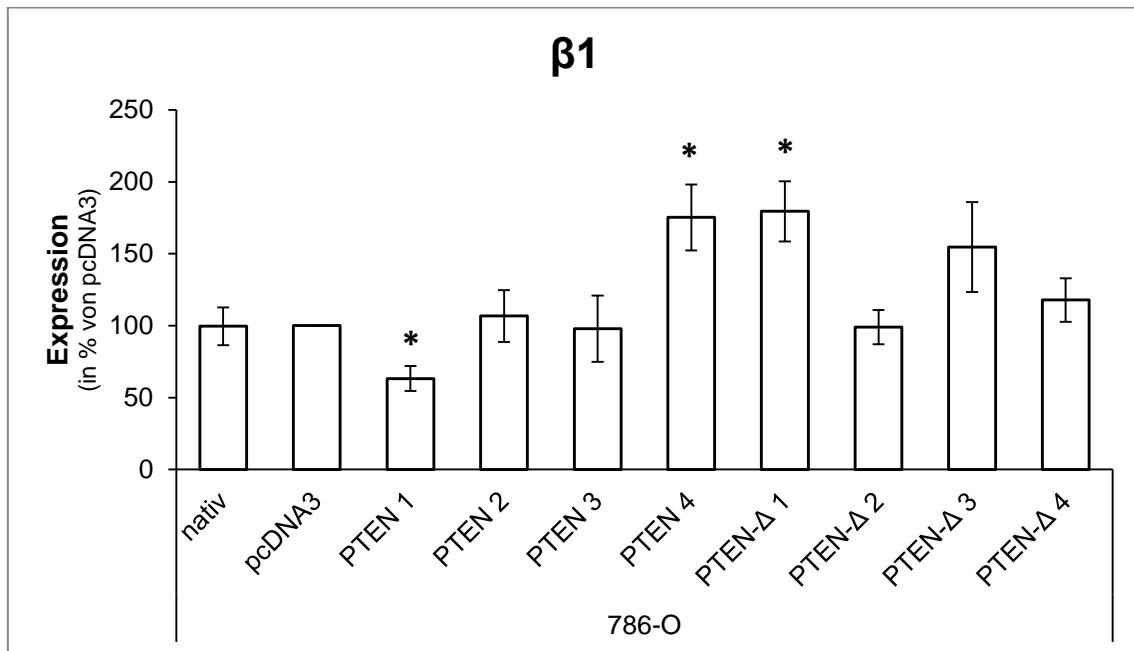


Abbildung 61: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In den transgenen A498-Zellen zeigte sich für die Integrin $\beta 1$ -Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen ein eindeutiges Bild. Bei PTEN 1 kam es zu einer leichten Steigerung der Expression auf 125 % ($p = 0,045$). PTEN- Δ induzierte in allen Klonen eine Reduktion der Integrin $\beta 1$ -Expression. Bei PTEN- Δ 1 war die Expression auf 71 % ($p = 0,029$), bei PTEN- Δ 2 auf 50 % ($p = 0,004$) und bei PTEN- Δ 3 auf 54 % ($p = 0,028$) reduziert. Die nativen A498-Zellen wiesen ebenfalls eine reduzierte Integrin $\beta 1$ -Expression auf (Abbildung 62).

Die Integrin $\beta 3$ -Expression war in allen transgenen PTEN und PTEN- Δ 786-O-Zellen sowie in den nativen 786-O-Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen erhöht. PTEN induzierte eine Steigerung der Expression auf 133 % bei PTEN 1, auf 160 % ($p = 0,006$) bei PTEN 2, auf 119 % bei PTEN 3 und auf 169 % ($p = 0,014$) bei PTEN 4. Die Integrin $\beta 3$ -Expression der PTEN- Δ -Klone war auf 187 % ($p = 0,033$) bei PTEN- Δ 1, auf 185 % ($p = 0,001$) bei PTEN- Δ 2, auf 268 % ($p = 0,015$) bei PTEN- Δ 3 und auf 119 % bei PTEN- Δ 4 erhöht (Abbildung 63).

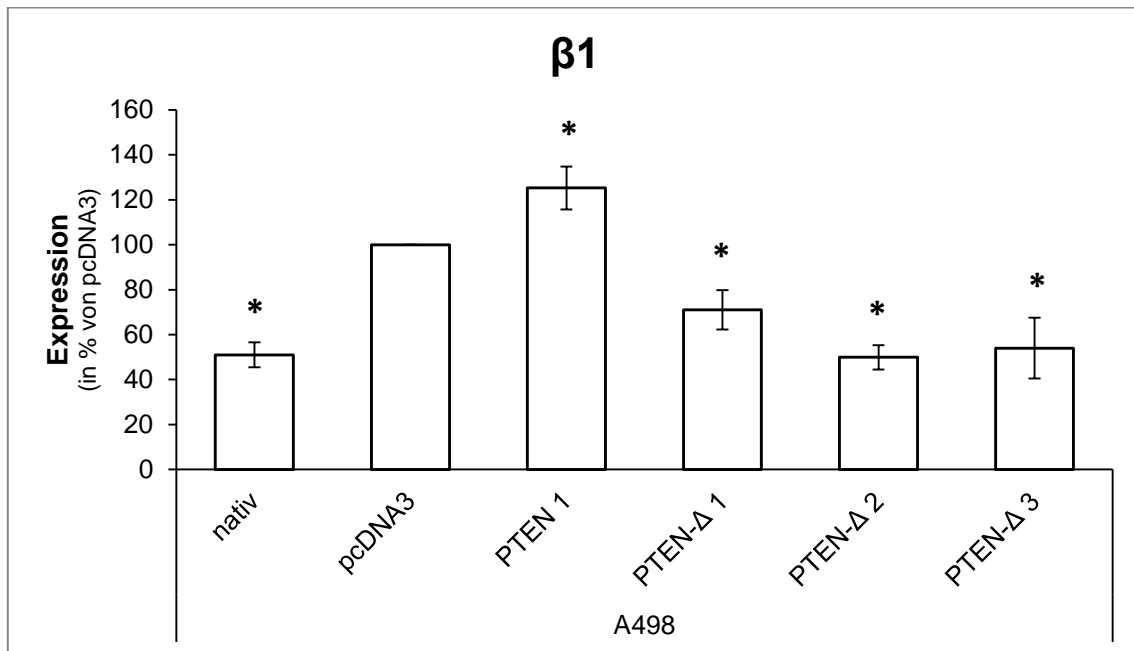


Abbildung 62: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

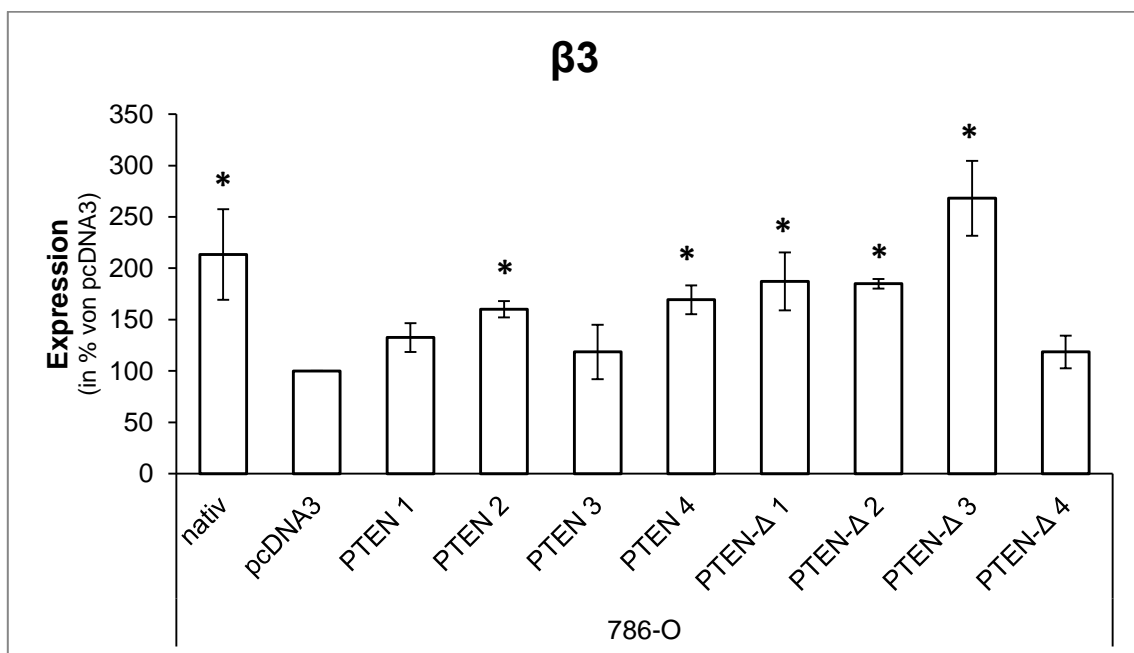


Abbildung 63: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Integrin $\beta 3$ -Expression in den transgenen PTEN und PTEN- Δ A498-Zellen war dagegen vorwiegend reduziert im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. PTEN induzierte eine Reduktion der Expression auf 75 %. Während die Integrin $\beta 3$ -Expression bei

PTEN- Δ 1 und PTEN- Δ 3 nur leicht reduziert bzw. nicht verändert auf 99 % bzw. 93 % war, wiesen die PTEN- Δ 2-Zellen eine Reduktion auf 36 % ($p < 0,001$) auf (Abbildung 64).

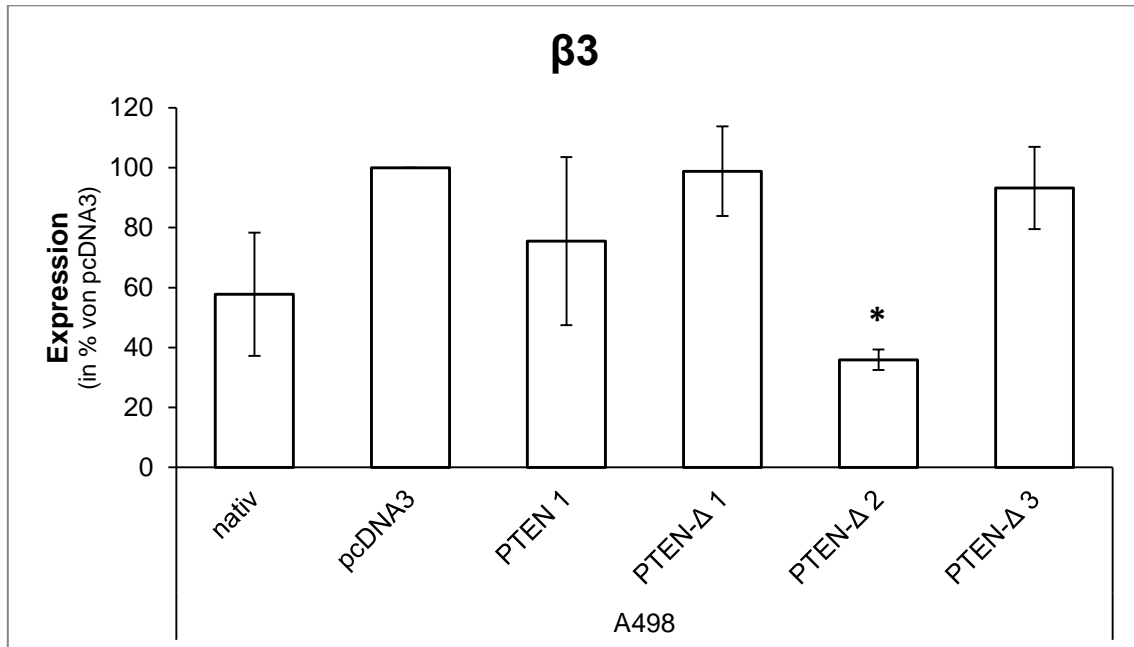


Abbildung 64: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Mediane aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Zusammenfassend zeigte sich für die transgenen PTEN und PTEN- Δ 786-O-Zellen, dass PTEN einen Einfluss auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 5$ sowie $\beta 3$ nimmt und dass PTEN- Δ die Expression der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 3$ beeinflusst. Während PTEN die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 5$ auf 67 % ($p = 0,028$) und 70 % reduzierte, zeigte sich für Integrin $\beta 3$ eine gesteigerte Expression auf 145 % ($p = 0,032$) in den PTEN-Klonen. Die Untereinheiten $\alpha 3$, αV und $\beta 1$ wurden von PTEN nur leicht beeinflusst. PTEN- Δ induzierte eine gesteigerte Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$ auf 127 %, $\alpha 3$ auf 175 % ($p = 0,022$), $\alpha 6$ auf 120 % ($p = 0,021$) und der beiden β -Untereinheiten $\beta 1$ auf 138 % und $\beta 3$ auf 190 %. Dagegen kam es zu einer Reduktion der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ (76 %) und $\alpha 5$ (74 %, $p = 0,029$) (Abbildung 65, Abbildung 66).

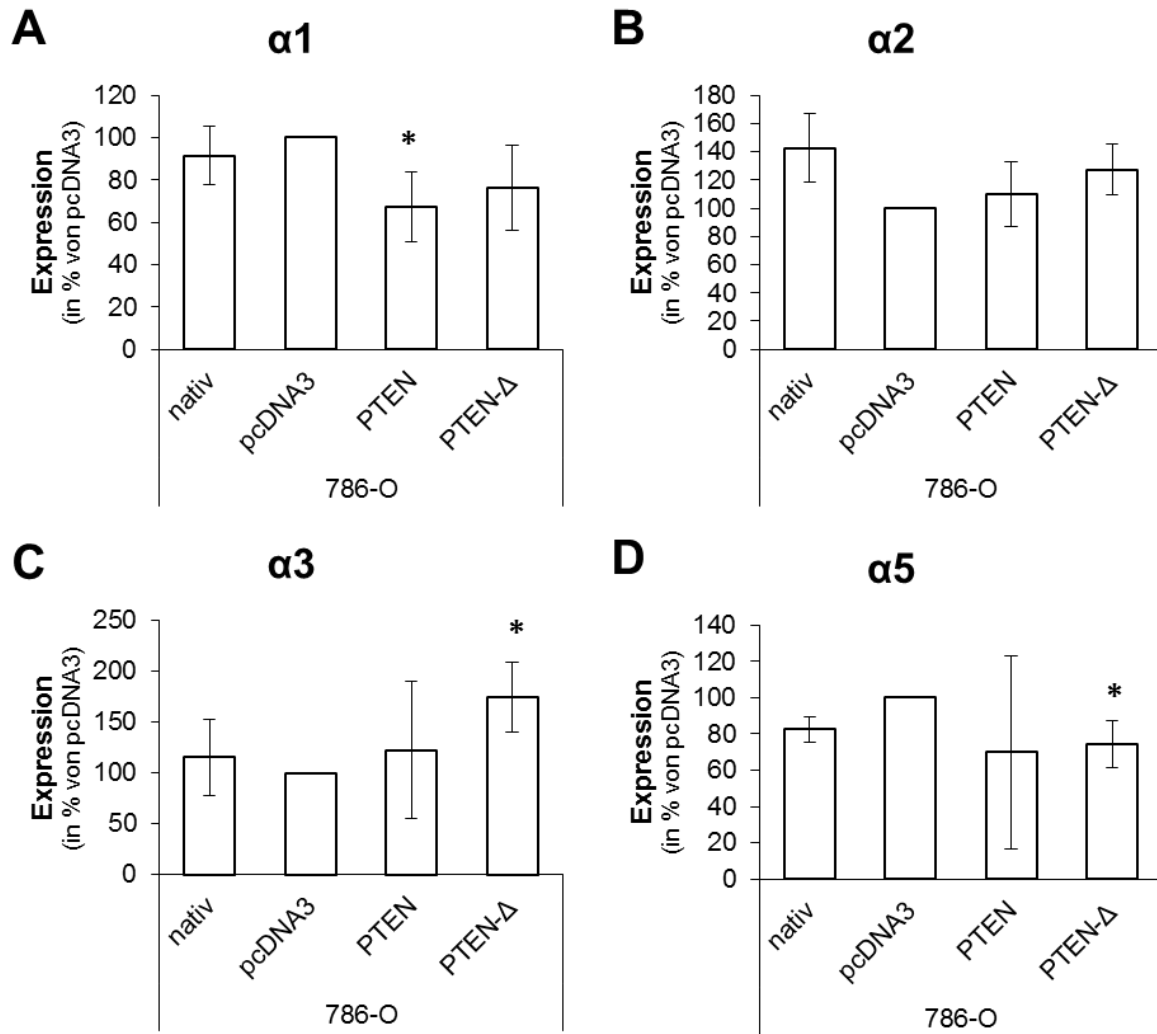


Abbildung 65: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 3$ (C) und $\alpha 5$ (D) der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

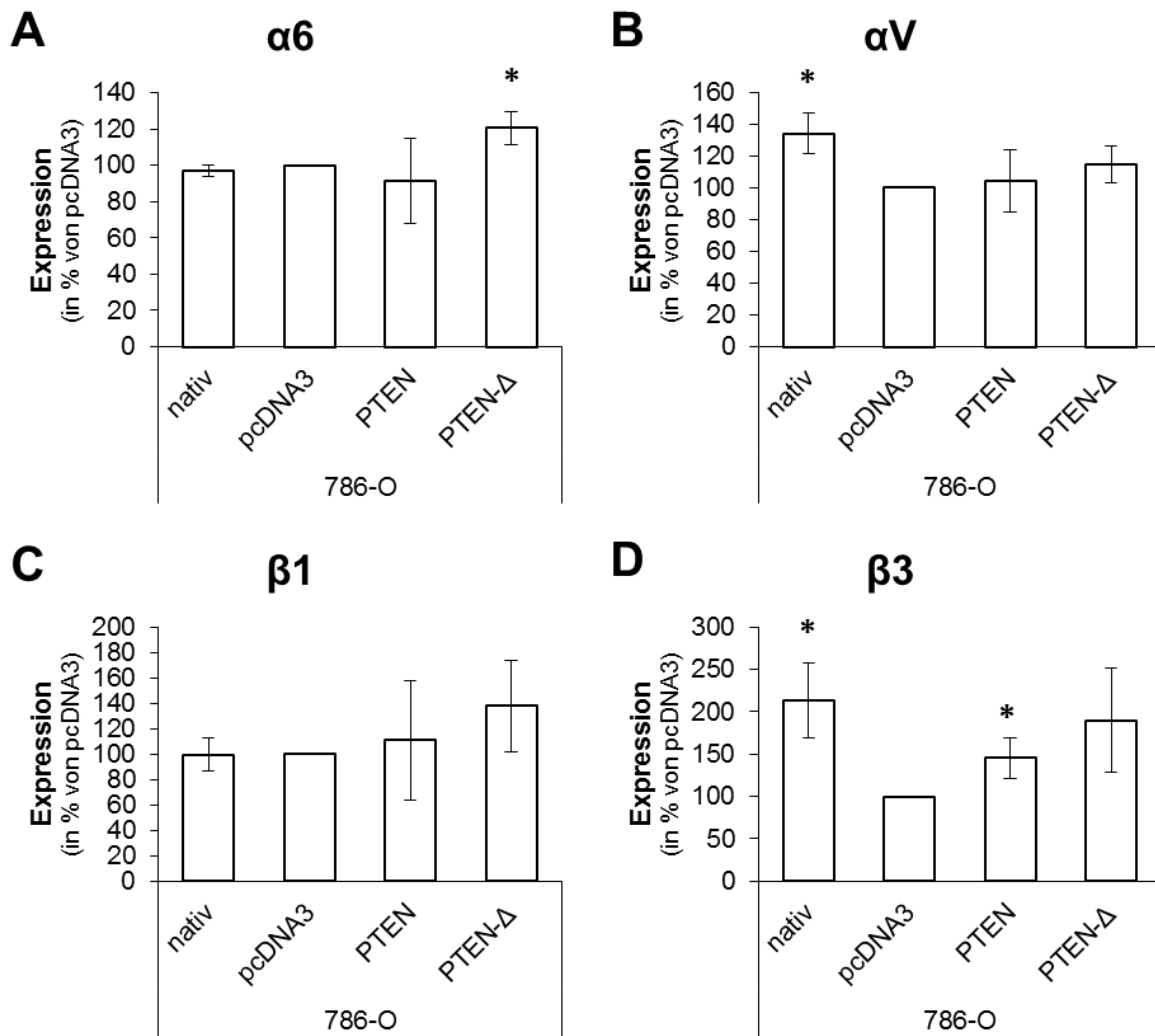


Abbildung 66: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten α6 (A), αV (B), β1 (C) und β3 (D) der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In den transgenen PTEN-Zellen der Zelllinie A498 zeigte sich für die Integrin-Untereinheiten α2 (170 %), α5 (137 %), α6 (141 %) und β1 (125 %) eine erhöhte Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Dagegen induzierte PTEN eine reduzierte Expression der Untereinheiten α1 (81 %), αV (81 %) und β3 (75 %). In den PTEN-Δ-Klonen der A498-Zellen konnte eine Reduktion der Expression in den Integrin-Untereinheiten α1 (56 %), α2 (83 %) α3 (73 %), α5 (57 %), α6 (76 %), αV (72 %), β1 (58 %, $p = 0,023$) und β3 (76 %) festgestellt werden (Abbildung 67, Abbildung 68).

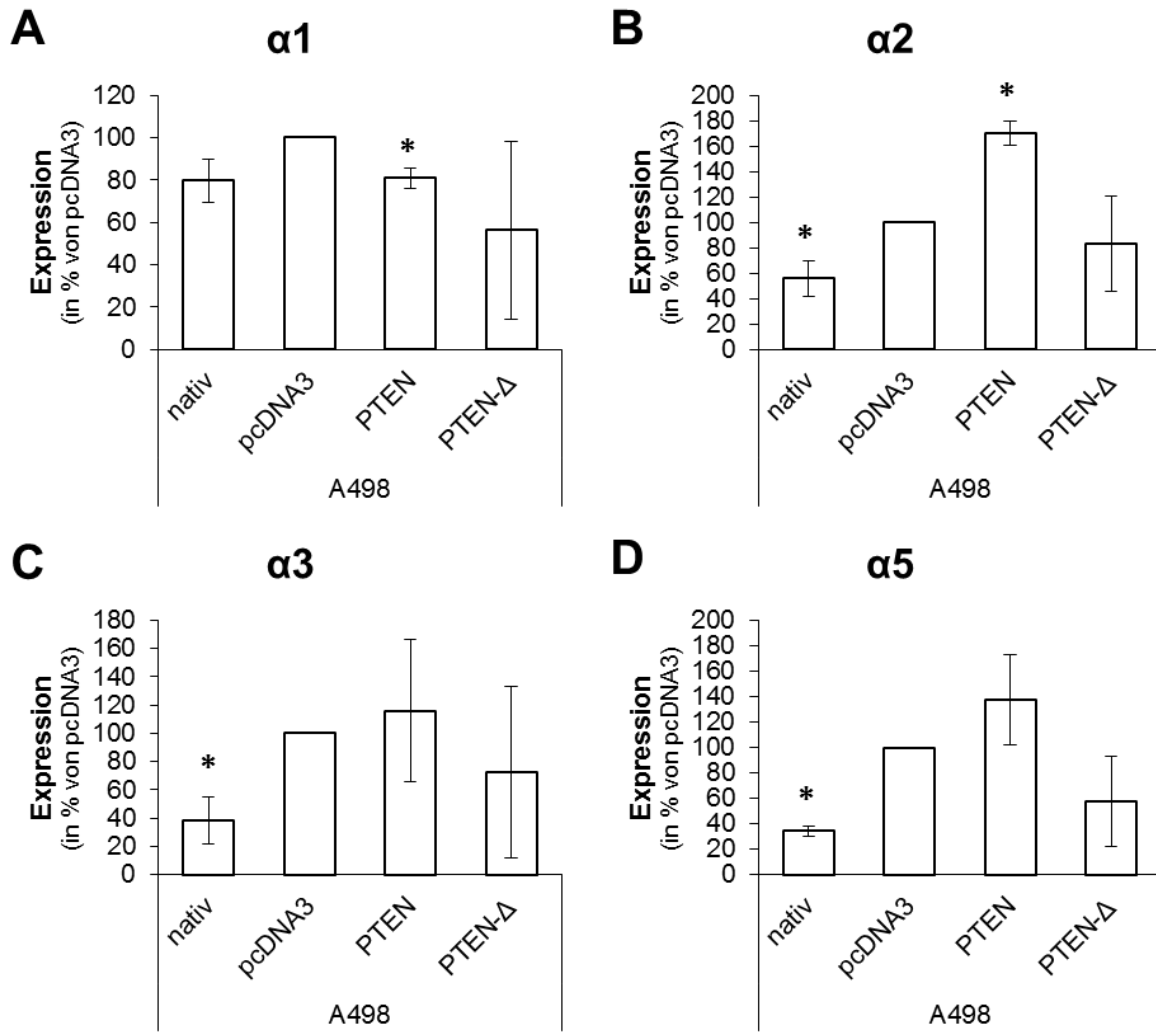


Abbildung 67: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 3$ (C) und $\alpha 5$ (D) der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanz wurde mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

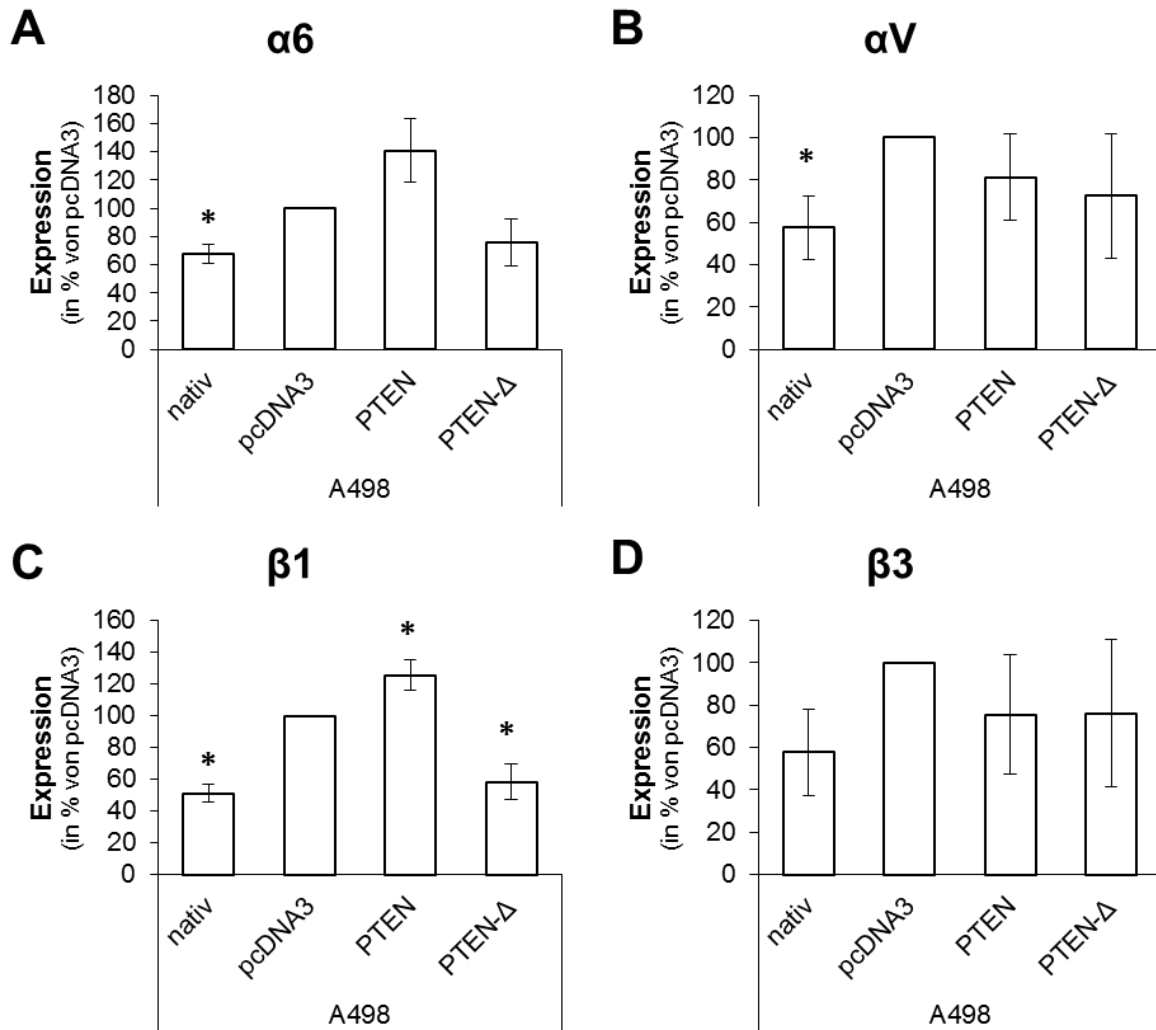


Abbildung 68: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten α6 (A), αV (B), β1 (C) und β3 (D) der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.4 Einfluss von PTEN-Δ auf die Proliferation

Die Proliferation der Tumorzellen ist essentiell für die Tumorprogression und führt zu einem ständigen Fortschreiten der Erkrankung. Insbesondere Tumorzellen, die in entfernte sekundäre Organe migriert sind, können erst durch Initiierung der Proliferation zu Metastasen heranwachsen. Der Einfluss von PTEN-Δ auf die Zellproliferation wurde mittels eines *in vitro* BrdU-basierten Assays untersucht. Die Proliferation der transgenen PTEN- und PTEN-Δ-Klone der 786-O-Zellen zeigte keinen eindeutigen Trend. Während die PTEN-Klone einen leichten Rückgang der Proliferationsfähigkeit von maximal 15 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen aufwiesen, schwankte die Proliferationsrate der PTEN-Δ 786-O-Zellen zwischen 85 %

und 123 %. Die Proliferation der nativen 786-O-Zellen betrug 148 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 69).

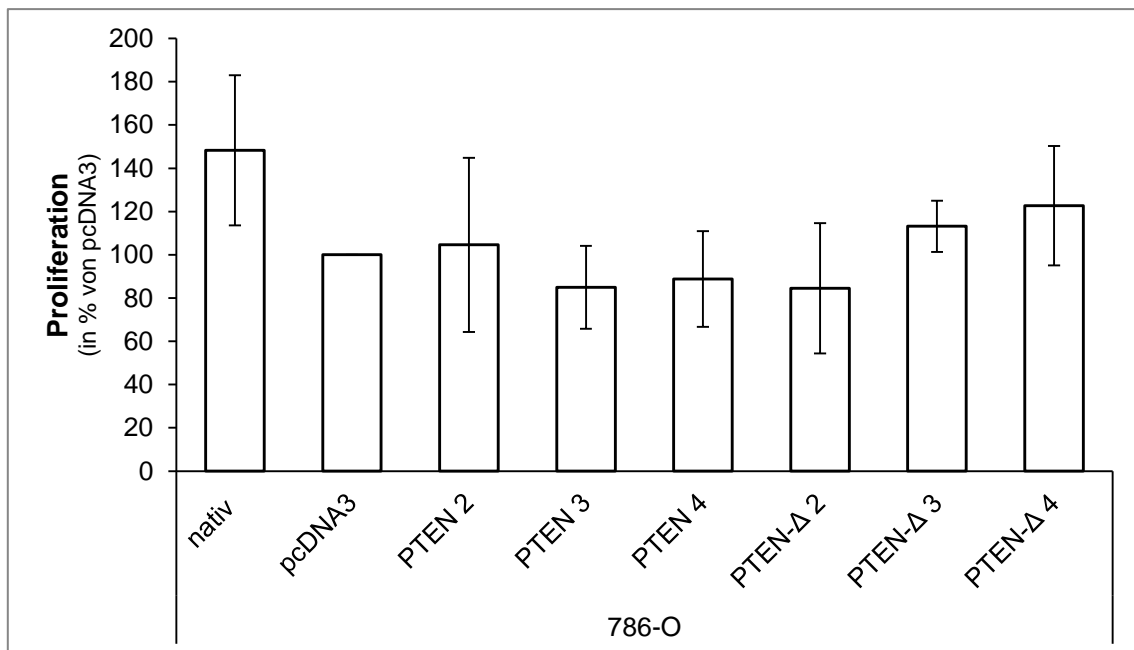


Abbildung 69: Proliferation der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie 786-O. Die Proliferation der Zellen wurde in einem BrdU-basierten Assay ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Proliferationsfähigkeit der transgenen A498-Zellen wies ebenfalls hohe Schwankungen auf. Insbesondere die nativen A498-Zellen unterschieden sich von den pcDNA3-Zellen. Hier zeigte sich eine Steigerung der Proliferation um 91 %. Auch die Proliferationsfähigkeit der PTEN A498-Zellen war leicht erhöht auf 138 %. Die Proliferationsfähigkeit der PTEN-Δ-Klone war sowohl erhöht bei PTEN-Δ 2 (200 %, $p = 0,044$) und PTEN-Δ 1 (124 %) als auch leicht erniedrigt bei PTEN-Δ 3 (93 %) (Abbildung 70).

Zusammenfassend zeigte sich, dass PTEN sowie PTEN-Δ in der Zelllinie 786-O nahezu keinen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen induzieren (Abbildung 71 B). In der Zelllinie A498 konnte keine eindeutige Tendenz festgestellt werden, jedoch induzierten PTEN und PTEN-Δ eher eine gesteigerte Proliferation. Diese ging allerdings nicht über die Proliferationsrate der nativen A498-Zellen hinaus (Abbildung 71 A).

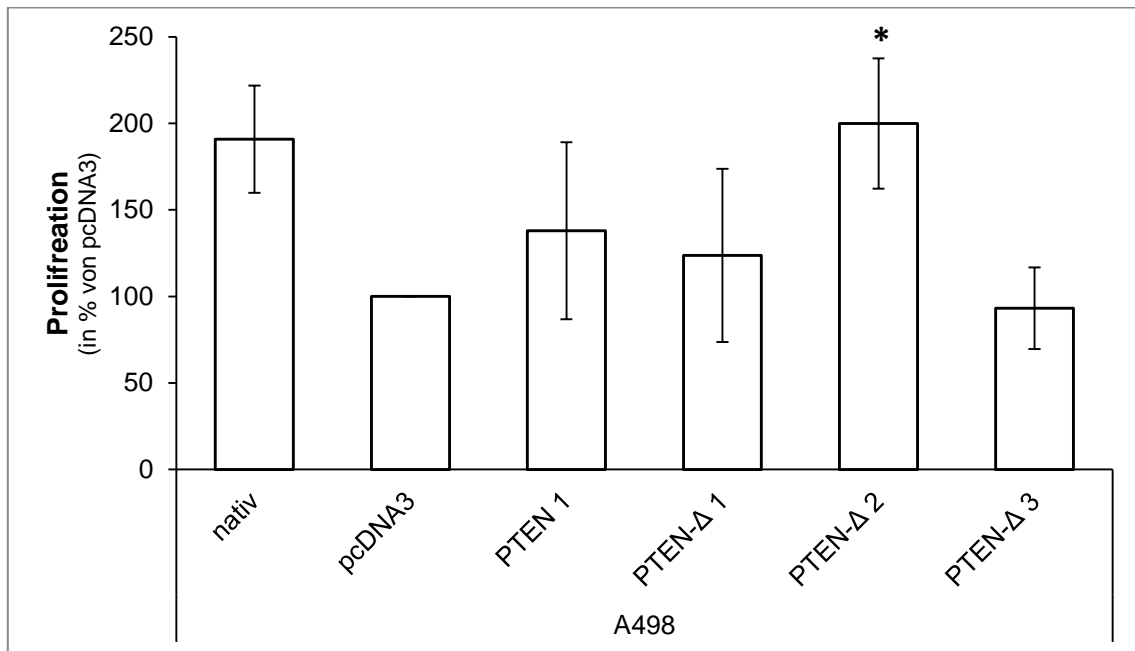


Abbildung 70: Proliferation der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie A498. Die Proliferation der Zellen wurde in einem BrdU-basierten Assay ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

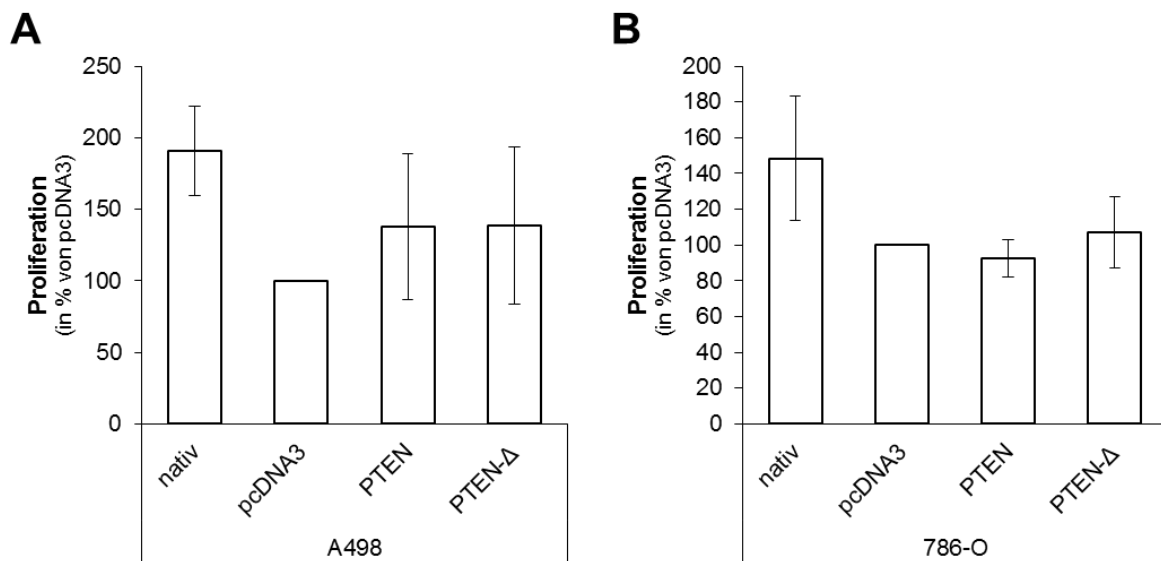


Abbildung 71: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Proliferation der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B). Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.5 Einfluss von PTEN- Δ auf die Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde mit zwei verschiedenen Assays analysiert, zum einem mit dem RealTime-Glo™ Assay der Firma Promega, in dem die Reduktionspotentiale über eine Luciferase gemessen werden, und zum anderen mit Hilfe von MTT, einem Farbstoff, welcher in der Zelle durch Reduktionsäquivalente reduziert wird. Im RealTime-Glo™ Assay zeigte sich, dass PTEN eine leichte Reduktion der Zellviabilität um maximal 22 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen induzierte. Die nativen 786-O-Zellen wiesen eine ähnliche Zellviabilität wie die pcDNA3-Zellen auf. PTEN- Δ induzierte sowohl eine Reduktion der Zellviabilität in PTEN- Δ 3 (0,57, $p = 0,01$) als auch eine leichte Steigerung bei PTEN- Δ 4 (1,18) (Abbildung 72).

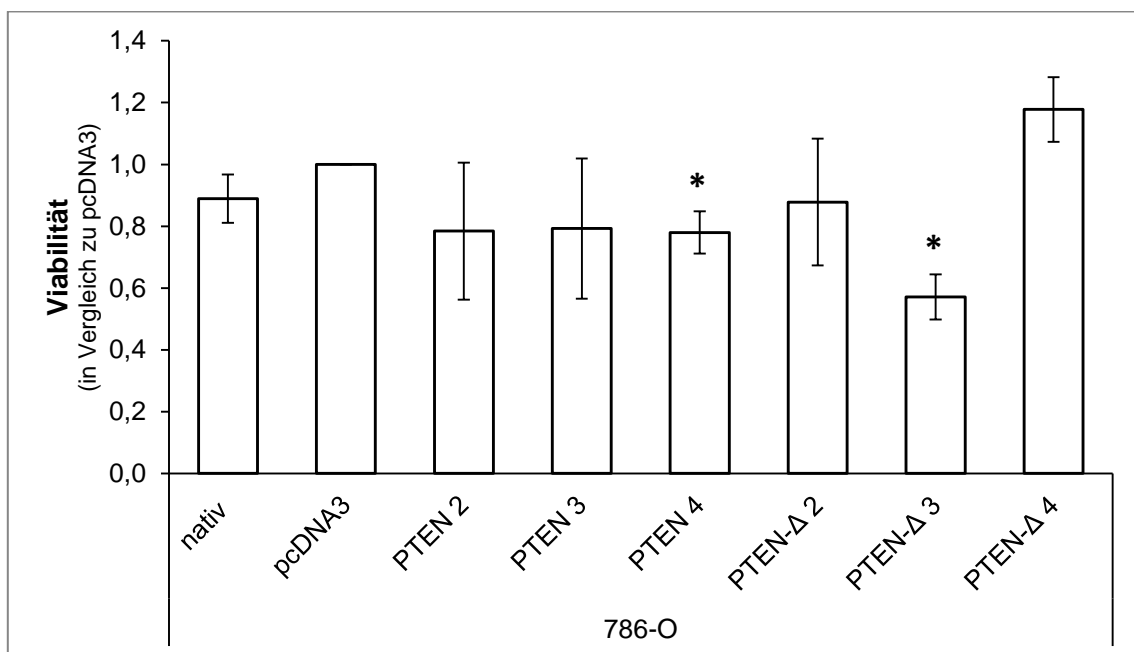


Abbildung 72: Zellviabilität der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O. Die Viabilität der Zellen wurde in einem RealTime-Glo™ Assay ermittelt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In der Zelllinie A498 zeigte sich ebenfalls, dass PTEN und PTEN- Δ keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität nehmen. Einzig die PTEN- Δ 2-Zellen wiesen eine gesteigerte Zellviabilität mit einem Wert von 2,14 auf. Die nativen A498-Zellen wichen von der Viabilität der pcDNA3-Zellen nur minimal ab (Abbildung 73).

Zusammenfassend zeigt sich für den RealTime-Glo™ Assay, dass die Zellviabilität der transgenen Zellen nur leicht von den pcDNA3-Zellen abweicht. In der Zelllinie 786-O kam es bei PTEN und PTEN- Δ zu einem leichten Abfall der Zellviabilität auf 0,79 bzw. 0,88 (Abbildung 74 B). Dagegen wiesen die transgenen PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 einen leichten Anstieg der Zellviabilität auf (1,14 bzw. 1,36) (Abbildung 74 A).

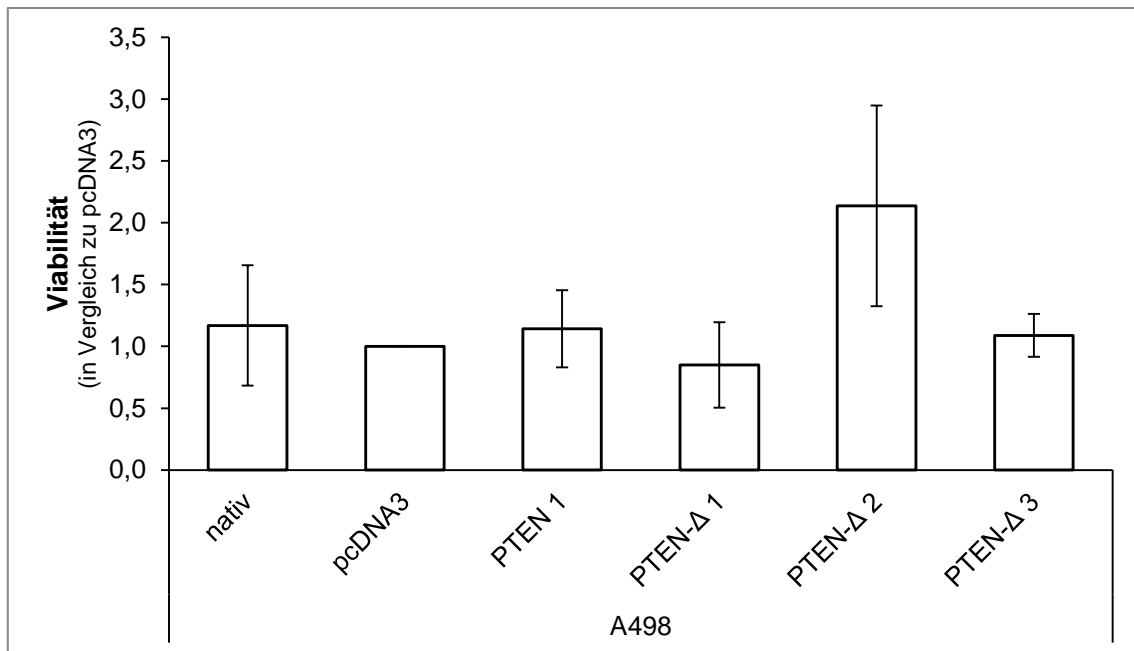


Abbildung 73: Zellviabilität der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498. Die Viabilität der Zellen wurde in einem RealTime-Glo™ Assay ermittelt. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

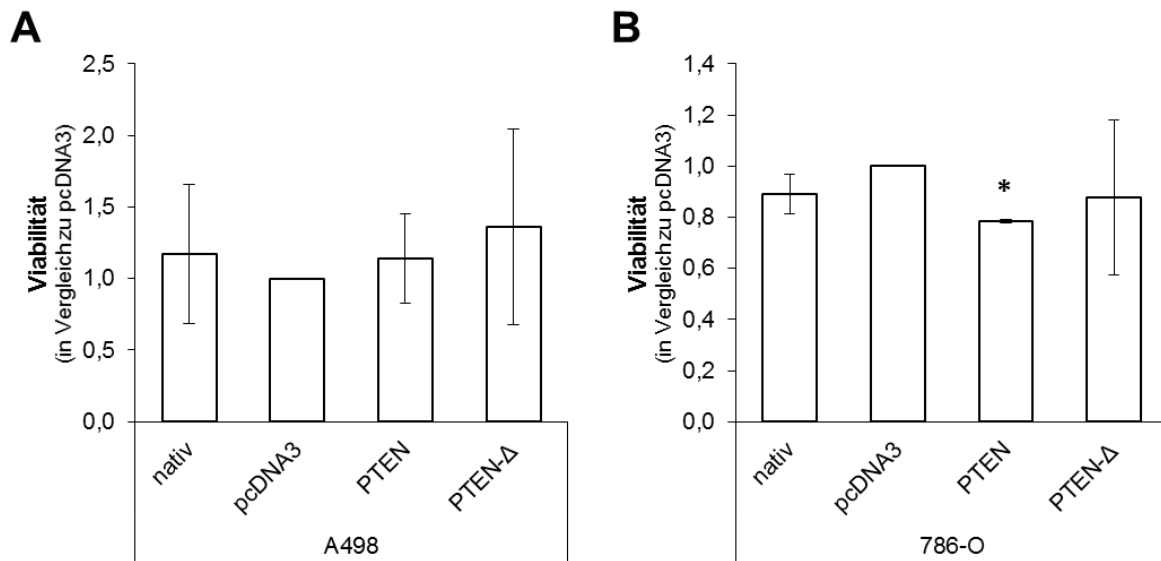


Abbildung 74: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Zellviabilität der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B). Dargestellt sind die gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen des RealTime-Glo™ Assays. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Zellviabilität im MTT-Assay zeigte für die transgenen 786-O-Zellen, dass PTEN und PTEN-Δ eine leichte Steigerung im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen induzieren. Jedoch betrug die Zellviabilität der nativen 786-O-Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen 176 % (Abbildung 75).

In der Zelllinie A498 induzierten PTEN und PTEN-Δ eine Reduktion der Zellviabilität um 33 % bei PTEN 1 ($p = 0,039$) und um maximal 44 % bei PTEN-Δ 2 ($p = 0,004$). Die Zellviabilität der nativen A498-Zellen war im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen leicht erniedrigt (Abbildung 76).

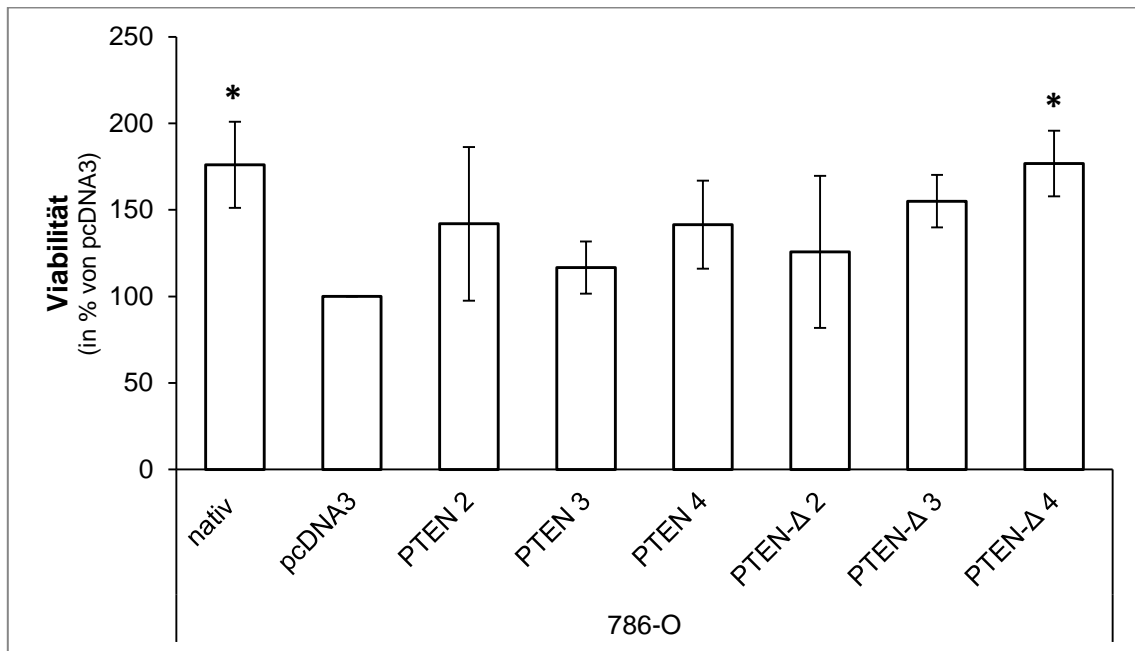


Abbildung 75: Zellviabilität der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie 786-O. Die Viabilität der Zellen wurde in einem MTT-Assay ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

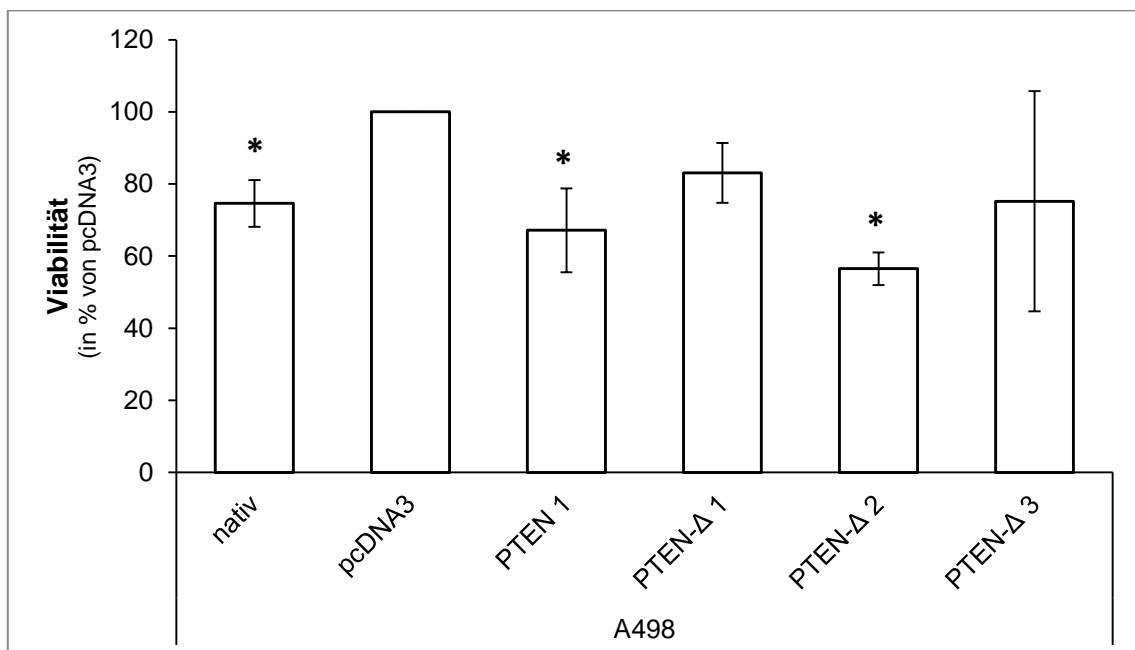


Abbildung 76: Zellviabilität der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie A498. Die Viabilität der Zellen wurde in einem MTT-Assay ermittelt. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Fasst man die einzelnen Klone der jeweiligen Zelllinien zusammen zeigt sich, dass PTEN und PTEN-Δ nur einen leichten Einfluss auf die Zellviabilität nehmen. Im

Gegensatz zum *RealTime-Glo*TM Assay kam es im MTT-Assay zu einer leichten Erhöhung der Zellviabilität in den transgenen 786-O-Zellen (Abbildung 77 B). Dagegen induzierten PTEN und PTEN- Δ in der Zelllinie A498 eine leichte Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 77 A).

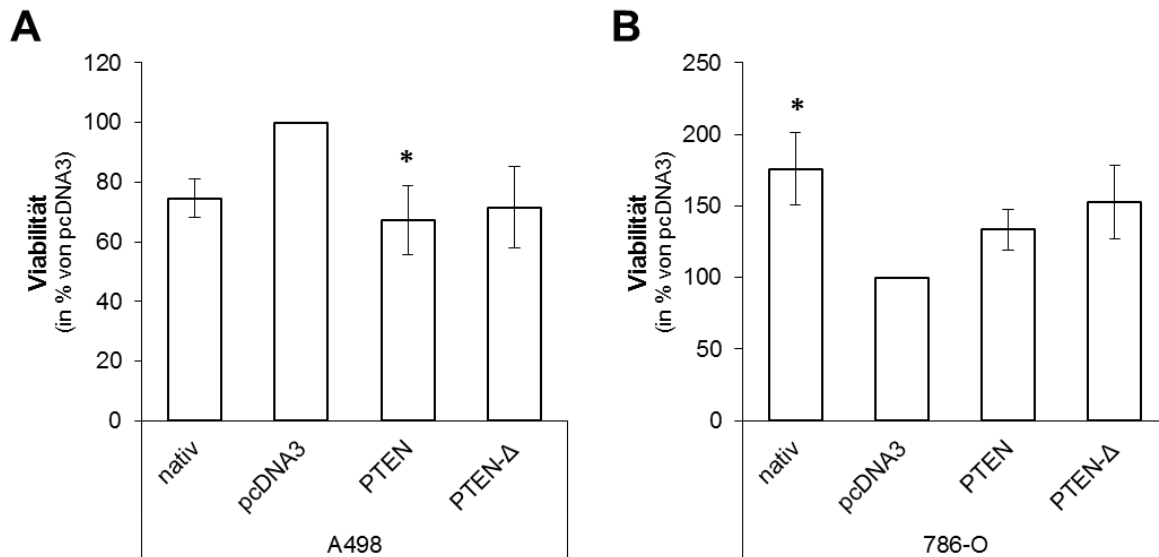


Abbildung 77: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Zellviabilität der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B). Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen des MTT-Assays. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.6 Einfluss von PTEN- Δ auf die Apoptose

Neben den tumorfördernden zellulären Prozessen wie Migration, Adhäsion und Proliferation spielt in der Tumorprogression auch die Apoptose eine wichtige Rolle. In vielen Tumorentitäten ist die Apoptoserate der Tumorzellen durch Aktivierung von Onkogenen oder durch Hemmung von Tumorsuppressoren reduziert. Um den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Apoptoserate zu analysieren wurde ein *in vitro* Assay durchgeführt. In den transgenen 786-O-Zellen kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Steigerung der Apoptoserate. PTEN induzierte eine erhöhte Apoptoserate bei PTEN 1 auf 107 % und bei PTEN 3 auf 118 %. Die Klone PTEN 2 und PTEN 4 wiesen keine Veränderung der Apoptose im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. PTEN- Δ induzierte in allen Klonen eine erhöhte Apoptoserate auf 106 % bei PTEN- Δ 1, auf 121 % bei PTEN- Δ 2, auf 218 % bei PTEN- Δ 3 und auf 115 % bei PTEN- Δ 4. Die nativen 786-O-Zellen zeigten keine Veränderung zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 78).

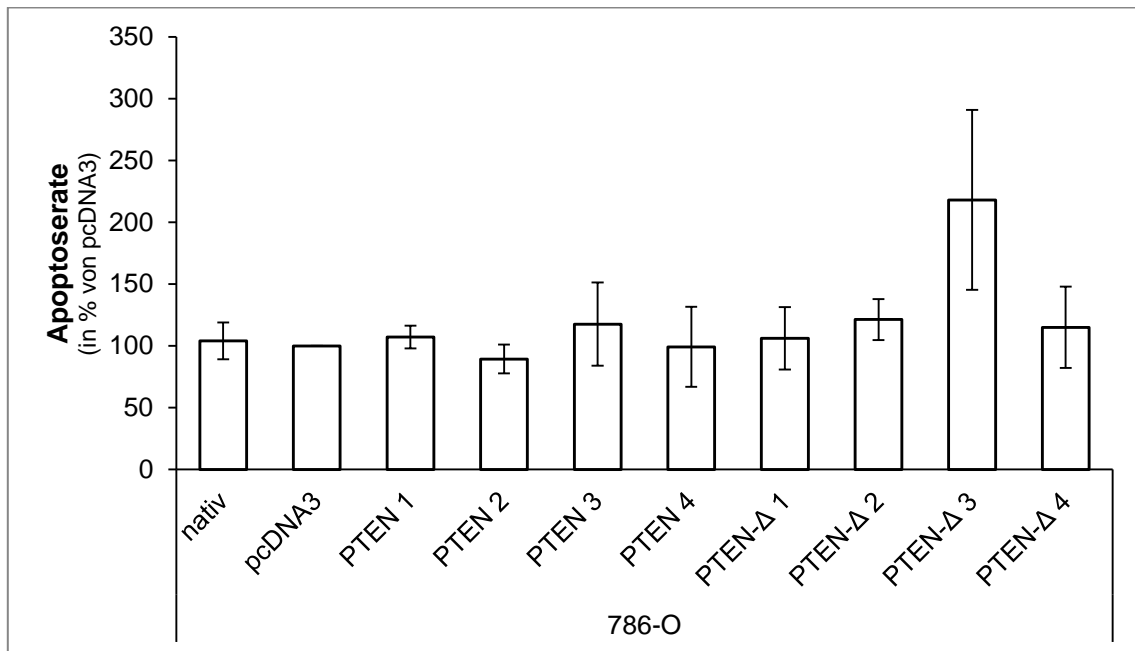


Abbildung 78: Apoptoserate der PTEN- und PTEN-Δ-Klone der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen 786-O-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Apoptoserate in den transgenen PTEN und PTEN-Δ A498-Zellen war ebenfalls in allen Klonen erhöht. Die nativen A498-Zellen wiesen keine Veränderung im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. Bei PTEN 1 kam es zu einer Steigerung der Apoptoserate um 52 % ($p = 0,038$). PTEN-Δ induzierte eine erhöhte Apoptose auf 136 % ($p = 0,028$) bei PTEN-Δ 1, auf 687 % ($p = 0,011$) bei PTEN-Δ 2 und auf 131 % bei PTEN-Δ 3 (Abbildung 79).

Zusammenfassend konnte sowohl für PTEN als auch für PTEN-Δ ein positiver Effekt auf die Apoptoserate in beiden Zelllinien festgestellt werden. In der Zelllinie A498 kam es zu einer Steigerung der Apoptose um 52 % ($p = 0,038$) bei PTEN und um 218 % ($p = 0,359$) bei PTEN-Δ (Abbildung 80 A). Die transgenen 786-O-Zellen wiesen nur in den PTEN-Δ-Klonen eine eindeutige Erhöhung der Apoptose von 40 % auf (Abbildung 80 B).

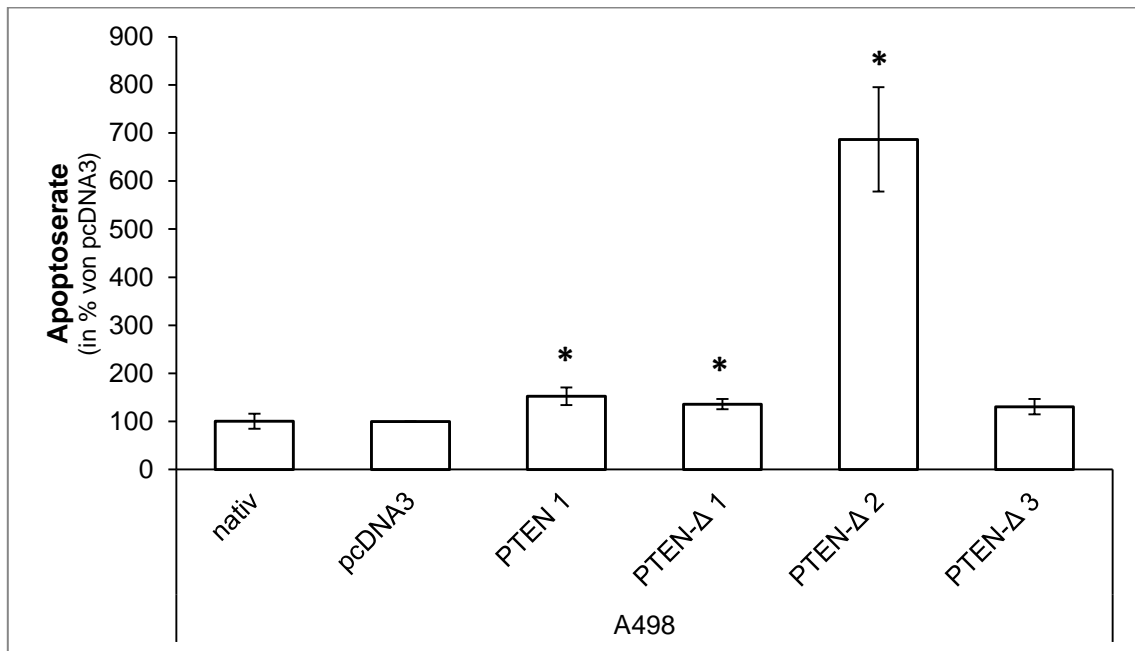


Abbildung 79: Apoptoserate der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-transgenen A498-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

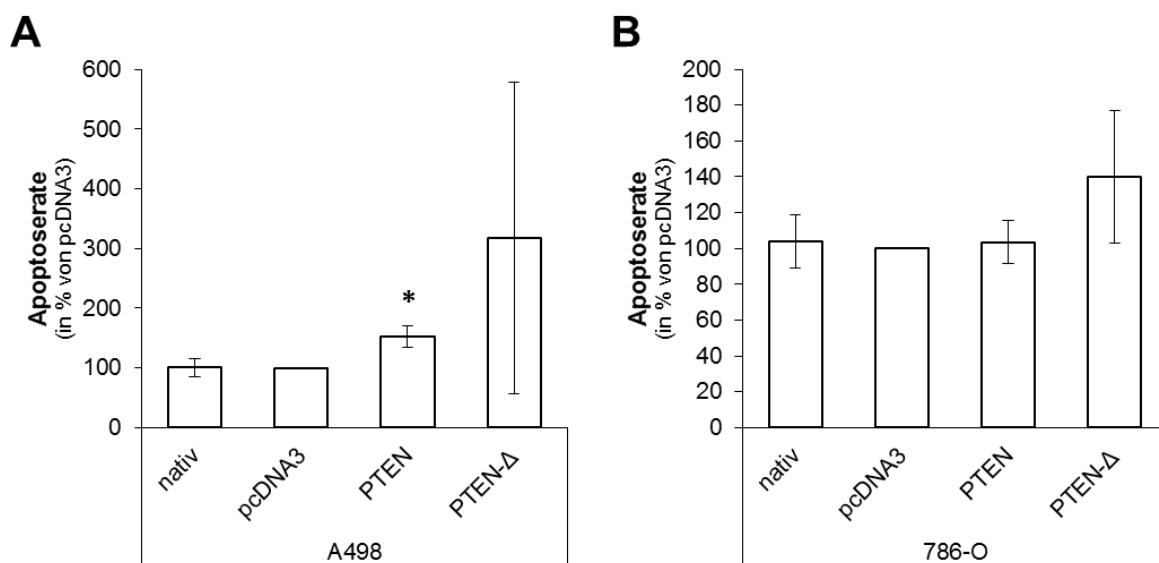


Abbildung 80: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Apoptose der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B). Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.7 Bedeutung nachgeschalteter Signalkaskaden

3.3.7.1 Screening der Aktivität von 45 Kinasen

An der Regulation von zellulären Prozessen wie Migration, Adhäsion, Proliferation und Apoptose sind viele komplexe Signalkaskaden beteiligt. Um einen ersten Überblick über mögliche beteiligte Signalmoleküle, die an den PTEN bzw. PTEN- Δ induzierten Regulationen beteiligt sein könnten, zu erhalten, wurde ein Phospho-Kinase Array durchgeführt. Dieser ermittelt gleichzeitig die Aktivität von 45 Kinasen. Im Folgenden sind die Aktivitäten der Kinasen dargestellt, welche eine deutliche Veränderung in den transgenen Zellen aufwiesen.

PTEN induzierte eine Reduktion der Aktivität der JNK-Kinase in den A498-Zellen. In der 786-O-Zelllinie kam es dagegen zu einem leichten Anstieg der Aktivität. PTEN- Δ induzierte in beiden Zelllinien eine verringerte JNK-Aktivität um etwa 30 %. Die Aktivität der Kinase p38 α war in den transgenen PTEN-Zellen unverändert, jedoch in den PTEN- Δ -Zellen deutlich erniedrigt. In der Zelllinie A498 kam es zu einer Reduktion auf 61 %. Die Aktivität der Kinasen ERK1/2 zeigte in den beiden Zelllinien ein unterschiedliches Bild. Während die transgenen PTEN- und PTEN- Δ -Zellen der Zelllinie 786-O eine deutlich gesteigerte Aktivität aufwiesen, war die ERK1/2-Aktivität in den transgenen A498-Zellen nur bei PTEN- Δ leicht erniedrigt (Abbildung 81).

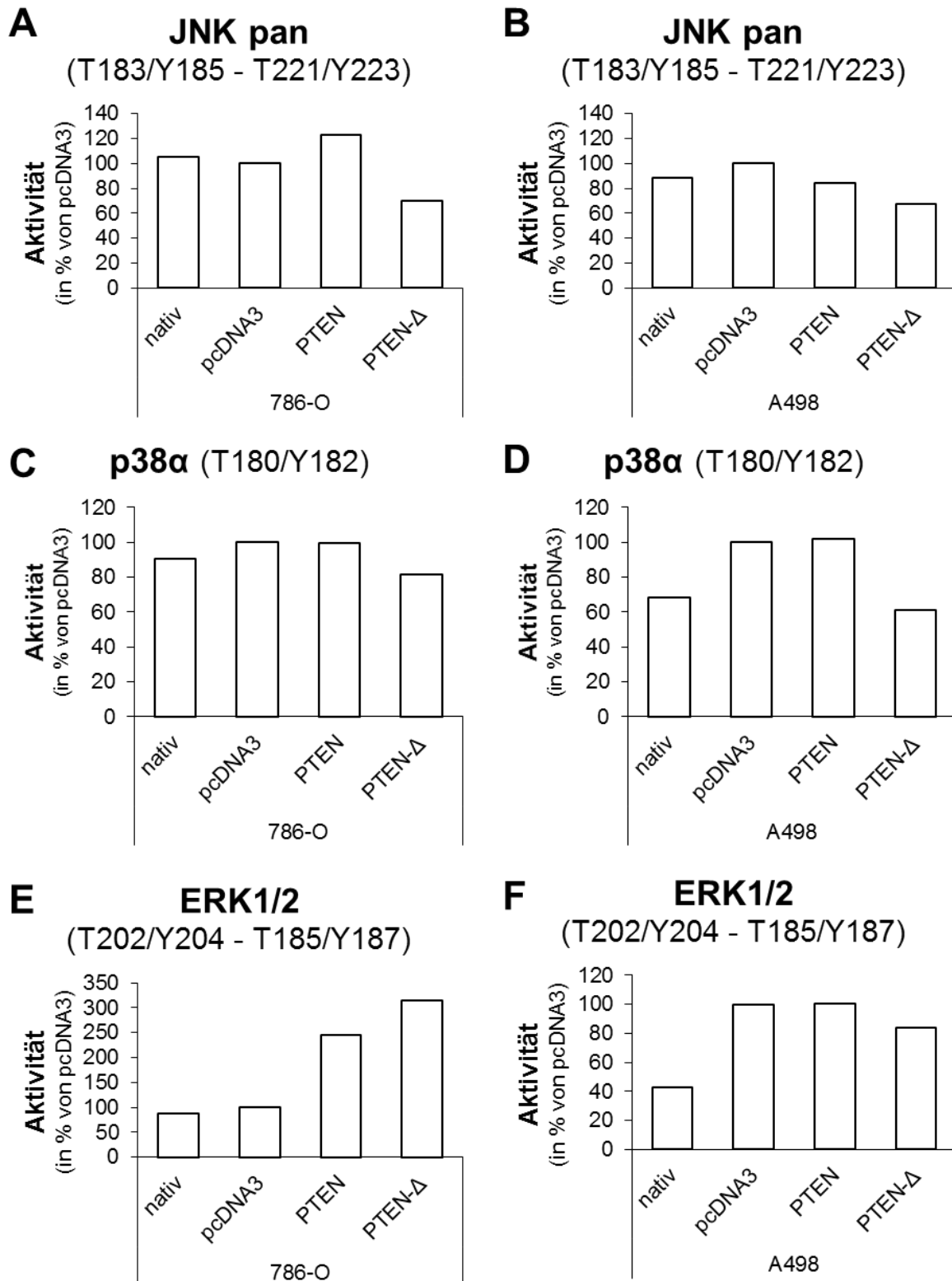


Abbildung 81: Einfluss von PTEN bzw. PTEN-Δ auf die Aktivität der Kinasen JNK pan (A, B), p38α (C, D) und ERK1/2 (E, F). Dargestellt sind die prozentualen Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen für die Zelllinien 786-O (A, C, E) und A498 (B, D, F).

Die Proteinkinase AKT wird in der AKT-Signalkaskade von PtdIns(3,4,5)P₃ an die Zellmembran rekrutiert und aktiviert. AKT wirkt auf viele verschiedene zelluläre Prozesse ein. PTEN ist in dieser Kaskade ein wichtiger Gegenspieler, in dem die

Phosphatase, die von der PI3K-hergestellten $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ wieder zu $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ hydrolysieren kann. Die Aktivierung von AKT erfolgt über zwei verschiedene Phosphorylierungen. Zum einen wird AKT an der Stelle T308 von der PDK1 phosphoryliert, zum anderen kann mTORC2 AKT an S473 phosphorylieren. Im Phospho-Kinase Array zeigte sich, dass sowohl PTEN als auch PTEN- Δ die Aktivität von AKT an S473 negativ beeinflussen. In der Zelllinie 786-O kam es zu einer Reduktion der Aktivität auf 42 % bei PTEN und 78 % bei PTEN- Δ . Bei den A498-Zellen induzierte PTEN eine Verringerung auf 85 % und bei PTEN- Δ auf 60 %. Die Phosphorylierungsstelle T308 wies dagegen keine deutlichen Veränderungen in den transgenen Zellen auf. Lediglich in den A498-Zellen induzierte PTEN- Δ eine reduzierte Aktivität um 15 % (Abbildung 82).

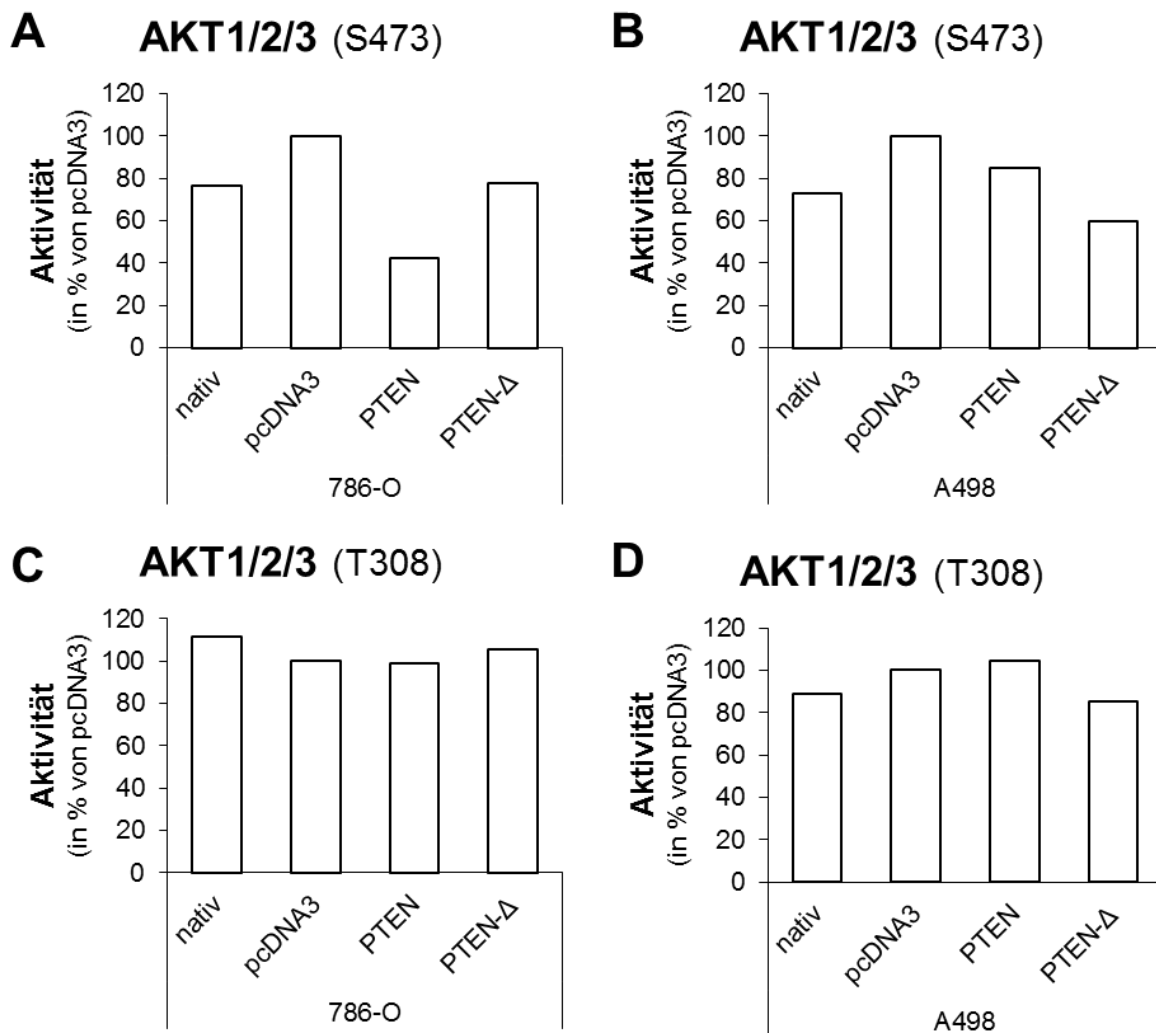


Abbildung 82: Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Aktivität der Kinasen AKT1/2/3 für die Phosphorylierungsstelle S473 (A, B) und T308 (C, D). Dargestellt sind die prozentualen Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen für die Zelllinien 786-O (A, C) und A498 (B, D).

Des Weiteren zeigte sich für PTEN- Δ eine deutliche Reduktion der Aktivität von β -Catenin. In der Zelllinie 786-O induzierte PTEN- Δ eine Reduktion auf 61 % und in der Zelllinie A498 auf 53 %. Der Transkriptionsfaktor CREB war in den PTEN- und PTEN- Δ -Zellen unterschiedlich aktiv. Während PTEN eine Steigerung induzierte, wiesen die PTEN- Δ -Zellen eine leichte Steigerung in den 786-O-Zellen und eine leicht reduzierte Aktivität in den A498-Zellen auf (Abbildung 83).

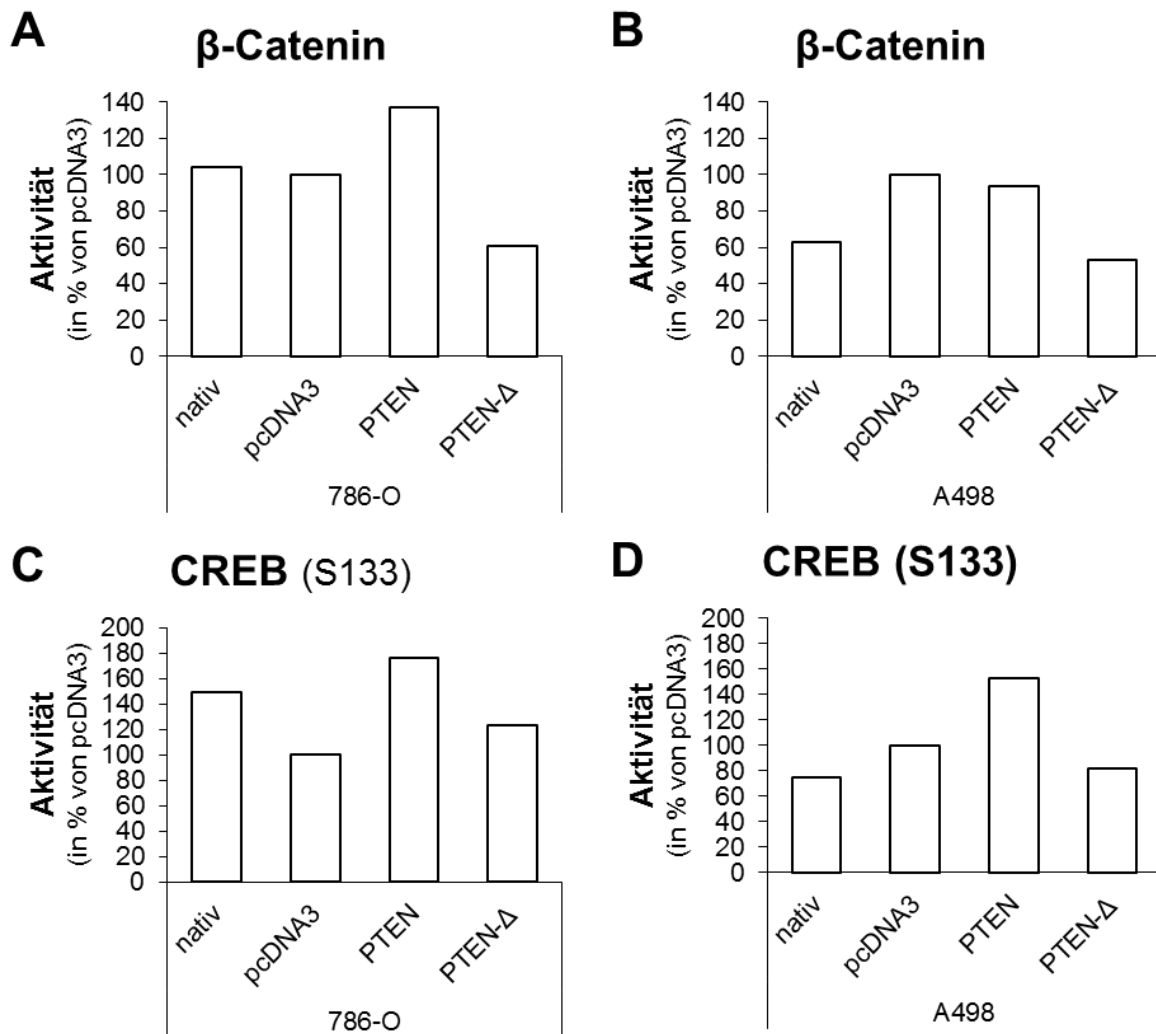


Abbildung 83: Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Aktivität der Signalmoleküle β -Catenin (A, B) und CREB (C, D). Dargestellt sind die prozentualen Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen für die Zelllinien 786-O (A, C) und A498 (B, D).

3.3.7.2 Validierung relevanter Kinasen im Westernblot

Der Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf relevante Kinasen, welche sich aus dem Phospho-Kinase Array ergaben, sollte im Anschluss im Westernblot validiert werden. Hierzu wurden die ausgewählten Kinasen in den einzelnen Klonen in drei unabhängigen Proteinextrakten analysiert. In der Zelllinie 786-O induzierte PTEN eine Steigerung der JNK-Aktivität in den Klonen PTEN 1 auf 252 % und in PTEN 4 auf 178 %. Die verringerte Aktivität im Phospho-Kinase Array konnte für PTEN- Δ nicht bestätigt werden. In allen PTEN- Δ -Zellen kam es zu einer gesteigerten JNK-Aktivität auf maximal 310 % ($p = 0,049$) bei PTEN- Δ 3 (Abbildung 84).

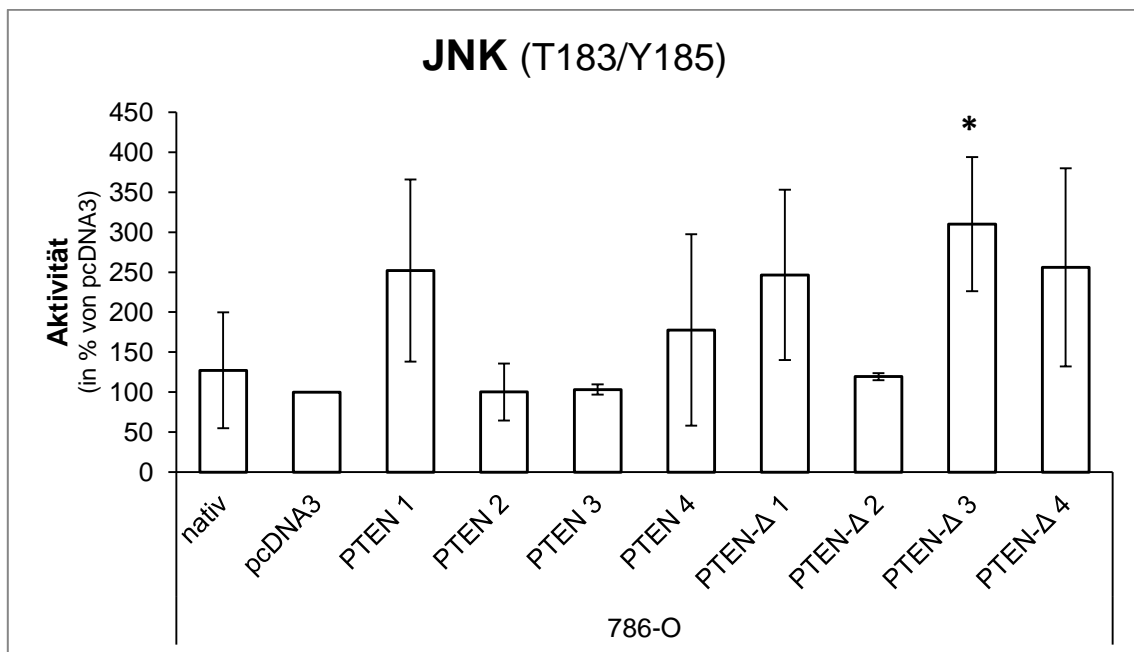


Abbildung 84: Aktivität der Kinase JNK (T183/Y185) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In der Zelllinie A498 induzierten PTEN und PTEN- Δ eine Reduktion der JNK-Aktivität im Phospho-Kinase Array. Diese konnte im Westernblot bestätigt werden. Bei PTEN 1 kam es zu einer Verringerung der Aktivität im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen um 50 % ($p = 0,022$). PTEN- Δ verringerte ebenfalls die JNK-Aktivität auf 71 % bei PTEN- Δ 1, auf 34 % ($p = 0,02$) bei PTEN- Δ 2 und auf 46 % ($p = 0,014$) bei PTEN- Δ 3 (Abbildung 85).

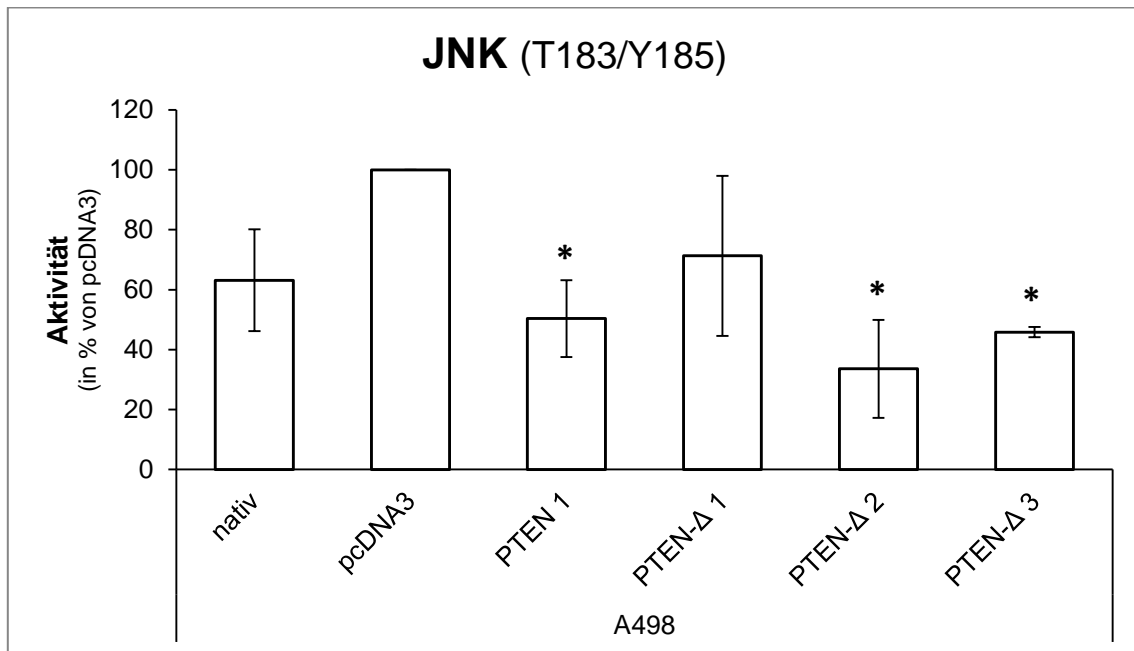


Abbildung 85: Aktivität der Kinase JNK (T183/Y185) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Aktivität der Kinase p38 α war im Phospho-Kinase Array durch PTEN- Δ in beiden Zelllinien reduziert. Diese Reduktion zeigte sich für die 786-O-Zellen in drei von vier Klonen. Während die p38-Aktivität für PTEN- Δ 1 bei 206 % lag, war die Aktivität für PTEN- Δ 2, 3 und 4 im Bereich zwischen 36 % und 46 % reduziert. Die PTEN-Klone wiesen bis auf PTEN 1 eine reduzierte p38-Aktivität auf. Die p38-Aktivität lag in den PTEN 2-Zellen bei 37 % ($p = 0,015$), in den PTEN 3-Zellen bei 29 % und in den PTEN 4-Zellen bei 65 % (Abbildung 86).

Die zuvor beobachtete Reduktion der p38-Aktivität konnte im Westernblot bei den PTEN- Δ A498-Zellen ebenfalls festgestellt werden. In allen drei PTEN- Δ -Klonen kam es zu einer reduzierten Aktivität, welche bei PTEN- Δ 1 bei 47 %, bei PTEN- Δ 2 bei 30 % ($p = 0,025$) und bei PTEN- Δ 3 bei 61 % lag. PTEN induzierte eine leichte Verringerung der p38-Aktivität auf 87 % (Abbildung 87).

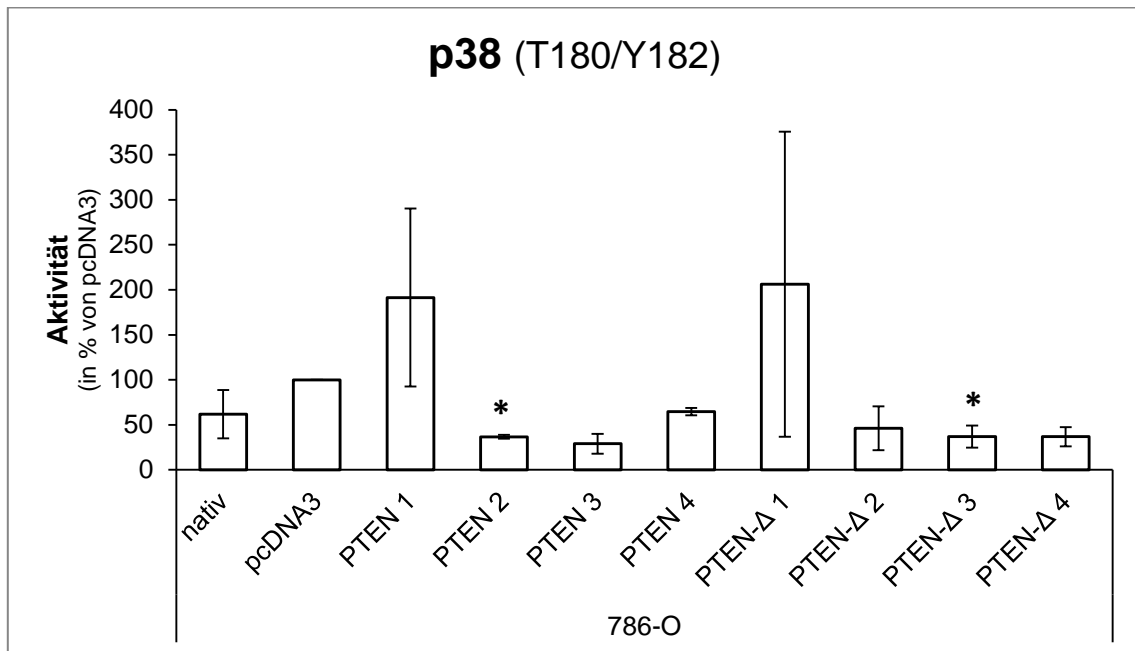


Abbildung 86: Aktivität der Kinase p38 (T180/Y182) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

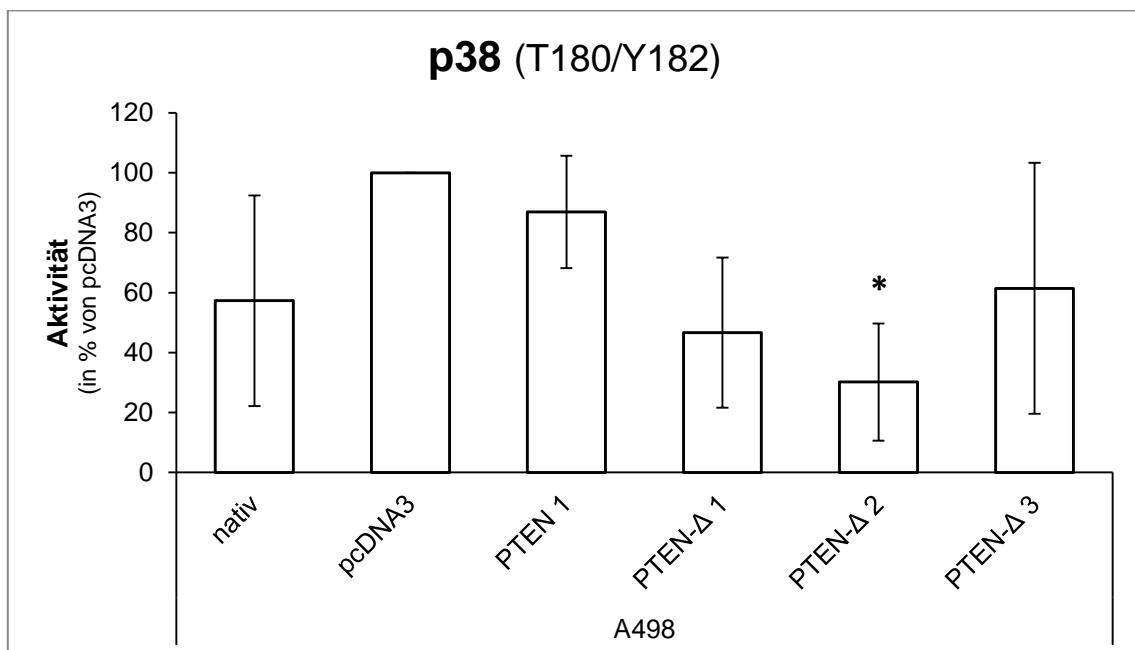


Abbildung 87: Aktivität der Kinase p38 (T180/Y182) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In der Zelllinie 786-O induzierten PTEN und PTEN- Δ eine Steigerung der ERK1/2-Aktivität. Diese konnte im Westernblot bestätigt werden. Die PTEN-Klone 3 und 4 wiesen

eine gesteigerte Aktivität auf 118 % bzw. 270 % auf. Dagegen war die ERK1/2-Aktivität in den PTEN 2-Zellen leicht reduziert. PTEN- Δ induzierte in drei von vier Klonen eine Steigerung der Aktivität um maximal 122 % in PTEN- Δ 3 (Abbildung 88).

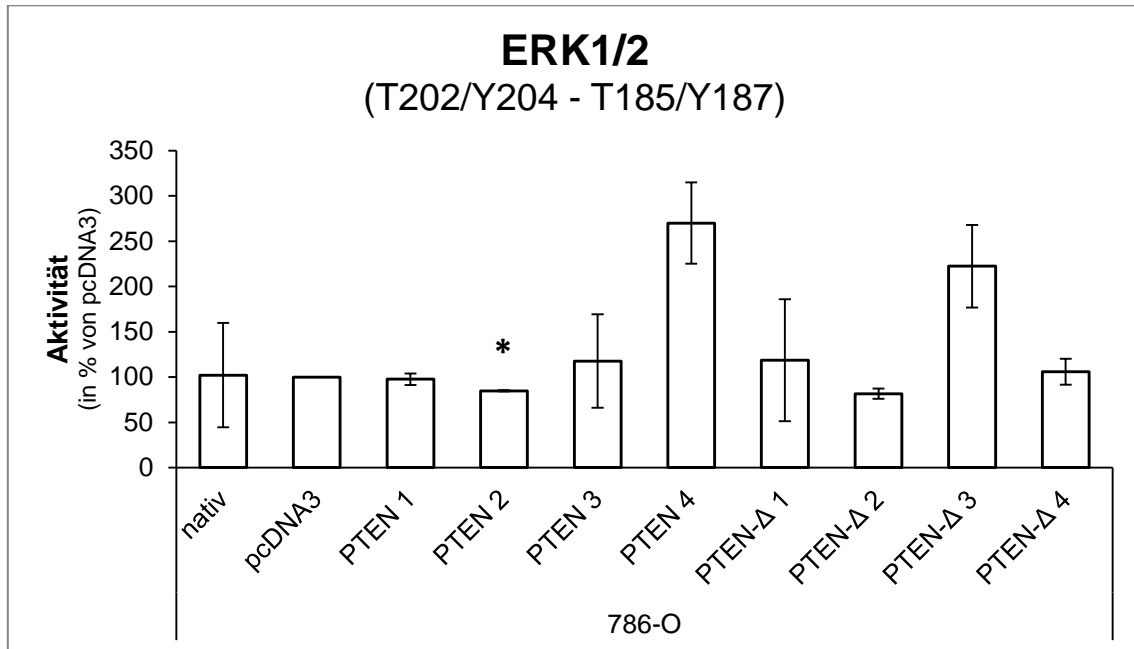


Abbildung 88: Aktivität der Kinasen ERK1/2 (T202/Y204 - T185/Y187) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Während die ERK1/2-Aktivität in den transgenen PTEN A498-Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen annähernd unverändert war, induzierte PTEN- Δ eine Reduktion der Aktivität. Bei PTEN- Δ 2 war die Aktivität auf 62 % und bei PTEN- Δ 3 auf 76 % reduziert (Abbildung 89). Diese leicht verringerte ERK1/2-Aktivität war zuvor schon im Phospho-Kinase Array zu sehen.

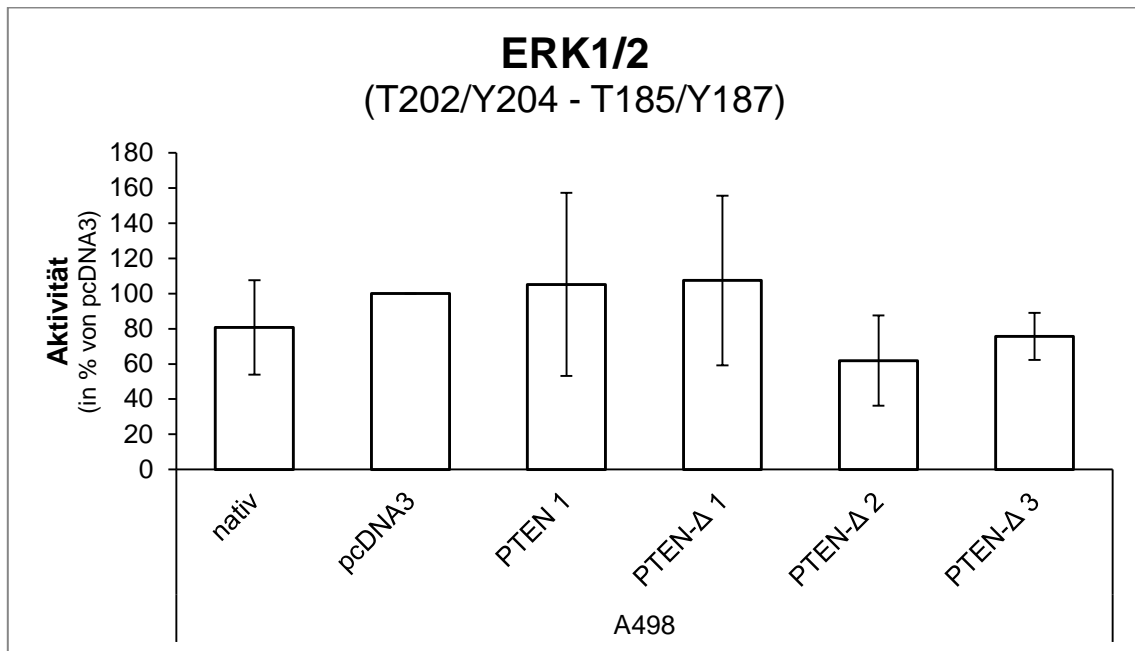


Abbildung 89: Aktivität der Kinasen ERK1/2 (T202/Y204 - T185/Y187) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 wies in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O keinen eindeutigen Trend auf. PTEN induzierte sowohl eine Steigerung der Aktivität in PTEN 1 auf 172 % ($p = 0,033$), als auch eine Reduktion auf 78 % bei PTEN 4. Ebenso war die STAT3-Aktivität in den PTEN- Δ -Klonen variabel. Während PTEN- Δ 2 eine gesteigerte Aktivität um 111 % aufwies, war die Aktivität von PTEN- Δ 1 und 3 nur leicht erhöht und die von PTEN- Δ 4 auf 78 % erniedrigt (Abbildung 90).

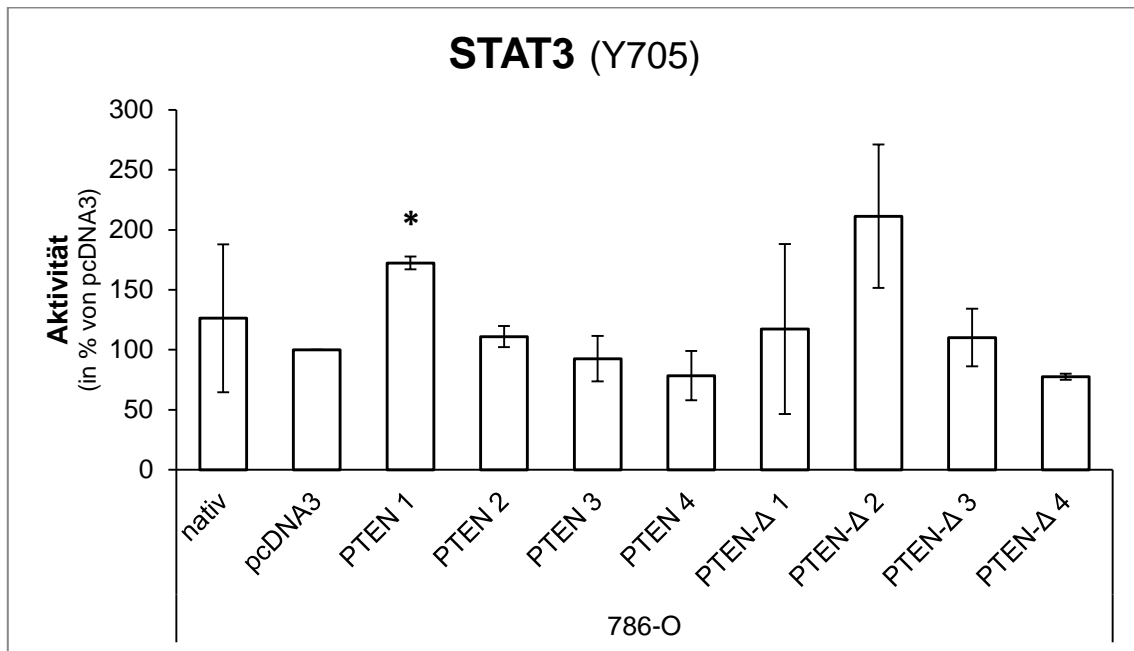


Abbildung 90: Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 (Y705) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In den A498-Zellen war die STAT3-Aktivität in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen nur geringfügig erhöht. Nur die PTEN- Δ 2-Zellen wiesen eine erhöhte Aktivität von 170 % ($p = 0,022$) auf (Abbildung 91).

Die Aktivität der Proteinkinase AKT war im Phospho-Kinase Array sowohl für PTEN als auch für PTEN- Δ nur an der Phosphorylierungsstelle S473 in beiden Zelllinien deutlich reduziert. Dies zeigte sich auch im Westernblot für die Zelllinie 786-O. PTEN 2, 3 und 4 wiesen eine deutlich reduzierte AKT(S473)-Aktivität von 43 %, 53 % bzw. 68 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. PTEN- Δ induzierte eine reduzierte Phosphorylierung an S473 auf 42 % ($p = 0,025$) bei PTEN- Δ 1, auf 87 % ($p = 0,035$) bei PTEN- Δ 3 und auf 53 % ($p = 0,027$) bei PTEN- Δ 4. In den PTEN- Δ 2-Zellen war die AKT-Aktivität unverändert (Abbildung 92).

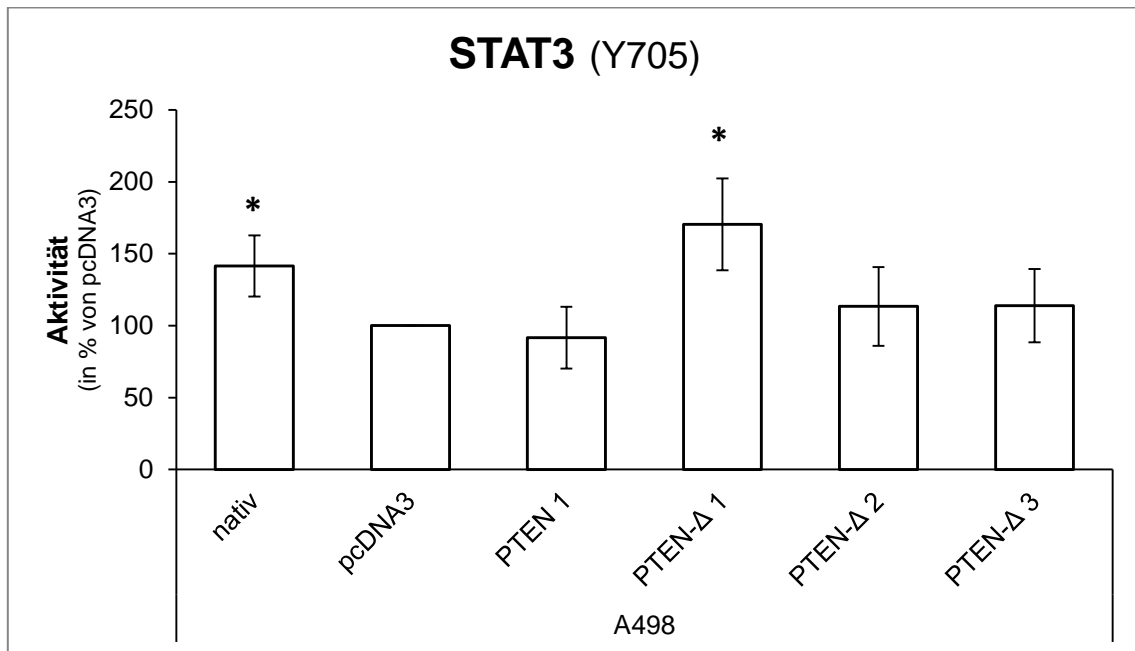


Abbildung 91: Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 (Y705) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

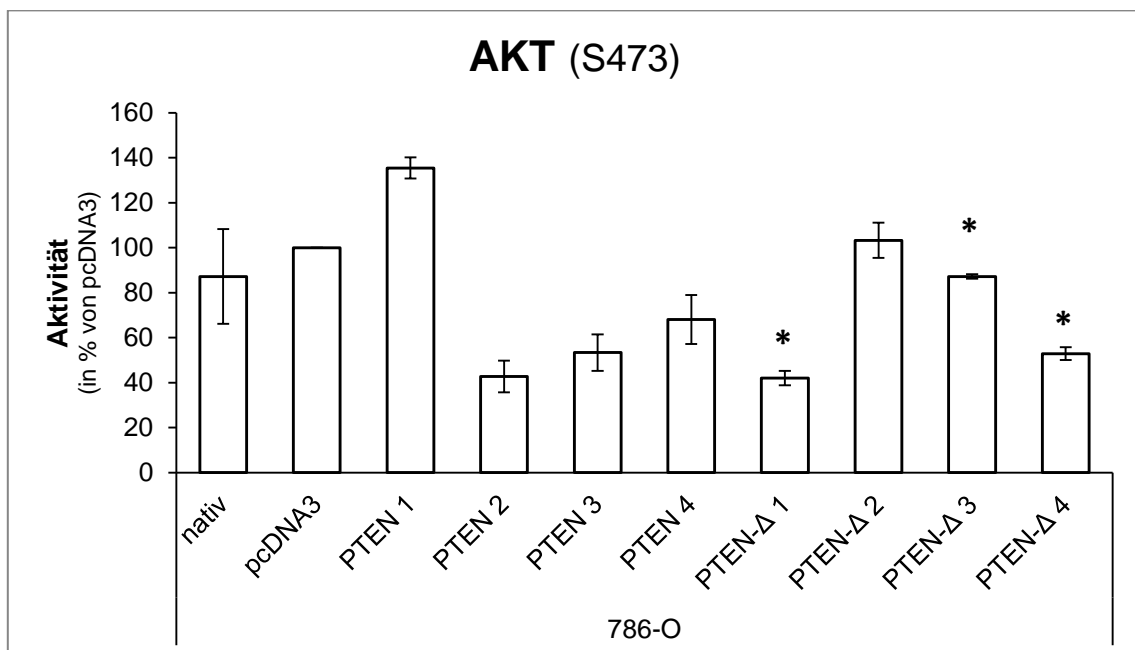


Abbildung 92: Aktivität der Kinasen AKT (S473) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die reduzierte AKT-Phosphorylierung an S473 konnte in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der A498-Zellen im Westernblot nur bedingt verifiziert werden. Die AKT-Aktivität

in den PTEN 1 A498-Zellen war unverändert im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. In den PTEN- Δ -Klonen induzierten lediglich die PTEN- Δ 3-Zellen eine leichte Reduktion der AKT-Aktivität auf 88 % (Abbildung 93).

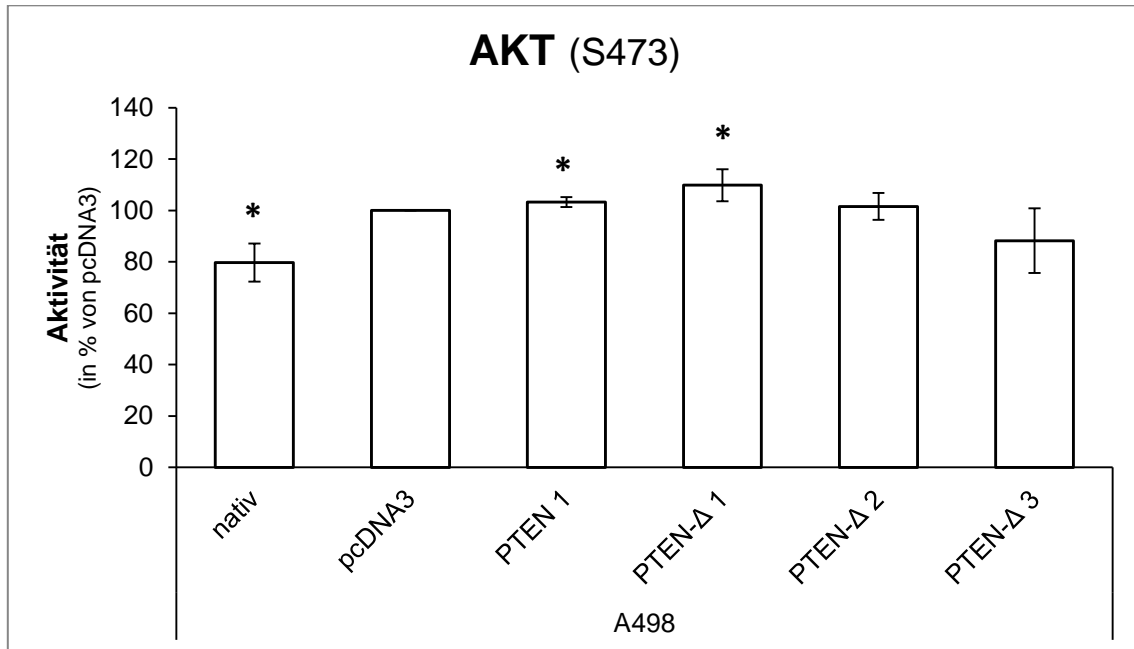


Abbildung 93: Aktivität der Kinasen AKT (S473) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Kinase AKT besitzt nicht nur die Phosphorylierungsstelle S473, sondern kann von mTORC2 auch an T308 phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. In den transgenen 786-O-Zellen war die AKT-Phosphorylierung an T308 im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen deutlich erniedrigt. In den PTEN-Klonen war die Aktivität auf 85 % bei PTEN 1, auf 24 % ($p = 0,05$) bei PTEN 2, auf 37 % bei PTEN 3 und auf 69 % bei PTEN 4 reduziert. PTEN- Δ induzierte eine Verringerung der AKT-Aktivität auf 55 % bei PTEN- Δ 1, auf 42 % bei PTEN- Δ 2, auf 39 % bei PTEN- Δ 3 und auf 19 % ($p = 0,039$) bei PTEN- Δ 4 (Abbildung 94). Die reduzierte AKT-Phosphorylierung an T308 war in den A498-Zellen weniger deutlich. Hier kam es nur in zwei von drei PTEN- Δ -Klonen zu einer Reduktion der Aktivität. Die AKT-Phosphorylierung in den PTEN- Δ 1-Zellen war auf 64 % und in den PTEN- Δ 3-Zellen auf 44 % ($p = 0,011$) reduziert (Abbildung 95).

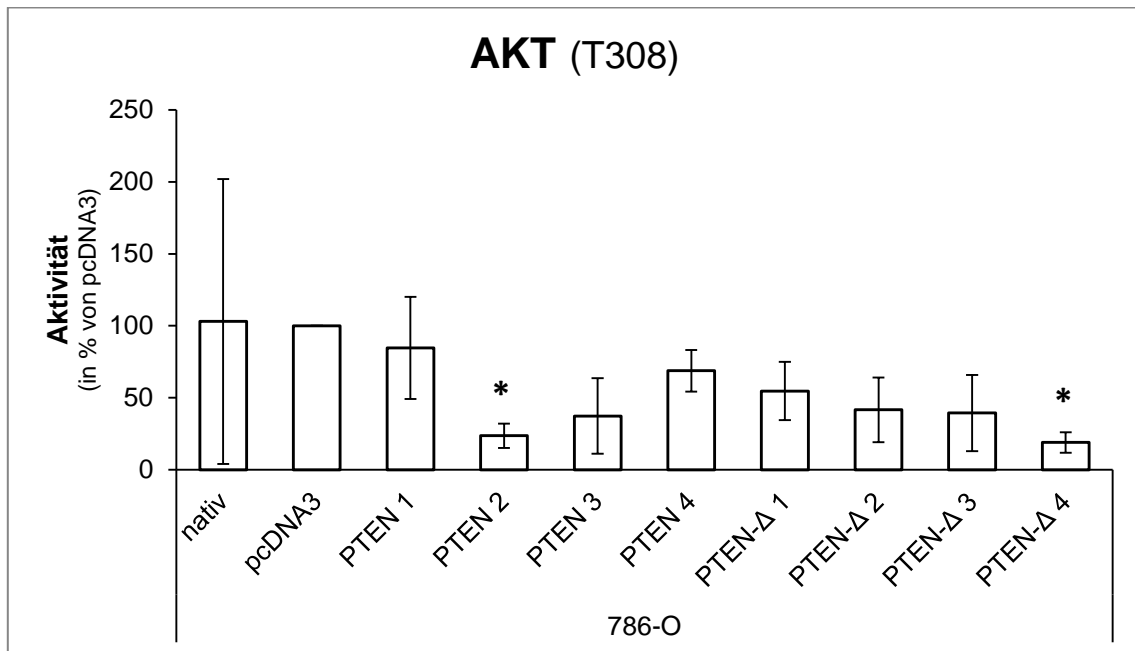


Abbildung 94: Aktivität der Kinasen AKT (T308) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

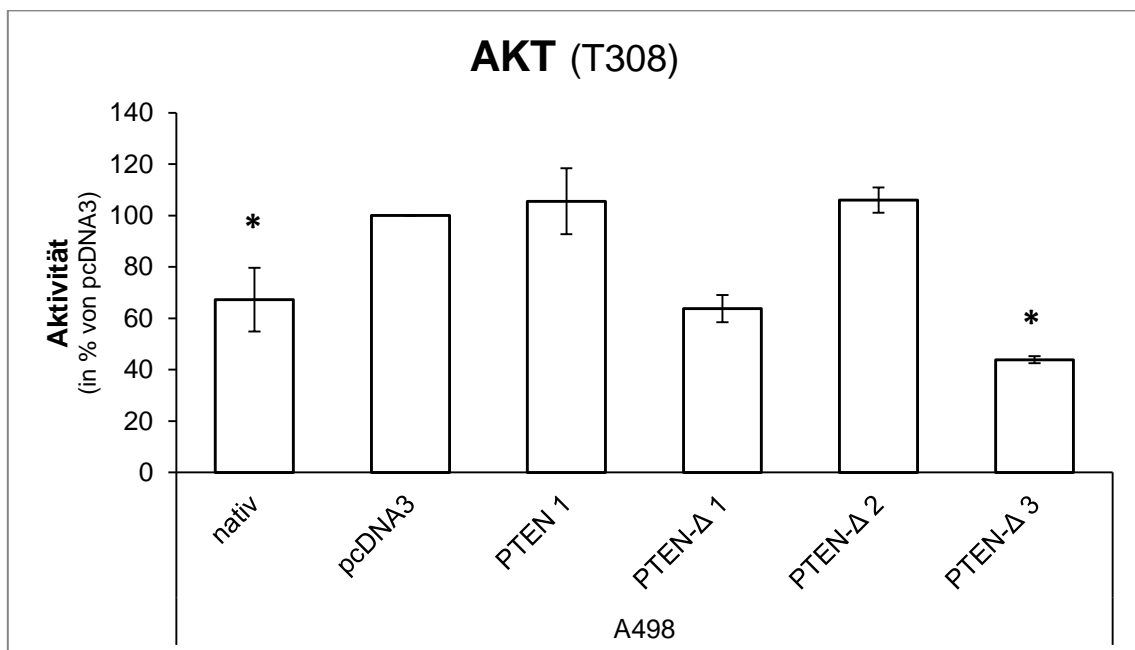


Abbildung 95: Aktivität der Kinasen AKT (T308) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Signalmolekül CREB war im Phospho-Kinase Array vor allem durch PTEN verstärkt phosphoryliert. Im Westernblot zeigte sich dieser Effekt nur in den PTEN 3

786-O-Zellen. Dagegen war die Aktivität bei PTEN 4 auf 58 % reduziert. PTEN- Δ induzierte in zwei Klonen eine Reduktion der CREB-Aktivität auf 78 % bei PTEN- Δ 1 und auf 73 % bei PTEN- Δ 3. In den PTEN- Δ 2-Zellen konnte eine Steigerung der Aktivität um 28 % festgestellt werden. Dagegen war die Aktivität in den PTEN- Δ 4-Zellen unverändert im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 96).

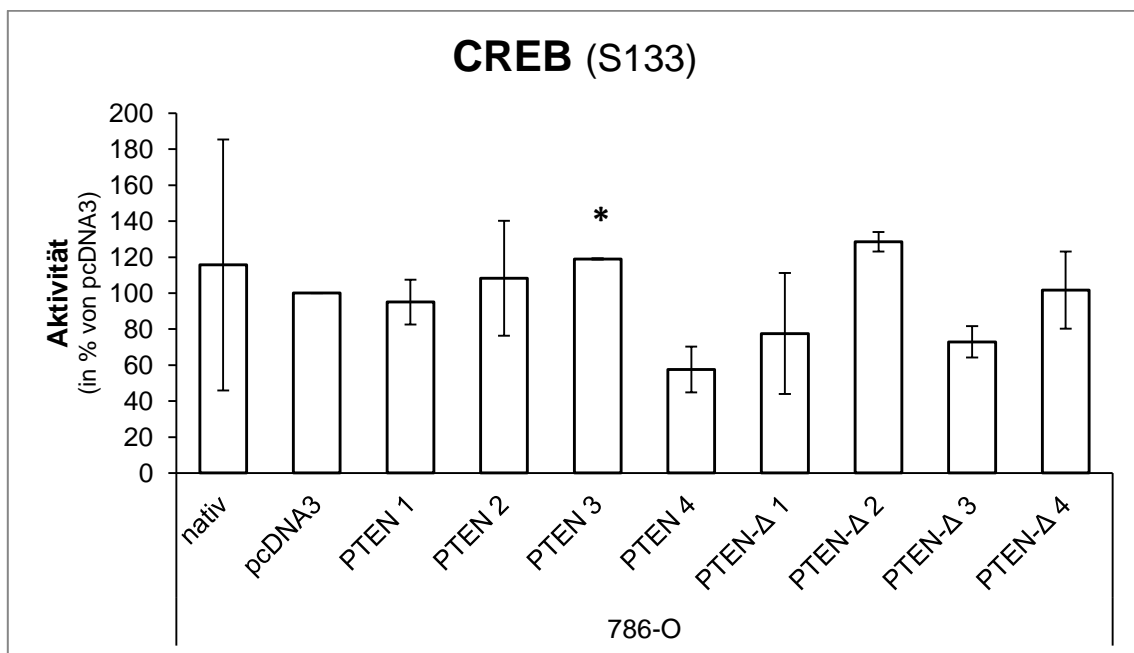


Abbildung 96: Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (S133) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In den transgenen A498-Zellen war die CREB-Aktivität sowohl erhöht als auch erniedrigt im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Während die PTEN- Δ 2-Zellen eine erhöhte Aktivität aufwiesen, war die CREB-Aktivität in den PTEN- Δ 3-Zellen auf 79 % erniedrigt. Die PTEN 1-Zellen wiesen eine leicht reduzierte Aktivität auf (Abbildung 97).

Die Aktivität des Strukturproteins β -Catenin war in den transgenen PTEN 786-O-Zellen nur in dem PTEN 1-Klon auf 172 % erhöht. Die anderen drei Klone wiesen keinen Unterschied in der β -Catenin-Aktivität im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. In den PTEN- Δ -Klonen kam es zu einem Abfall der Aktivität auf 82 % ($p = 0,03$) in den PTEN- Δ 2-Zellen, auf 77 % in den PTEN- Δ 3-Zellen und auf 72 % in den PTEN- Δ 4-Zellen (Abbildung 98).

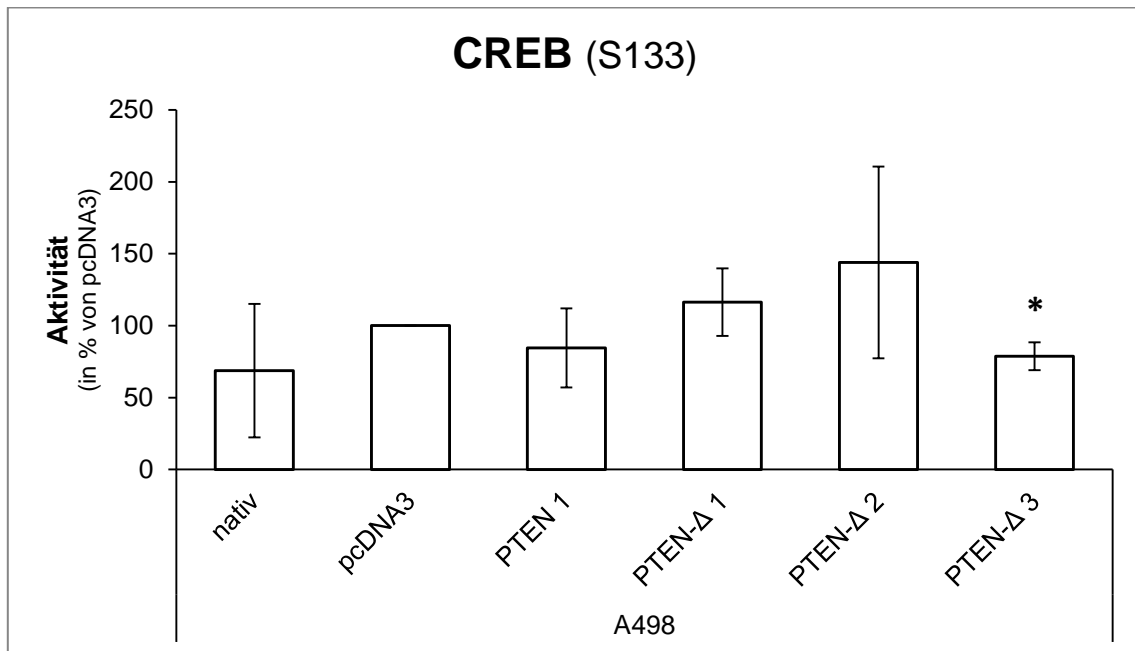


Abbildung 97: Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (S133) in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

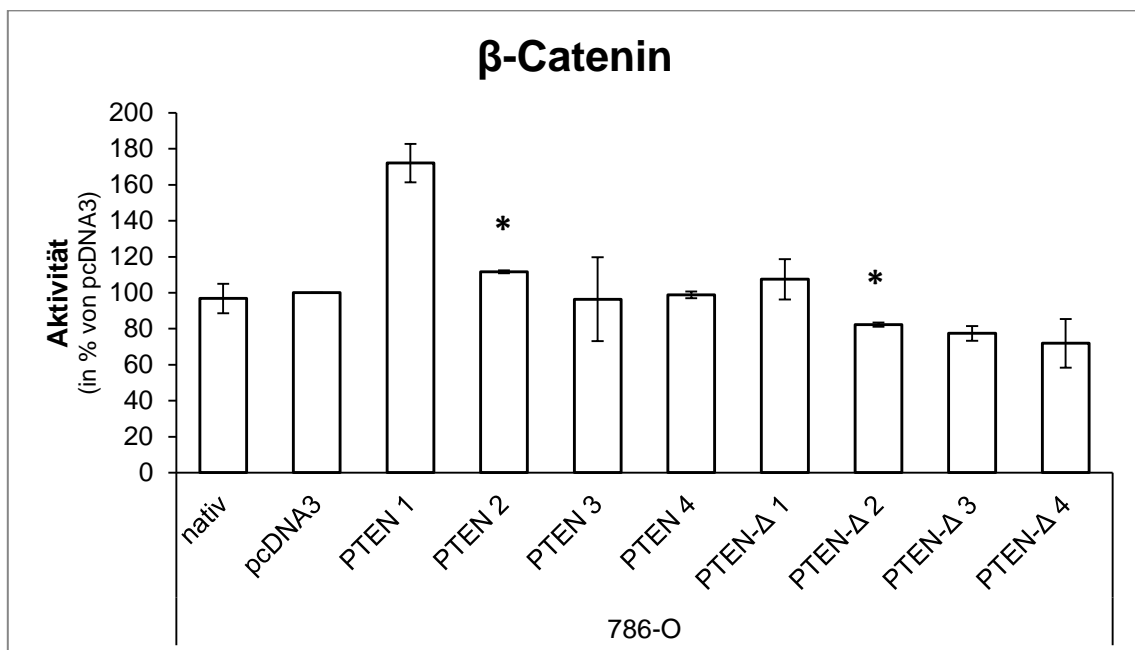


Abbildung 98: Aktivität des Signalmoleküls β -Catenin in den PTEN- und PTEN-Δ-Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert $< 0,05$ angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In der Zelllinie A498 induzierten PTEN und PTEN- Δ keinen eindeutigen Effekt auf die Aktivität von β -Catenin. Die Aktivität war in den PTEN 1-Zellen leicht gesteigert. In den

PTEN- Δ 1- und 2-Zellen kam es zu einer leichten Erhöhung der Aktivität um 21 %. Dagegen wiesen die PTEN- Δ 3-Zellen eine leicht reduzierte Aktivität um 8 % auf (Abbildung 99).

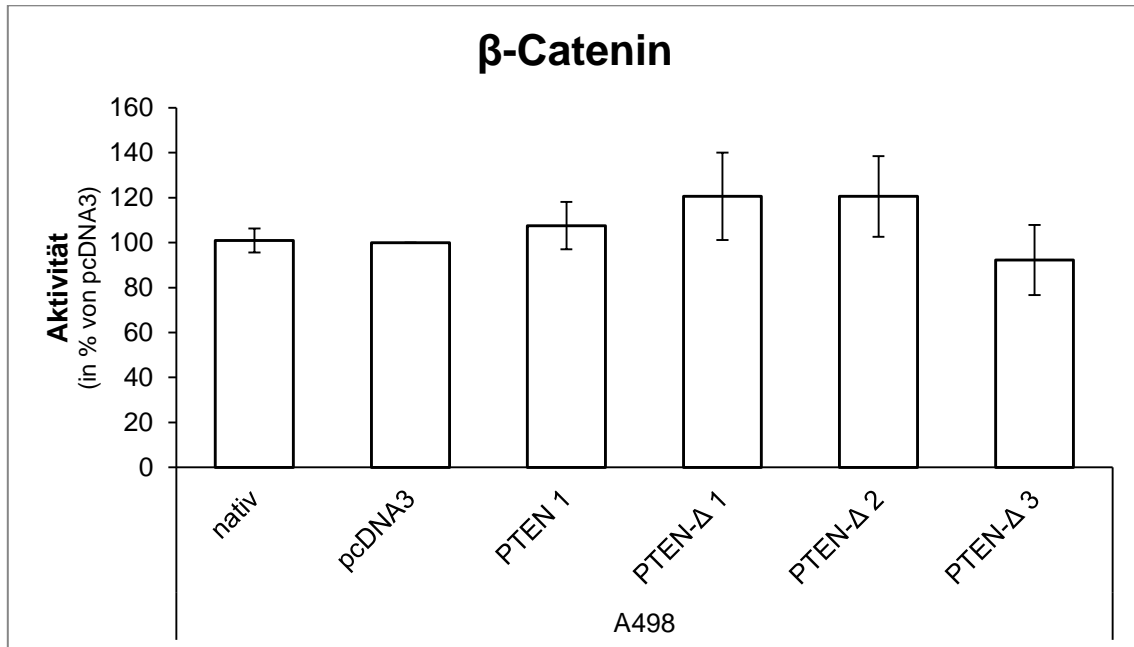


Abbildung 99: Aktivität des Signalmoleküls β -Catenin in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Aktivitäten wurden auf die Expression von β -Aktin normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden nicht festgestellt.

Zusammenfassend konnte in der Westernblot Validierung festgestellt werden, dass PTEN und PTEN- Δ in den Zelllinien 786-O und A498 unterschiedliche Effekte induzierten. Die JNK-Aktivität wurde durch PTEN und PTEN- Δ in der Zelllinie A498 deutlich erniedrigt auf 50 %. Dagegen war die Aktivität der Kinase in den transgenen 786-O-Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen um 58 % bei PTEN und um 133 % bei PTEN- Δ erhöht. Die Kinase p38 wies sowohl in den PTEN- als auch in den PTEN- Δ -Zellen beider Zelllinien eine reduzierte Aktivität auf. In den 786-O-Zellen lag die Reduktion bei 80 %. PTEN induzierte in den A498-Zellen eine Verringerung der p38-Aktivität um 13 %. Am stärksten war die Reduktion auf 46 % in den PTEN- Δ A498-Zellen (Abbildung 100).

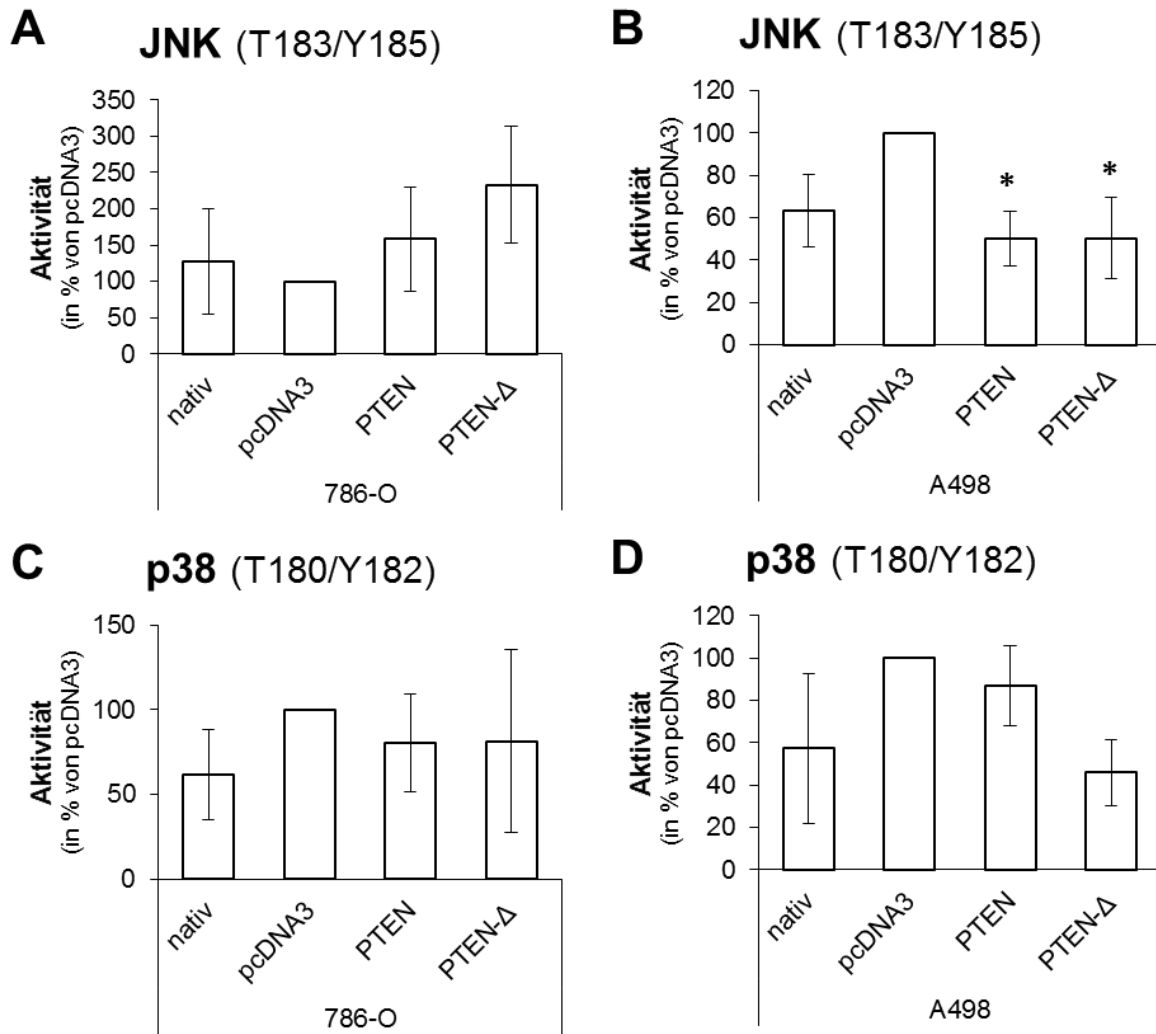


Abbildung 100: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN-Δ auf die Kinasen JNK (A, B) und p38 (C, D). Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Aktivität der Kinasen ERK1/2 wurde durch PTEN in beiden Zelllinien erhöht. Während die Steigerung in den A498-Zellen nur gering war, wiesen die PTEN 786-O-Zellen eine deutliche Aktivitätssteigerung von 43 % auf. PTEN-Δ induzierte in den A498-Zellen eine Reduktion der ERK1/2-Aktivität auf 82 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. Dagegen war die Aktivität in der Zelllinie 786-O um 32 % erhöht. Die STAT3-Aktivität wurde durch PTEN-Δ in beiden Zelllinien leicht erhöht. PTEN induzierte in den A498-Zellen eine leichte Reduktion der STAT3-Aktivität, dagegen war die Aktivität in den 786-O-Zellen leicht erhöht (Abbildung 101).

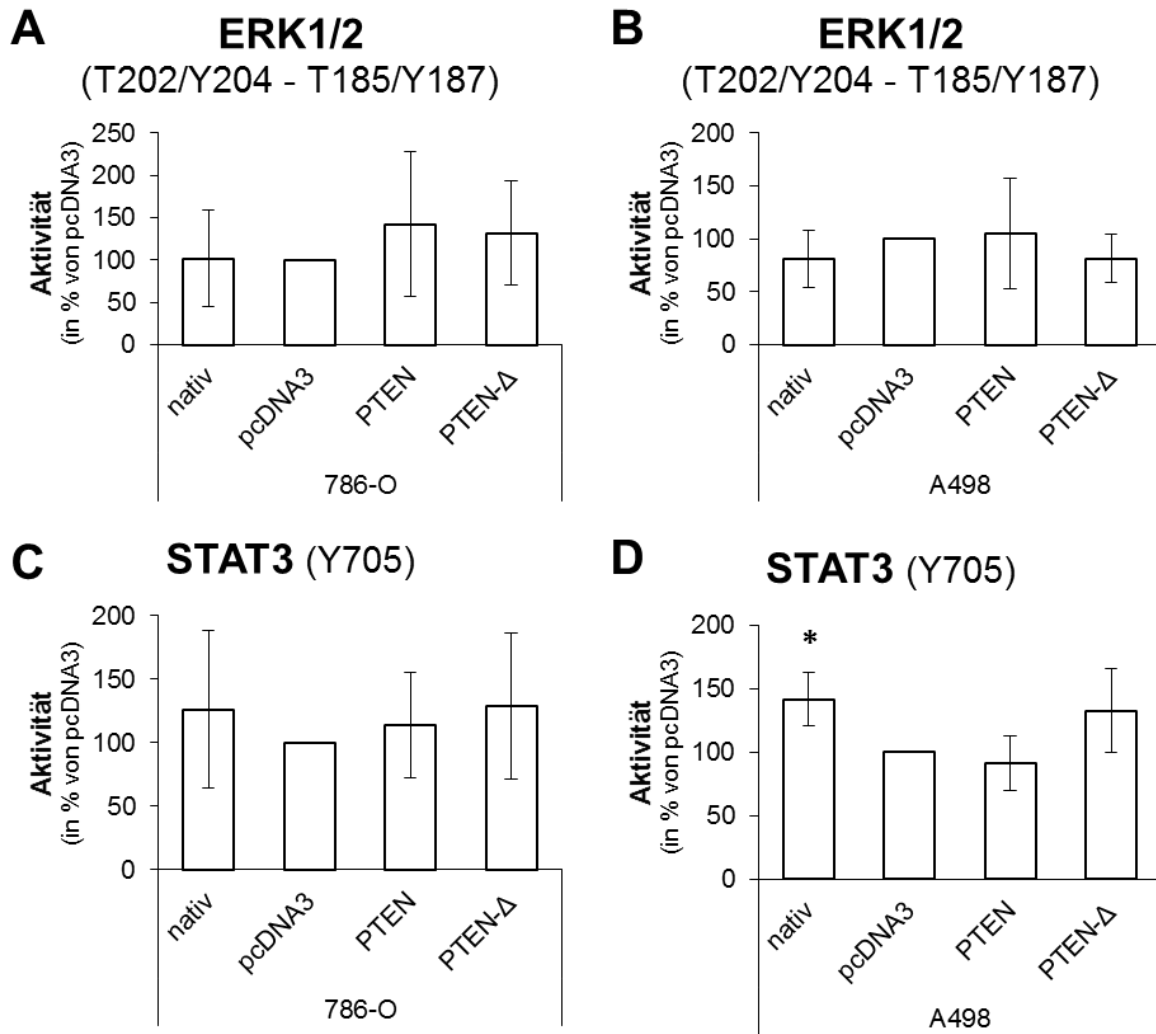


Abbildung 101: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN-Δ auf die Kinasen ERK1/2 (A, B) und STAT3 (C, D). Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden nicht festgestellt.

Die AKT-Aktivität wurde an zwei verschiedenen Phosphorylierungsstellen analysiert. An der Stelle S473 induzierten PTEN und PTEN-Δ in den A498-Zellen keine Veränderungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. In der Zelllinie 786-O war die AKT-Aktivität auf 75 % bei PTEN und auf 71 % bei PTEN-Δ reduziert. An der Phosphorylierungsstelle T308 induzierte PTEN-Δ in beiden Zelllinien eine Reduktion der Aktivität auf 71 % in den A498-Zellen und auf 39 % ($p = 0,004$) in den 786-O-Zellen. In den transgenen PTEN 786-O-Zellen war die AKT-Aktivität ebenfalls auf 54 % ($p = 0,046$) reduziert (Abbildung 102).

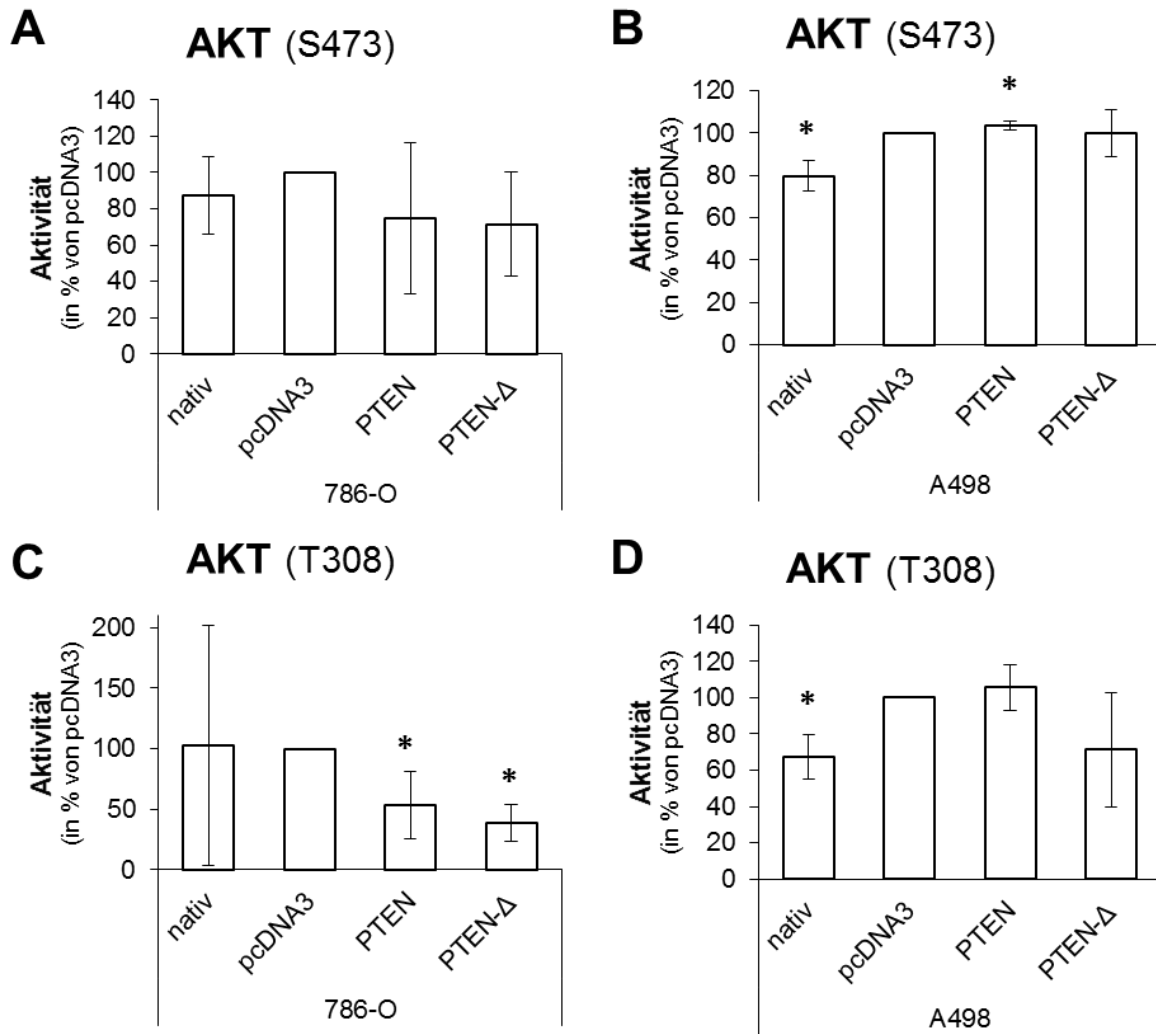


Abbildung 102: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN-Δ auf die Kinase AKT an der Phosphorylierungsstelle S473 (A, B) und T308 (C, D). Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Aktivität des Signalmoleküls CREB wies in den transgenen 786-O-Zellen und A498-Zellen nur geringfügige Schwankungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen auf. Es zeigten sich maximale Veränderungen um 15 %. Ähnliches konnte für das am Wnt-Signalweg beteiligte β -Catenin festgestellt werden. Auch hier induzierten PTEN und PTEN- Δ keinen eindeutigen Effekt im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen in beiden Zelllinien (Abbildung 103).

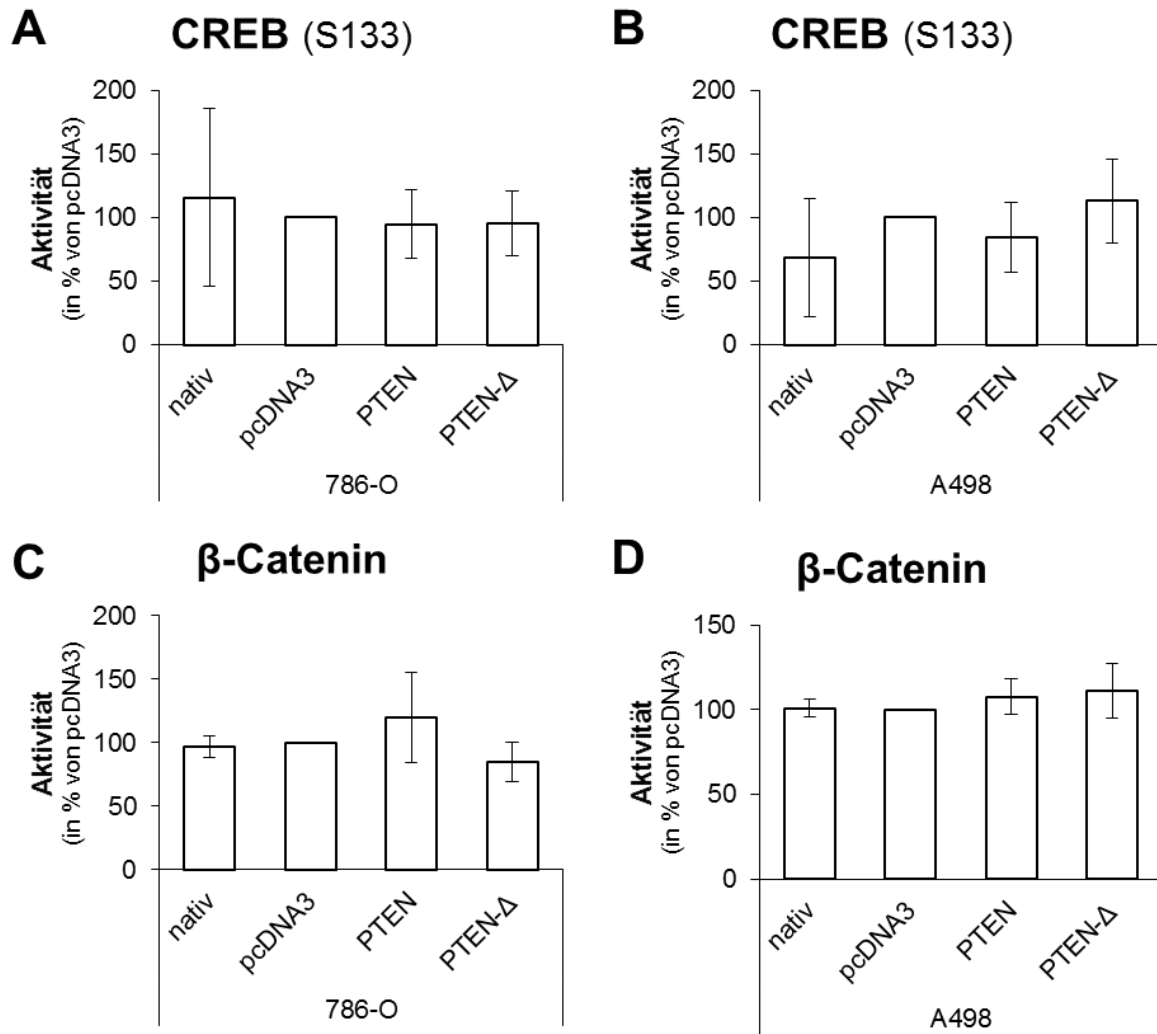


Abbildung 103: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN-Δ auf die Signalmoleküle CREB (A, B) und β-Catenin (C, D). Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.3.8 Einfluss von PTEN-Δ auf das Transkriptom

Zur Beurteilung des Einflusses von PTEN-Δ auf das Transkriptom wurde eine RNA-Seq von der Firma Star Seq GmbH für einen PTEN-Δ-Klon, einen PTEN-Klon und den pcDNA3-Zellen durchgeführt. Es wurden für die 786-O-Zellen PTEN-Δ 3 und PTEN 4 und für die A498-Zellen PTEN-Δ 1 und PTEN 1 verwendet, da diese in den vorangegangenen Analysen die stärksten Effekte aufwiesen. Im Anschluss wurden relevante Gene mit einem relativ hohen *Fold Change* im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen ermittelt und dessen Expression in einer qPCR in den einzelnen Klonen verifiziert. PTEN-Δ bzw. PTEN induzierte in den beiden Zelllinien unterschiedliche Genexpressionsveränderungen. Das Gen *CRLF1* (*Cytokine receptor-like factor*

1) kodiert einen Zytokin-Faktor, welcher als Komplex mit dem Faktor CLCF1 (*cardiotrophin-like cytokine factor 1*) wirkt. Im nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom konnte gezeigt werden, dass CRLF1/CLCF1 das Tumorstadium fördert (Sims, 2015). In den transgenen A498-Zellen induzierte sowohl PTEN als auch PTEN- Δ eine deutliche Reduktion der *CRLF1*-Expression. Die Reduktion erfolgte auf unter 10 % in den jeweiligen Klonen (Abbildung 104).

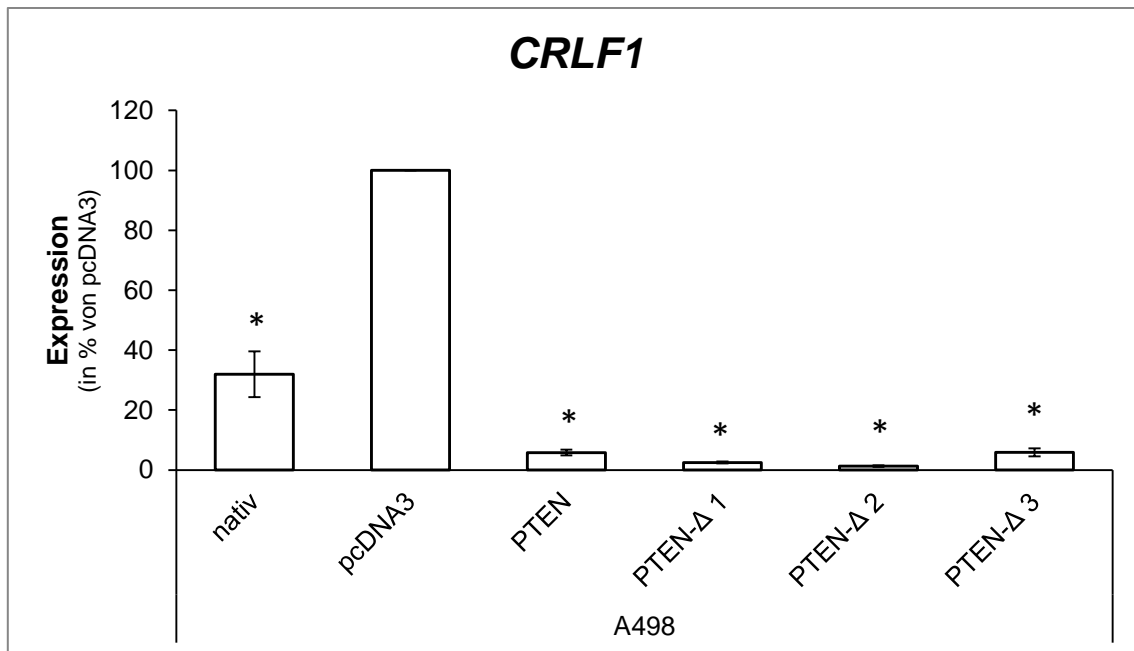


Abbildung 104: Expression von *CRLF1* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Gen *IFI27* (*interferon α -inducible protein 27*) zählt zu den Apoptose-bezogenen Genen und das kodierte Protein kann die Apoptose triggern (Wrangle *et al.*, 2013). In der Zelllinie A498 erhöhte PTEN die Expression von *IFI27* um den Faktor 2,6. PTEN- Δ induzierte in zwei von drei Klonen eine Steigerung der *IFI27*-Expression (Abbildung 105).

Die Expression des Gens *TNFRSF1B* (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B*), ein Tumornekrose-Faktor, welcher an TNF- α binden kann, wirkt vorwiegend anti-apoptotisch und wurde bereits mit der Entwicklung von Metastasen in Lungenkarzinomen in Verbindung gebracht (Yan *et al.*, 2015). In den transgenen

A498-Zellen war die *TNFRSF1B*-Expression sowohl bei PTEN als auch bei PTEN- Δ stark reduziert auf unter 10 % (Abbildung 106).

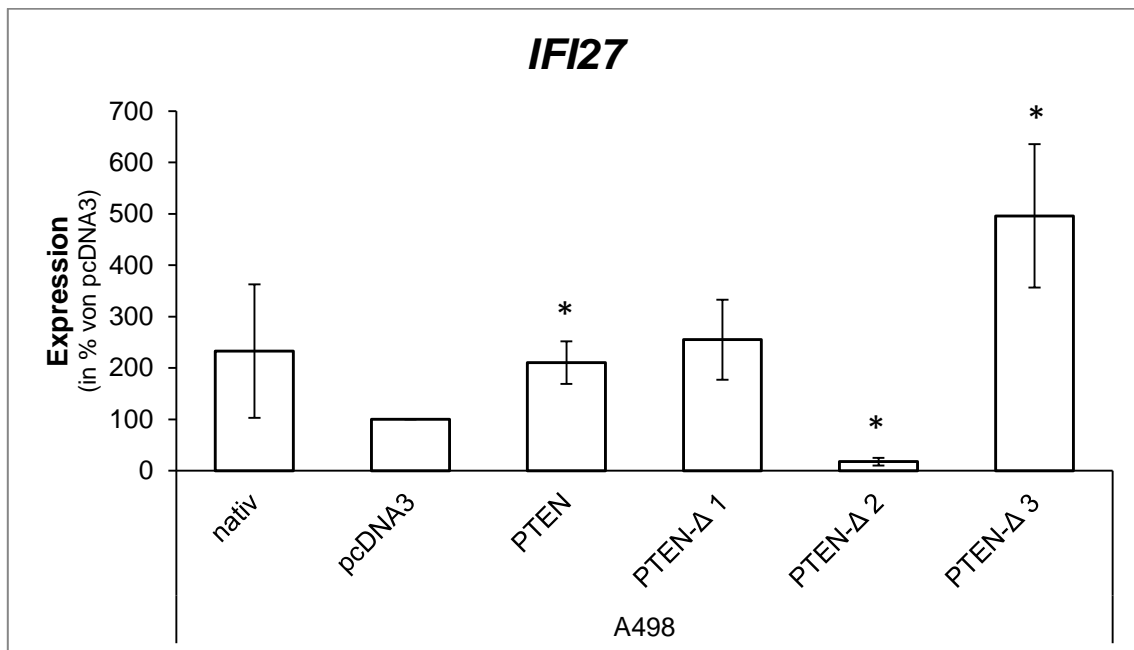


Abbildung 105: Expression von *IFI27* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

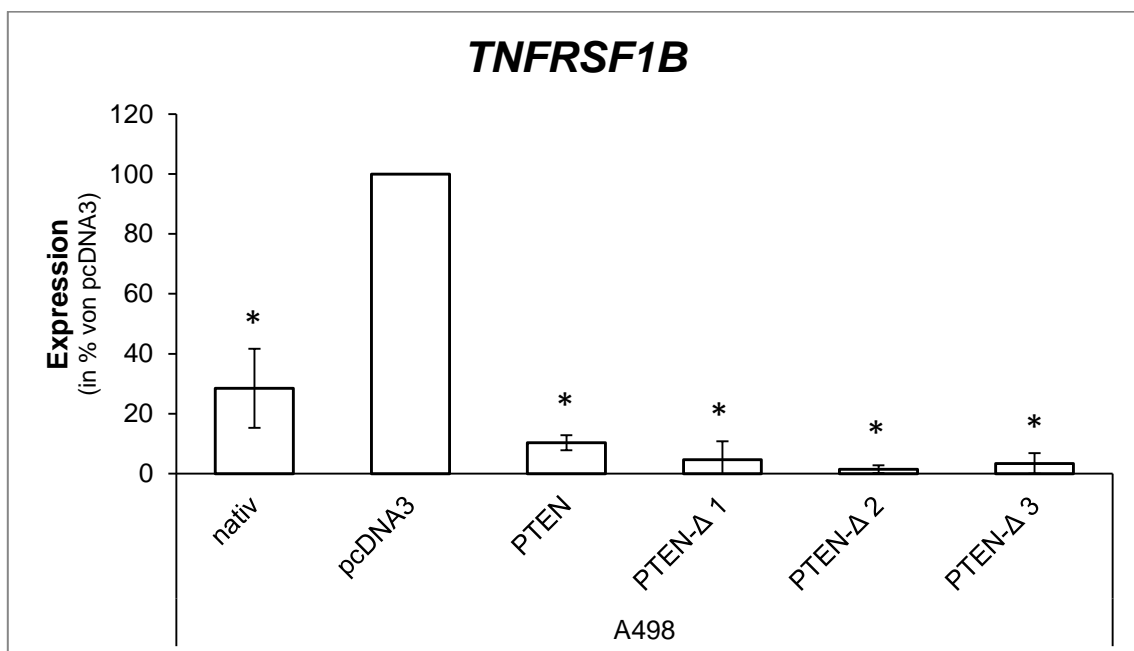


Abbildung 106: Expression von *TNFRSF1B* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Periostin, welche von dem Gen *POSTN* kodiert wird, fungiert als Ligand für verschiedene Integrine und unterstützt die zelluläre Adhäsion und Migration (Gillan *et al.*, 2002). Bei Patienten mit Kopf- und Halskrebs oder mit Ovarialkarzinom wurde *POSTN* bereits mit einer schlechteren Prognose sowie einer verstärkten Metastasierung assoziiert (Karlán *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2016). PTEN und PTEN- Δ induzierten in der Zelllinie A498 eine deutliche Reduktion der *POSTN*-Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen (Abbildung 107).

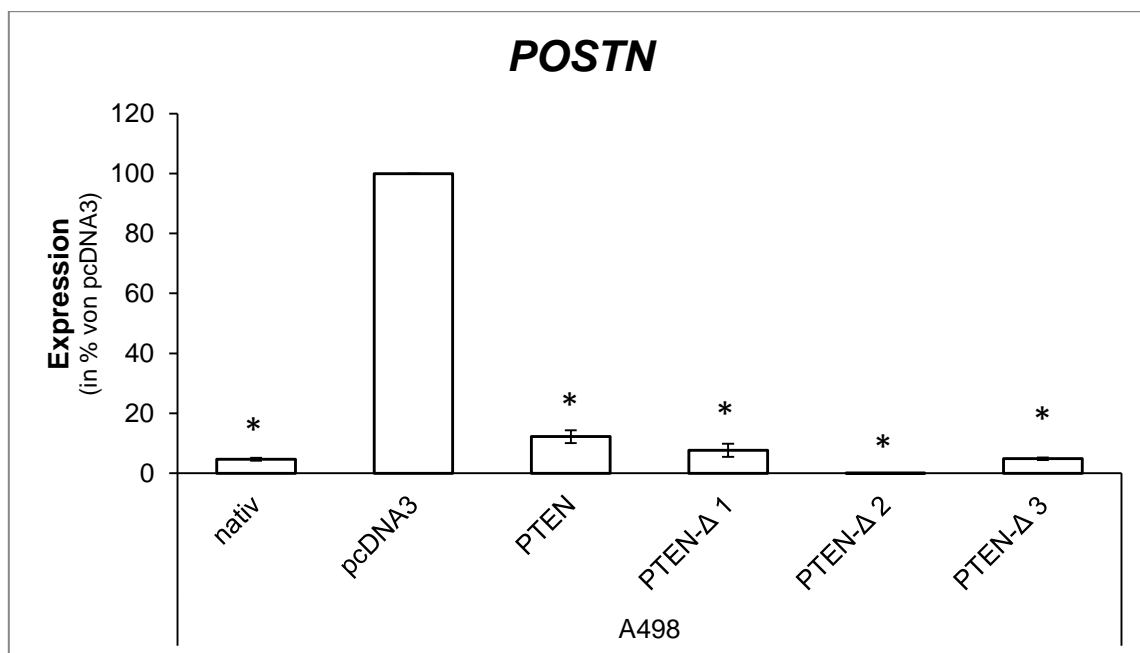


Abbildung 107: Expression von *POSTN* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Zusammenfassend zeigte sich für die A498-Zellen eine verringerte Expression der Gene *CRLF1*, *POSTN* und *TNFRSF1B*. Bei *CRLF1* erfolgte eine Reduktion auf 6 % bei PTEN und 3 % bei PTEN- Δ , bei *POSTN* war die Reduktion ähnlich stark mit Werten von 12 % für PTEN und 4 % für PTEN- Δ . Die *TNFRSF1B*-Expression lag bei PTEN bei 10 % und bei PTEN- Δ bei 3 %. Dagegen war die Expression des Gens *IFI27* im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen leicht erhöht um den Faktor 2,1 bei PTEN und den Faktor 2,6 bei PTEN- Δ (Abbildung 108).

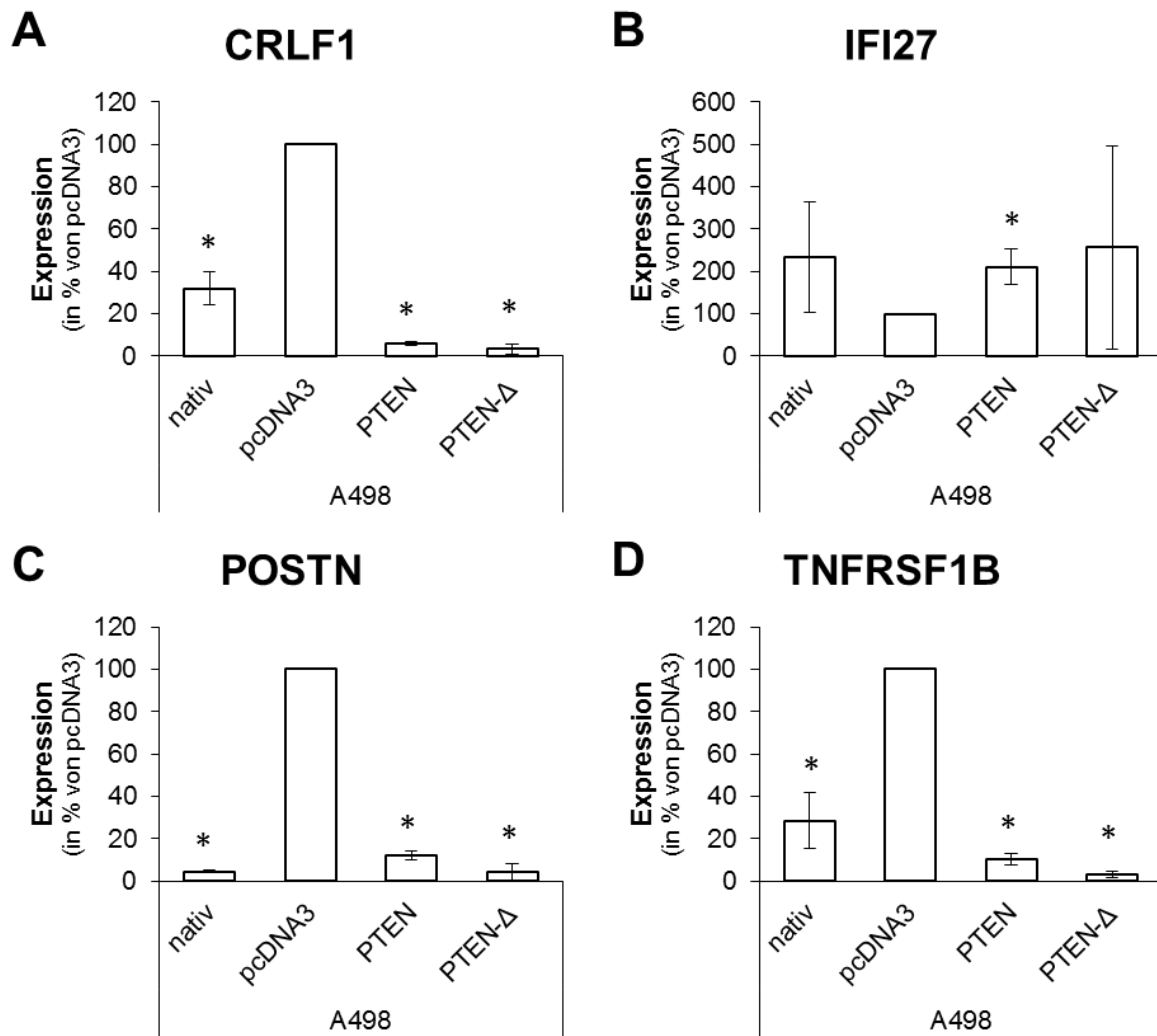


Abbildung 108: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN-Δ auf die Gene *CRLF1* (A), *IFI27* (B), *POSTN* (C) und *TNFRSF1B* (D) der Zelllinie A498. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Gen *RASGRF2* (*RAS-specific guanine nucleotide-releasing factor 2*) kodiert ein Protein, welches die aktive Form von RAS GTPasen stabilisiert. Im nicht-klarzelligen Lungenkarzinom wurde gezeigt, dass in ein Drittel aller Patienten das Gen ausgeschaltet ist (Chen *et al.*, 2006). In der Zelllinie 786-O induzierten sowohl PTEN als auch PTEN-Δ eine Reduktion der *RASGRF2*-Expression. In allen Klonen war die Expression signifikant auf unter 15 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen verringert (Abbildung 109).

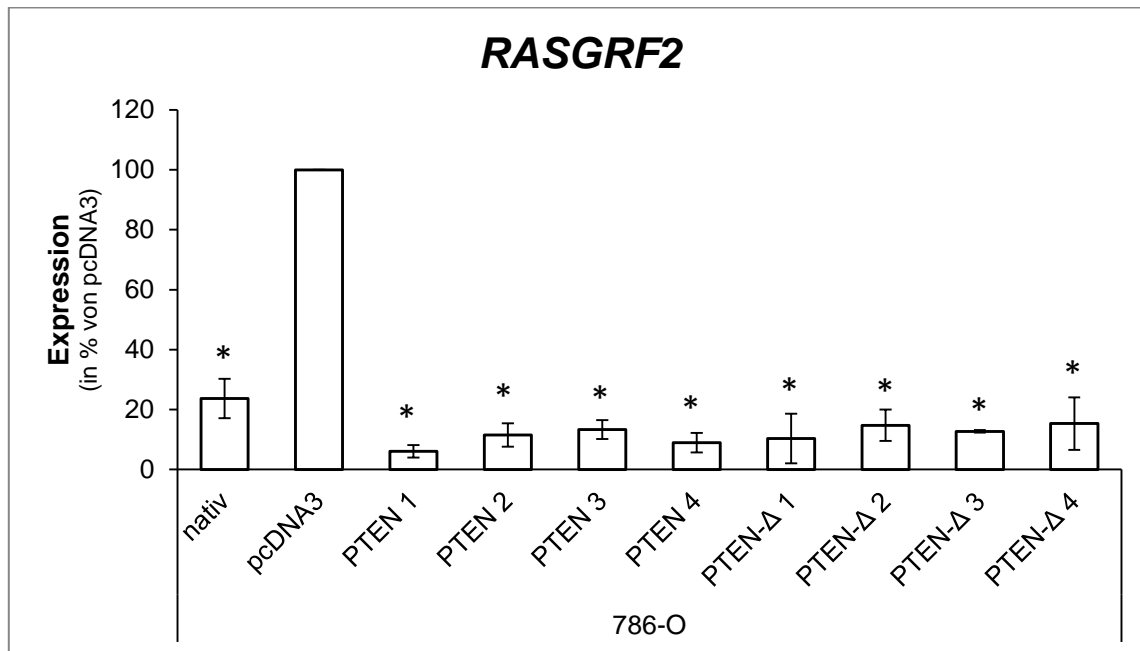


Abbildung 109: Expression von *RASGRF2* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Antigen CD319 wird durch das Gen *SLAMF7* kodiert. Es ist vor allem auf Plasmazellen exprimiert und reguliert die Immunantwort. Im multiplen Myelom ist *SLAMF7* an der Tumorentwicklung beteiligt und wird als therapeutisches Ziel genutzt (Lonial, 2016). In den transgenen 786-O Zellen war die *SLAMF7*-Expression stark reduziert. Sowohl durch PTEN als auch durch PTEN- Δ kam es zu einer signifikanten Verringerung der Expression in allen Klonen (Abbildung 110).

Die Serin/Threonin-Kinase 33 (*STK33*) wird von dem gleichnamigen Gen kodiert. In verschiedenen Tumorentitäten wie im Leberzellkarzinom oder im Lungenkarzinom nimmt *STK33* eine onkogene Rolle ein (Wang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). In den 786-O-Zellen wiesen PTEN und PTEN- Δ unterschiedliche Effekte auf die *STK33*-Expression auf. Während PTEN in allen Klonen eine Reduktion der Expression um mindestens 84 % induzierte, wiesen die PTEN- Δ 1- und 2-Zellen eine gesteigerte Expression auf 197 % bzw. 279 % auf. Die Klone PTEN- Δ 3 und 4 wichen nur geringfügig von den pcDNA3-Zellen ab (Abbildung 111).

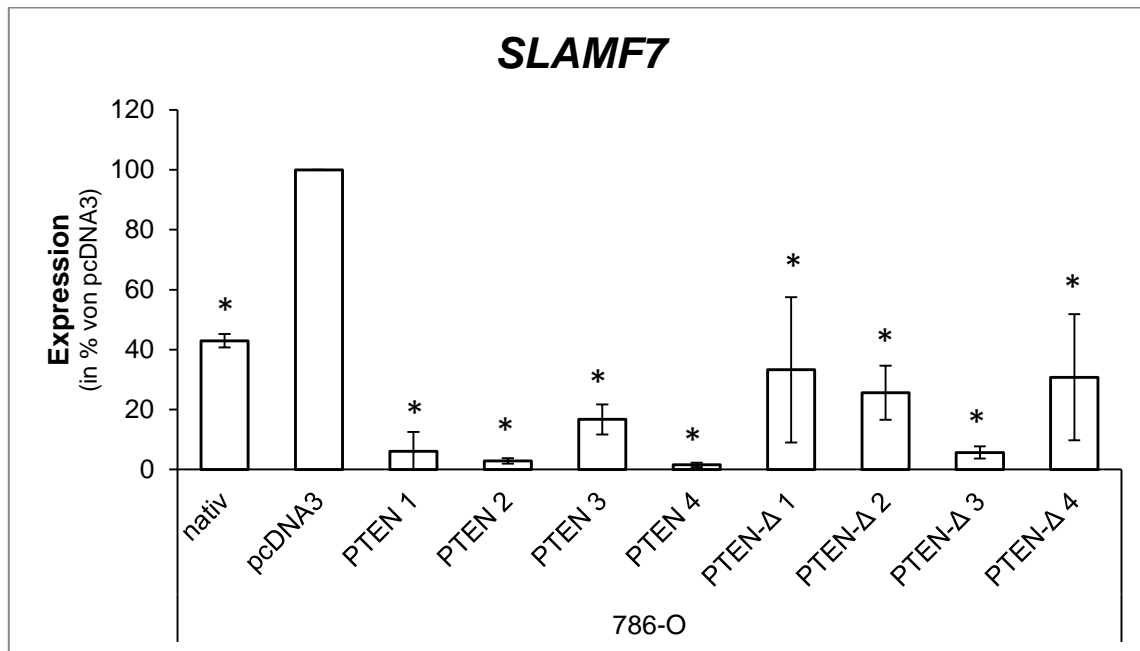


Abbildung 110: Expression von *SLAMF7* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

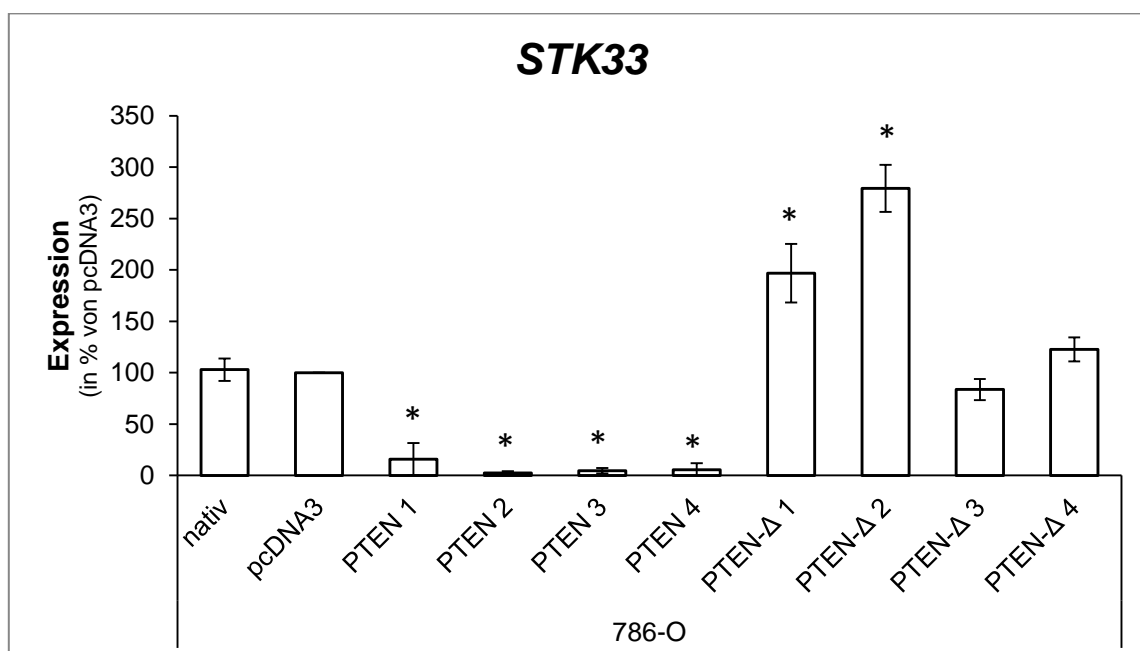


Abbildung 111: Expression von *STK33* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das Gen *WLS* (*wntless Wnt ligand secretion mediator*) ist ebenfalls ein Proteinkodierendes Gen. Das kodierte Protein beeinflusst den Wnt-Signalweg und eine

erhöhte Expression ist im Magen- und Darmkrebs mit einer schlechteren Prognose und Metastasierung assoziiert (Xu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). In der Zelllinie 786-O induzierte PTEN eine Reduktion der *WLS*-Expression. Dagegen zeigte sich in den PTEN- Δ -Zellen in drei von vier Klonen eine gesteigerte *WLS*-Expression um maximal 139 % (Abbildung 112).

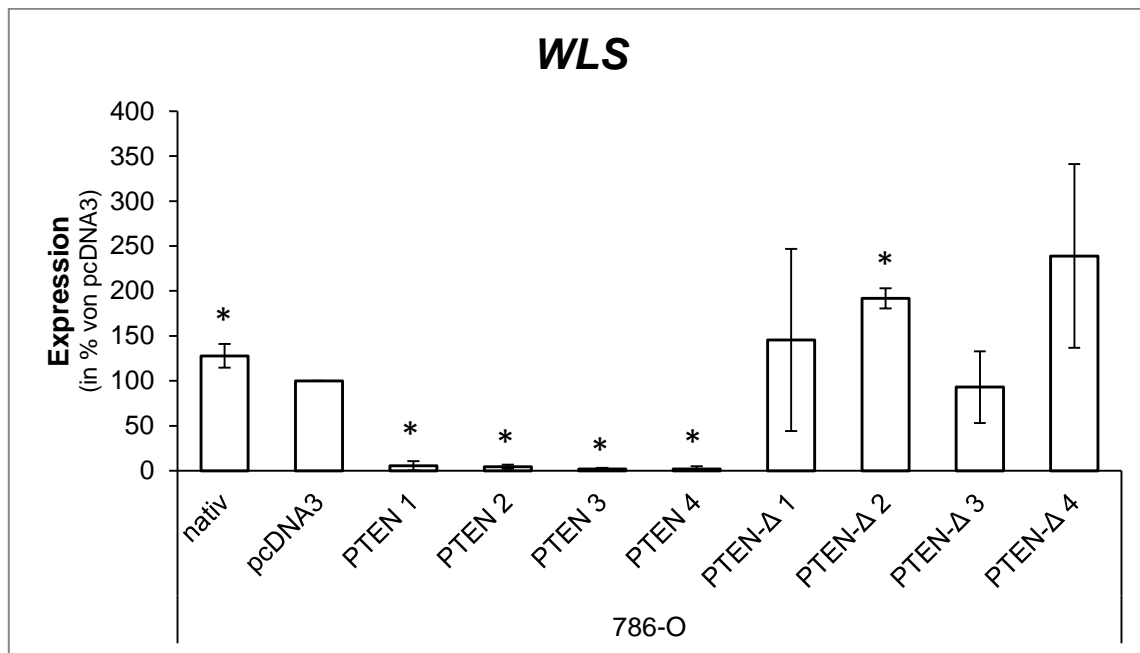


Abbildung 112: Expression von *WLS* in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O. Die ermittelten Expressionen wurden auf die Expression der Haushaltsgene *TBP* und *HPRT* normiert. Dargestellt sind die prozentualen, gemittelten Werte aus drei Durchgängen bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert < 0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

In der Zelllinie 786-O induzierten PTEN und PTEN- Δ für die Gene *RASGRF2* und *SLAMF7* ähnlich reduzierende Expressionseffekte. Die *RASGRF2*-Expression sank durch PTEN auf 10 % und durch PTEN- Δ auf 13 %. Bei dem Gen *SLAMF7* sank die Expression auf 7 % bei PTEN und auf 24 % bei PTEN- Δ . Dagegen wiesen die Gene *STK33* und *WLS* ein unterschiedliches Verhalten von PTEN und PTEN- Δ auf. In beiden Genen induzierte PTEN eine Reduktion auf unter 10 % im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen. In den PTEN- Δ 786-O-Zellen kam es zu einer Steigerung der *STK33*- und *WLS*-Expression um etwa 70 % (Abbildung 113).

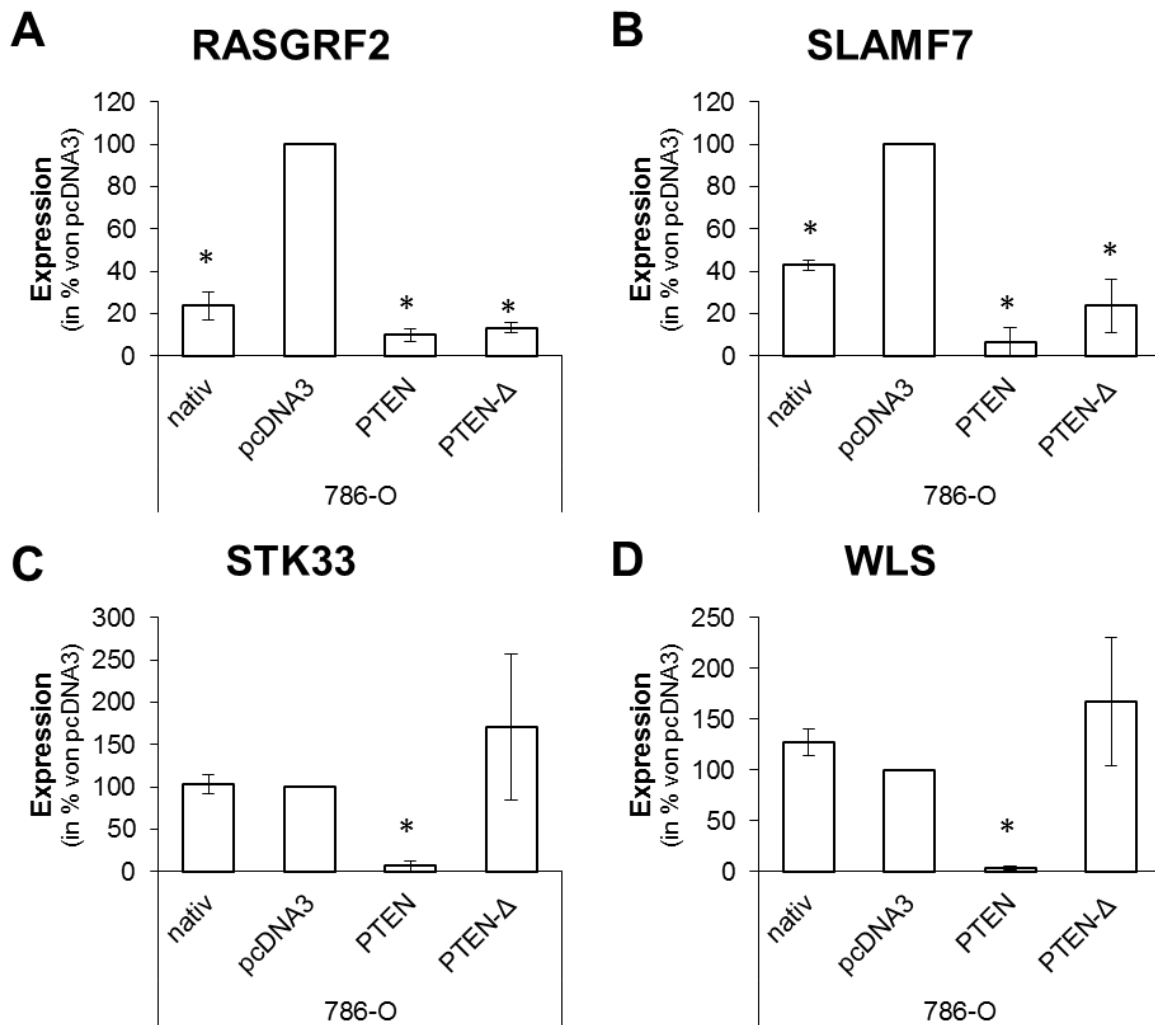


Abbildung 113: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Gene *RASGRF2* (A), *SLAMF7* (B), *STK33* (C) und *WLS* (D) der Zelllinie 786-O. Dargestellt sind die prozentualen Werte bezogen auf die pcDNA3-Zellen, sowie die Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die pcDNA3-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

3.4 Expression von PTEN- Δ im Tumorgewebe

3.4.1 Bedeutung von PTEN- Δ im Mammakarzinom

Der Einfluss von PTEN- Δ wurde in einer Kohorte von Patientinnen mit Mammakarzinom analysiert. Die Kohorte bestand aus 42 Patientinnen, welche alle keinen Befall der Lymphknoten bei Operation aufwiesen. Von den Patientinnen war das *Follow-Up* über einen Zeitraum von über zehn Jahren bekannt. Die Expressionen von *PTEN* und *PTEN- Δ* wurden mittels qPCR bestimmt und auf die Haushaltsgene *HPRT* und *TBP* normiert. In der folgenden statistischen Auswertung zeigte sich, dass die Expressionen sowohl für *PTEN* als auch für *PTEN- Δ* mit steigendem G-Stadium abnehmen (Abbildung 114).

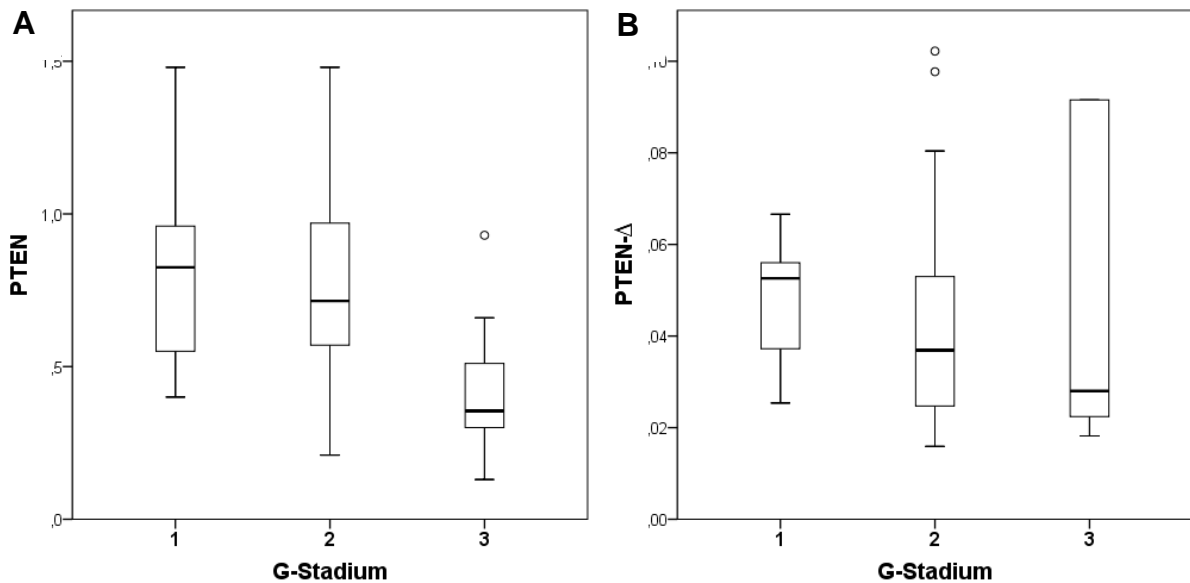


Abbildung 114: Expression von *PTEN* (A) und *PTEN-Δ* (B) in den einzelnen G-Stadien der Patientinnen der Mammakarzinom-Kohorte. Die Messung der Expressionen erfolgte in Duplikaten und mittels Normierung auf die Haushaltsgene *HPRT* und *TBP*. Dargestellt sind die Mediane mit den 25 % und 75 % Perzentilen sowie Minimum- und Maximum-Werte.

In einer Kaplan-Meier Analyse konnte festgestellt werden, dass Patientinnen mit einer höheren *PTEN*-Expression ein längeres metastasierungsfreies Überleben aufweisen im Vergleich zu Patientinnen mit einer niedrigen *PTEN*-Expression ($p = 0,029$). Dieser Zusammenhang konnte für *PTEN-Δ* in der Tendenz ebenfalls beobachtet werden ($p = 0,081$) (Abbildung 115).

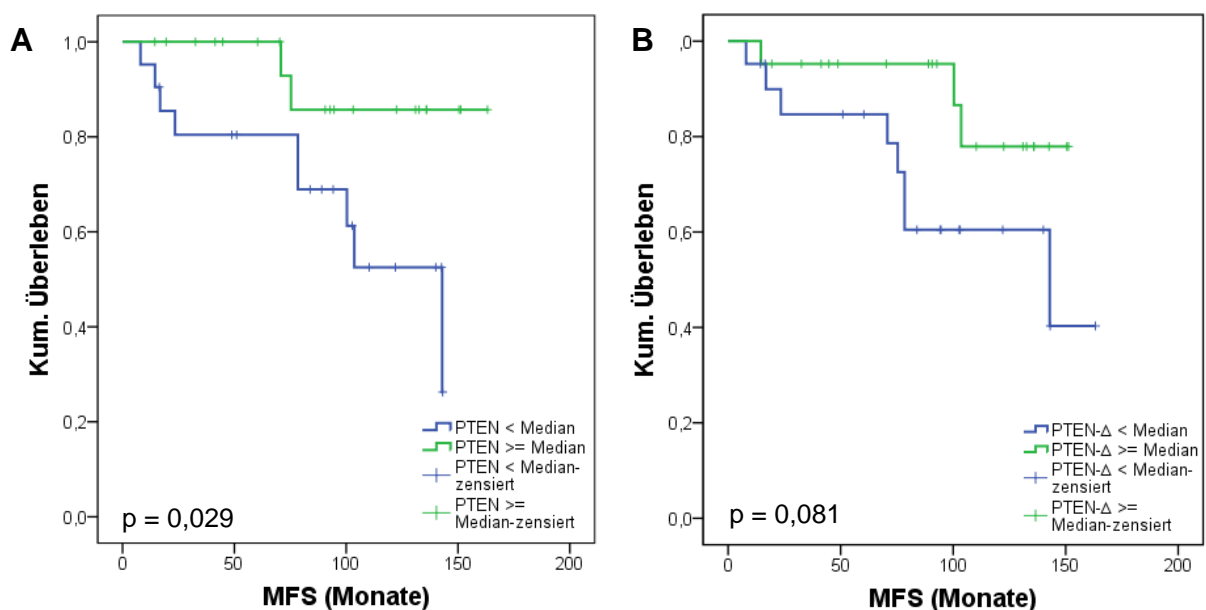


Abbildung 115: Metastasierungsfreies Überleben der Patientinnen der Mammakarzinom-Kohorte. Die Kaplan-Meier Kurve vergleicht das metastasierungsfreie Überleben von Patientinnen mit hoher oder niedriger *PTEN* (A) bzw. *PTEN-Δ* (B) Expression. Die Signifikanz wurde mittels eines Log-Rank-Tests ermittelt.

Ein Spearman-Rho-Test in der untersuchten Mammakarzinom-Kohorte zeigte, dass die Expressionen von *PTEN* und *PTEN-Δ* miteinander positiv korrelieren ($p = 0,001$, $r = 0,478$, $R^2 = 0,315$) (Abbildung 116).

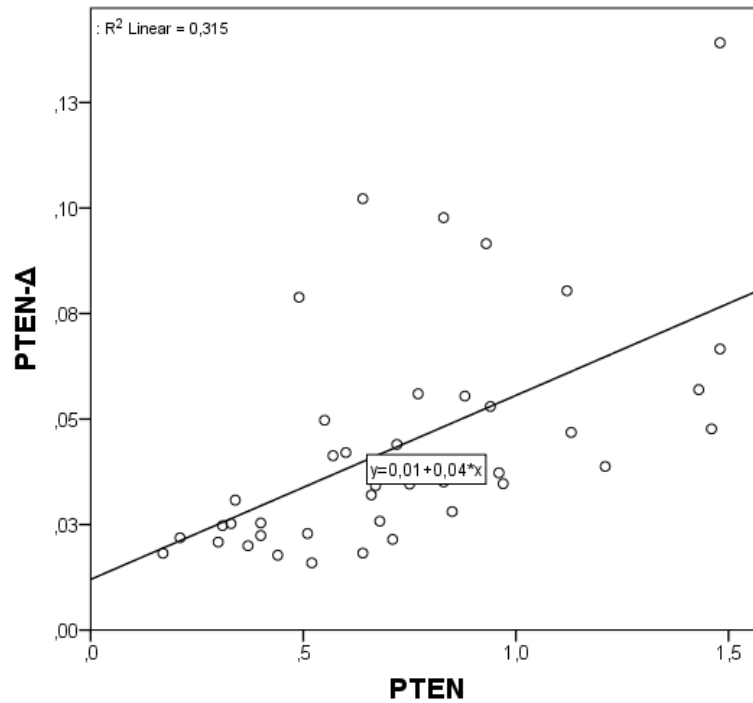


Abbildung 116: Korrelation zwischen *PTEN* und *PTEN-Δ* in der Mammakarzinom-Kohorte. Es wurde ein Spearman-Rho-Test durchgeführt ($p = 0,001$, $r = 0,478$, $R^2 = 0,315$). *PTEN* korreliert positiv mit *PTEN-Δ*.

4 Diskussion

4.1 Der Tumorsuppressor PTEN

Nach der Entdeckung des *PTEN/MMAC1/TEP1*-Gens 1997 wurde seine tumorsuppressive Rolle in der Genese und Progression verschiedener Tumorentitäten bereits nach kurzer Zeit bestätigt (Li *et al.*, 1997). Die von dem Gen kodierte dual-spezifische Phosphatase PTEN ist in der Regel aufgrund von Mutationen oder Deletionen in vielen Tumoren inaktiv. Die Mutationen treten vor allem in den beiden großen Domänen, der Phosphatase- und der C2-Domäne auf. Das *Cancer Genome Atlas*-Projekt konnte in 27 verschiedenen Tumorentitäten mehr als 1120 verschiedene Mutationen identifizieren. Hierbei handelte es sich vorwiegend um *Missense*- sowie *Nonsense*- oder *Frameshift*-Mutationen. Aber auch *in-frame* Deletionen wurden detektiert (Hopkins *et al.*, 2014). Neben genomischen Veränderungen kann *PTEN* auch durch epigenetische Modifikationen oder auf posttranskriptioneller Ebene reguliert werden. Für verschiedene miRNAs wie der miR-19 und der miR-21 konnte gezeigt werden, dass sie im Tumor verstärkt exprimiert werden und die Expression von *PTEN* reduzieren (Mavrakis *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2007). Ebenfalls konnte für das Pseudogen von PTEN gezeigt werden, dass dieses als lncRNA *PTENP1* die Expression von *PTEN* reguliert (Poliseno, Salmena, Zhang, *et al.*, 2010). Im Nierenzellkarzinom wurde von Yu *et al.* gezeigt, dass die Expression von *PTENP1* mit der Expression von *PTEN* und diese wiederum negativ mit der miR-21-Expression korrelieren. Es wird vermutet, dass *PTENP1* die miR-21 abfängt und somit den tumorsuppressiven Effekt von PTEN triggert (Yu *et al.*, 2014). Die Bedeutung von PTEN im NZK wurde bereits in mehreren Studien analysiert. In einer früheren Untersuchung an 42 Nierenzellkarzinomen konnten wir bereits zeigen, dass die PTEN-Expression während der renalen Karzinogenese verloren geht (Brenner *et al.*, 2002). Eine reduzierte Expression des Tumorsuppressors fanden auch Shin Lee *et al.* in einer NZK-Studie mit 67 Patienten (Shin Lee *et al.*, 2003). In einer Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer positiven PTEN-Expression ein längeres Gesamtüberleben aufweisen und, dass die PTEN-Expression mit den klinischen Parametern Tumorgröße, Fuhrman-Grad und Befall von Lymphknoten korreliert (Zhu *et al.*, 2015). Murray *et al.* zeigten, dass im Nierenzellkarzinom die *PTEN*-Mutationsrate vom Subtyp abhängig ist. In der Studie, welche 760 NZK untersuchte, lag die *PTEN*-Mutationsrate für chromophobe NZK bei 14 %, für papilläre

NZK bei 2,2 % und für klarzellige NZK bei 4,7 %. Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass 4,8 % aller klarzelligen NZK und 3,1 % aller chromophoben NZK eine homozygote Deletion des *PTEN*-Gens aufwiesen (Murray *et al.*, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei NZK-Zelllinien 786-O und A498 stabil mit dem *PTEN*-Gen transfiziert und anschließend in funktionellen *in vitro*-Analysen auf dessen Einfluss auf die Tumorprogression untersucht. Während der Tumorprogression kommt es zu einer schnellen Zunahme der Tumormasse und einer weiteren Steigerung der Invasivität des Tumors. Daher sind Prozesse wie Migration, Adhäsion, Proliferation und Apoptose von zentraler Bedeutung. Durch die Aktivierung von Onkogenen und die Hemmung von Tumorsuppressoren kommt es zur gezielten Veränderung der Signalweiterleitung der Zelle. Die tumorsuppressiven Eigenschaften von PTEN konnten auch in den beiden NZK-Zelllinien beobachtet werden. Insbesondere in den 786-O-Zellen, welche endogen eine homozygote Mutation c.445C>T im *PTEN*-Gen aufweisen, induzierte eine Überexpression von PTEN eine deutlich reduzierte Migration in Richtung verschiedener EZM-Komponenten, sowie eine reduzierte Adhäsion an diesen EZM-Komponenten. Die Veränderung der zellulären Prozesse war in den PTEN-überexprimierenden A498-Zellen weniger eindeutig. Die NZK-Zelllinie A498 exprimiert endogen PTEN, wodurch die Effekte möglicherweise im Vergleich zu den 786-O-Zellen, welche eine *PTEN*-Mutation aufweisen, weniger intensiv ausfielen. Der Einfluss von PTEN in den A498-Zellen war auf die Migration in Richtung der EZM-Komponenten im Mittel unverändert und insgesamt leicht schwankend. Dagegen induzierte die Überexpression eine stark reduzierte Adhäsion an den EZM-Komponenten (Tabelle 2). Dass PTEN einen Einfluss auf das Migrations- und Adhäsionspotential der Zelle nehmen kann, konnte bereits 1998 in murinen 3T3-Zellen gezeigt werden (Tamura *et al.*, 1998). Neuere Untersuchungen zeigten, dass PTEN in Gliom-Zellen ebenfalls die Adhäsion und Migration reduziert. Diese wird durch die C2-Domäne von PTEN induziert und ist von der PI3K-Signalkaskade unabhängig (Raftopoulou *et al.*, 2004). Die Migration wird dabei über die Proteinphosphatase-Aktivität von PTEN in einer Integrin-abhängigen Signalkaskade, welche *downstream* über Tyrosinkinase der SRC-Familie weitergeleitet wird, vermittelt (Dey *et al.*, 2008). In vorherigen Arbeiten konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Migration der NZK-Zelllinie 786-O über die Proteinphosphatase-Aktivität von PTEN und einer SHC-abhängigen Signalkaskade vermittelt wird (Schneider *et al.*,

2011). Hier konnte gezeigt werden, dass auch in NZK-Zellen PTEN einen Einfluss auf Adhäsion und Migration der Zelle nimmt. In beiden NZK-Zelllinien induzierte PTEN zudem eine Veränderung der Integrin-Zusammensetzung. Während in den 786-O-Zellen die Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 5$ verringert exprimiert wurden, konnte in den A498-Zellen eine Reduktion der Untereinheiten $\alpha 1$, αV und $\beta 3$ nachgewiesen werden (Tabelle 2). Die Integrin-Untereinheit $\alpha 1$ bildet zusammen mit $\beta 1$ den VLA-1 Rezeptor, welcher vor allem durch Bindung von Laminin und Kollagenen aktiviert wird. Dagegen bildet der $\alpha 5\beta 1$ -Komplex den VLA-5 Rezeptor, welcher aufgrund seiner vorwiegenden Bindung von Fibronectin auch Fibronectin-Rezeptor genannt wird. Die Untereinheit αV kann durch Komplexbildung mit verschiedenen β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 3$ oder $\beta 5$) einen Vitronectin-Rezeptor bilden. Diese können teilweise jedoch auch Fibronectin oder Laminin binden (Plow *et al.*, 2000). Möglicherweise induzierte die verringerte Expression der Integrine das reduzierte Adhäsions- und Migrationsverhalten. Zusätzlich konnte in den PTEN-überexprimierenden Zellen eine veränderte Aktivität nachgeschalteter Kinasen nachgewiesen werden. In den transgenen 786-O-Zellen konnte wie bereits in vorherigen Studien gezeigt werden, dass die Aktivität der Kinase AKT durch PTEN verringert wurde (Schneider *et al.*, 2011). Da PTEN als Gegenspieler der PI3K in der gleichnamigen Signalkaskade einer Ansammlung an PtdIns(3,4,5)P₃ entgegen wirkt führt dies zu einer geringeren Phosphorylierung der *downstream* befindlichen Kinase AKT (Chalhoub & Baker, 2009; Song *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte eine reduzierte Aktivität der Kinase p38 in beiden PTEN-überexprimierenden Zelllinien, sowie eine reduzierte Aktivität der JNK in den A498-Zellen, nachgewiesen werden (Tabelle 2). Dass PTEN nicht nur einen Einfluss auf die PI3K-Signalkaskade nimmt, konnte bereits von Vivanco *et al.* nachgewiesen werden. Sie zeigten, dass auch der JNK-Signalweg von PTEN reguliert wird (Vivanco *et al.*, 2007). Neben der JNK gehört auch die Kinase p38 zu der Familie der MAP-Kinasen. Beide Kinasen können Adhäsions- und Migrationsprozesse induzieren und kommunizieren untereinander (Tremblay *et al.*, 2006; Wagner & Nebreda, 2009). Somit führte die reduzierte Aktivität der Kinasen in den PTEN-überexprimierenden Zellen möglicherweise zu den verringerten Migrations- und Adhäsionspotentialen. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der Einfluss auf die Proliferation, Viabilität und Apoptose untersucht. Diese zellulären Prozesse waren nur minimal verändert und wurden somit in den NZK-Zellen nicht signifikant durch PTEN beeinflusst.

PTEN induzierte besonders im Transkriptom zellspezifische, unterschiedliche Genexpressionsveränderungen. In der Zelllinie 786-O konnte für die vier Gene *RASGRF2*, *SLAMF7*, *STK33* und *WLS* eine deutlich reduzierte Expression in den PTEN transgenen Zellen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 2). Das Gen *RASGRF2* kodiert einen Nukleotid-Austauschfaktor, welcher die aktive Form von RAS GTPasen stabilisiert, indem es den Austausch von GDP mit GTP fördert (Bos *et al.*, 2007). Eine Beteiligung des Gens in verschiedenen Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden. Im nicht-klarzelligen Lungenkarzinom wurde gezeigt, dass in ein Drittel aller Patienten das Gen ausgeschaltet ist (Chen *et al.*, 2006). Im Bauchspeicheldrüsenkrebs und im Kolonkarzinom konnte ebenfalls eine veränderte Methylierung des Genabschnitts nachgewiesen werden (Hagihara *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2007). PTEN induzierte in den NZK-Zellen eine reduzierte *RASGRF2*-Expression. Da *RASGRF2* die Stabilität der aktiven Form von dem Proto-Onkogen RAS stabilisiert (Colicelli, 2004), wird eine verringerte Genexpression zu einer reduzierten RAS-Aktivität und der *downstream* befindlichen MAPK-Signalkaskade führen. In der vorliegenden Arbeit konnte für die PTEN-überexprimierenden Zellen gezeigt werden, dass die Aktivität der p38-Kinase deutlich reduziert war (Tabelle 2).

Die Serin/Threonin-Kinase 33 (STK33) wird von dem gleichnamigen Gen kodiert und beeinflusst die Proliferation und Apoptose von Tumorzellen. In verschiedenen Tumorentitäten, wie im Leberzellkarzinom oder im Lungenkarzinom, nimmt STK33 eine onkogene Rolle ein (Wang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016). Des Weiteren wird eine Verbindung zwischen dem zur RAS-Familie gehörenden KRAS und der Kinase STK33 vermutet. Tumorzellen, welche eine aktivierende Mutation in KRAS aufweisen, zeigten einen Zusammenhang mit STK33 in Bezug auf Proliferation und Zellviabilität (Scholl *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate in diesen Zellen nach Inhibierung von STK33 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutlich erhöht wurde (Azoitei *et al.*, 2012). In den PTEN-überexprimierenden 786-O-Zellen war die *STK33*-Expression signifikant reduziert (Tabelle 2), wodurch möglicherweise unter anderem die tumorsuppressiven Eigenschaften von PTEN induziert wurden.

Neben der MAPK-Kaskade wurde auch die Wnt-Kaskade durch PTEN beeinflusst. Das Protein des Gens *WLS* beeinflusst den Wnt-Signalweg durch die Regulation der Wnt-Sekretion. Die Wnt-Signalkaskade reguliert zelluläre Prozesse wie Migration,

Adhäsion und Regeneration. Im Mammakarzinom triggert *WLS* die Proliferation der Tumorzellen (Lu *et al.*, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Wnt-Signalkaskade die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) verhindert und somit die Metastasierung inhibiert (DiMeo *et al.*, 2009). Im Magen- und Darmkrebs konnte eine erhöhte *WLS*-Expression mit einer schlechteren Prognose und Metastasierung assoziiert werden (Xu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Der Tumorsuppressor PTEN induzierte in den NZK-Zellen eine reduzierte *WLS*-Expression (Tabelle 2). Diese könnte zu einer reduzierten Aktivität der Wnt-Signalkaskade führen und so zu den reduzierten Migrations- und Adhäsionspotentialen der Tumorzellen beitragen. Die in dieser Arbeit untersuchten *downstream* befindlichen Signalmoleküle β -Catenin und CREB wiesen keine eindeutige Veränderung in ihrer Aktivität auf (Abbildung 103). Möglicherweise wird die Kaskade auf einer anderen Ebene bereits negativ beeinflusst.

Das Antigen CD319 wird durch das Gen *SLAMF7* kodiert. Es ist vor allem auf malignen Plasmazellen exprimiert und reguliert die Immunantwort. Im multiplen Myelom ist *SLAMF7* an der Tumorprogression beteiligt und wird als therapeutisches Ziel durch Verwendung von Checkpoint-Inhibitoren genutzt (Lonial, 2016). Diese verringern durch Hemmung von *SLAMF7* die Unterdrückung des Immunsystems und steigern so die Bekämpfung der Tumorzellen (Balasa *et al.*, 2015; Pazina *et al.*, 2014). In den 786-O-Zellen induzierte PTEN eine reduzierte *SLAMF7*-Expression (Tabelle 2). Dies könnte die tumorsuppressiven Eigenschaften von PTEN unterstützen, da Tumorzellen mit geringerer *SLAMF7*-Expression besser von Immunzellen erkannt werden und so eine Immunabwehr induzieren.

In den PTEN-überexprimierenden A498-Zellen wurden Expressionsveränderungen in den Genen *CRLF1*, *IFI27*, *TNFRSF1B* und *POSTN* nachgewiesen. Das Gen *IFI27* zählt zu den Apoptose-bezogenen Genen und das kodierte Protein kann die Apoptose über eine Interferon-Zytochrom C-Caspase-Achse triggern (Cheriyath *et al.*, 2011; Wrangle *et al.*, 2013). Eine *IFI27*-Überexpression wurde erstmals im Mammakarzinom nachgewiesen (Rasmussen *et al.*, 1993). Im Hautkrebs wurde die verstärkte *IFI27*-Expression mit einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen assoziiert. Dagegen konnte im Ovarialkarzinom gezeigt werden, dass *IFI27* die EMT triggert und die Kanzerogenität fördert (Li *et al.*, 2015). Makovitzki-Avraham *et al.* untersuchten die Funktion von *IFI27* in Brustkrebszellen *in vitro* und zeigten hier eine pro-apoptotische Funktion

des Gens auf. Sie vermuteten, dass weitere Faktoren aus der Tumorumgebung eine Rolle in der Regulation der Apoptose einnehmen, die die *IFI27*-Expression in der Tumorgenese begünstigen müssen (Makovitzki-Avraham *et al.*, 2013). In den PTEN-überexprimierenden A498-Zellen konnte eine verstärkte *IFI27*-Expression nachgewiesen werden (Tabelle 2). Des Weiteren wurde in diesen Zellen eine erhöhte Apoptoserate festgestellt. Diese könnte durch die erhöhte *IFI27*-Expression induziert worden sein.

Das Gen *TNFRSF1B* ist ebenfalls an der Regulation der Apoptose beteiligt. *TNFRSF1B* ist ein Tumornekrose-Faktor-Rezeptor, an welchen TNF- α binden kann und welcher vorwiegend über die AKT-Signalkaskade anti-apoptotisch wirkt (Naude *et al.*, 2011). Die Expression von *TNFRSF1B* wurde bereits mit der Entwicklung von Metastasen in Lungenkarzinomen in Verbindung gebracht (Yan *et al.*, 2015). Im Gallengangkrebs wurde die Expression von *TNFRSF1B* mit einer gesteigerten Aggressivität assoziiert (Tanimura *et al.*, 2005). Der Tumorsuppressor PTEN induzierte in den A498-Zellen eine Reduktion der *TNFRSF1B*-Expression und könnte somit für die gesteigerte Apoptose mitverantwortlich sein (Tabelle 2).

Periostin, welches von dem Gen *POSTN* kodiert wird, ist ein extrazelluläres Matrixprotein. Es fungiert als Ligand für verschiedene Integrine und unterstützt die zelluläre Adhäsion und Migration (Gillan *et al.*, 2002). Bei Patienten mit Kopf- und Halskrebs oder mit Ovarialkarzinom wurde *POSTN* bereits mit einer schlechteren Prognose sowie einer verstärkten Metastasierung assoziiert (Karlan *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2016). Gillan *et al.* konnten zeigen, dass Periostin an die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ von Ovarialkarzinom-Zellen binden und deren Adhäsion und Migration triggern (Gillan *et al.*, 2002). Im Kolonkarzinom wurde nachgewiesen, dass Periostin die Metastasierung über $\alpha V\beta 3$ und der AKT-Signalkaskade fördert (Bao *et al.*, 2004). In den transgenen A498-Zellen induzierte PTEN ein reduziertes Adhäsions- und Migrationspotential. Dieses wurde möglicherweise durch die reduzierte αV - und *POSTN*-Expression induziert (Tabelle 2) und zeigt die tumorsuppressiven Eigenschaften von PTEN auf.

Das Gen *CRLF1* kodiert einen Zytokin-Faktor, welcher als Komplex mit dem Faktor CLCF1 wirkt. Der Komplex spielt vor allem in der Entwicklung eine wichtige Rolle und

aktiviert verschiedene MAPK-Signalkaskaden via JAK (Sims, 2015). Im nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom konnte gezeigt werden, dass CRLF1/CLCF1 die Tumorpheression fördert (Vicent *et al.*, 2012). PTEN induzierte in den NZK-Zellen A498 eine signifikant verringerte *CRLF1*-Expression, welche möglicherweise mit der reduzierten Aktivität der MAP-Kinasen p38 und JNK assoziiert ist (Tabelle 2).

Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den beiden NZK-Zelllinien sind möglicherweise dadurch bedingt, dass die A498-Zellen bereits endogen PTEN exprimieren und eine weitere Überexpression keinen bzw. nur noch einen geringen Effekt ausübt. In diesen Tumorzellen konnte kein eindeutiger Einfluss von transfiziertem PTEN auf die AKT-Signalkaskade nachgewiesen werden. Möglicherweise umgehen die A498-Zellen bereits die durch PTEN-gehemmte Signalkaskade und erhalten ihre tumorösen Eigenschaften, indem sie auf andere Signalkaskaden zurückgreifen. Die einzige Kinase, welche in beiden NZK-Zelllinien durch transfiziertes PTEN eine reduzierte Aktivität aufwies, war die MAPK p38. Eine Beteiligung der Kinase p38 an den Prozessen der Metastasierung konnte bereits in anderen Tumor-entitäten gezeigt werden. In Kopf-Hals-Tumorzellen, Gliom-Zellen und in hepatozellulären Tumorzellen wurde p38 mit einer gesteigerten Invasivität und Progression assoziiert (Demuth *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2007; Junttila *et al.*, 2007). Matsuo *et al.* konnten zeigen, dass die Bildung von Lungenmetastasen *in vivo* von der p38-Aktivität abhängt (Matsuo *et al.*, 2006). Der Einfluss der PTEN-Überexpression in den NZK-Zelllinien auf die Prozesse der Metastasierung, insbesondere die verringerte Adhäsionsfähigkeit, könnte somit möglicherweise über die p38 induziert worden sein.

Tabelle 2: Übersicht über die Effekte, die von PTEN in den Zelllinien 786-O und A498 induziert wurden. Dargestellt ist der Einfluss von PTEN auf die untersuchten Prozesse bzw. Expressionen. Die relativen Abweichungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen wurden durch die Verwendung von Pfeilen dargestellt.

	PTEN	
	786-O	A498
Migration	FN ↓↓ VN ↓↓ LM ↓↓↓ KI ↓↓ KIV ↓↓	FN ↔ VN ↓ LM ↑ KI ↔ KIV ↔
Adhäsion	FN ↓ VN ↓ LM ↓↓ KI ↓ KIV ↓	FN ↓↓ VN ↓↓ LM ↓↓↓ KI ↓↓ KIV ↓↓
Integrin-Expression	α1 ↓ α5 ↓	α1 ↓ αV ↓ β3 ↓
Proliferation	↔	↔
Viabilität	↔	↔
Apoptose	↔	↑
Aktivität von Kinasen	p38 ↓ AKT (S473) ↓ AKT (T308) ↓↓	p38 ↓ JNK ↓↓
Gen-Expression	<i>RASGRF2</i> ↓↓ <i>SLAMF7</i> ↓↓ <i>STK33</i> ↓↓ <i>WLS</i> ↓↓↓	<i>CRLF1</i> ↓↓↓ <i>IFI27</i> ↑↑ <i>TNFRSF1B</i> ↓↓↓ <i>POSTN</i> ↓↓↓

4.2 Beteiligung von PTEN-Δ an der Tumorprogression

Während der Transkription von *PTEN* kommt es neben der Bildung von PTEN auch zur Ausbildung alternativer, natürlicher Splice-Varianten. Derzeit sind zehn alternative Splice-Varianten bekannt (Abbildung 8). Die ersten zwei wurden 2000 von Sharrard *et al.* identifiziert und als PTEN-B und PTEN-Δ bezeichnet (Sharrard & Maitland, 2000). PTEN-Δ wird durch Inklusion des 5'-Endes von Intron H nach Exon 8 generiert, wodurch eine gekürzte codierende Sequenz entsteht. Die 61 Aminosäuren von Exon 9 werden durch die zwei Aminosäuren VS (Valin und Serin) aus Intron H am C-Terminus des Proteins ersetzt (Sharrard & Maitland, 2000). Neben PTEN-Δ und PTEN-B konnten noch weitere Splice-Varianten in verschiedenen humanen Geweben identifiziert werden. Diese wurden als SV-5a, SV-5b und SV-5c aufgrund einer Inklusion des Introns E bzw. als SV-3a, SV-3b und SV-3c, durch Einbeziehung des Introns C,

bezeichnet. Neben der Inklusion von Intron-Sequenzen wurden zwei Splice-Varianten entdeckt, welche Deletionen des Exons 5 bzw. Exons 6 aufweisen. Diese wurden als SV-DelE5 bzw. SV-DelE6 bezeichnet (Agrawal & Eng, 2006). Während Sharrard *et al.* die Expression der Splice-Varianten PTEN- Δ und PTEN-B nur auf mRNA-Ebene nachwies, zeigten Agrawal *et al.* für die Splice-Varianten SV-5a, SV-5b, SV-5c und SV-DelE6 zusätzlich, dass diese in einer zellfreien *in vitro* Translation auch auf Proteinebene exprimiert werden können (Agrawal & Eng, 2006; Sharrard & Maitland, 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PTEN- Δ ebenfalls in einer zellfreien *in vitro* Translation auf Proteinebene generiert werden kann. Des Weiteren konnte durch Verwendung eines geeigneten Tags gezeigt werden, dass PTEN- Δ in den stabil transfizierten Zellen translatiert wird (Abbildung 14). PTEN- Δ muss somit eine ausreichende Proteinstabilität aufweisen. Durch die gekürzte Sequenz von PTEN- Δ fehlt dem translatierten Protein ein Teil der Carboxyl-terminalen Region, in der sich auch die C2-, die C-*tail*- und die PDZ-bindende-Domäne befindet (Abbildung 117). Die C2-Domäne besteht aus einem β -Sandwich, welchem eine besondere Beteiligung an der Stabilität von PTEN zugesprochen wird. Mutationsstudien in dieser Region haben gezeigt, dass PTEN bei Veränderungen in der Sequenz instabil und schneller abgebaut wird (Georgescu *et al.*, 1999). Jedoch konnten Schneider *et al.* zeigen, dass eine Deletions-Mutante, welche C-terminal um 67 Aminosäuren verkürzt ist und in 786-O-Zellen exprimiert wurde, funktionelle Eigenschaften analog zu PTEN aufweist (Schneider *et al.*, 2011). PTEN- Δ weist mit seinen fehlenden 61 Aminosäuren somit noch sechs weitere Aminosäuren im Vergleich zu dieser Mutante auf. Da ein Nachweis von PTEN- Δ in den transgenen Zelllinien möglich war, wird die Stabilität von PTEN- Δ möglicherweise durch die noch vorhandenen Elemente der C2-Domäne und die zusätzlichen Aminosäuren VS induziert.

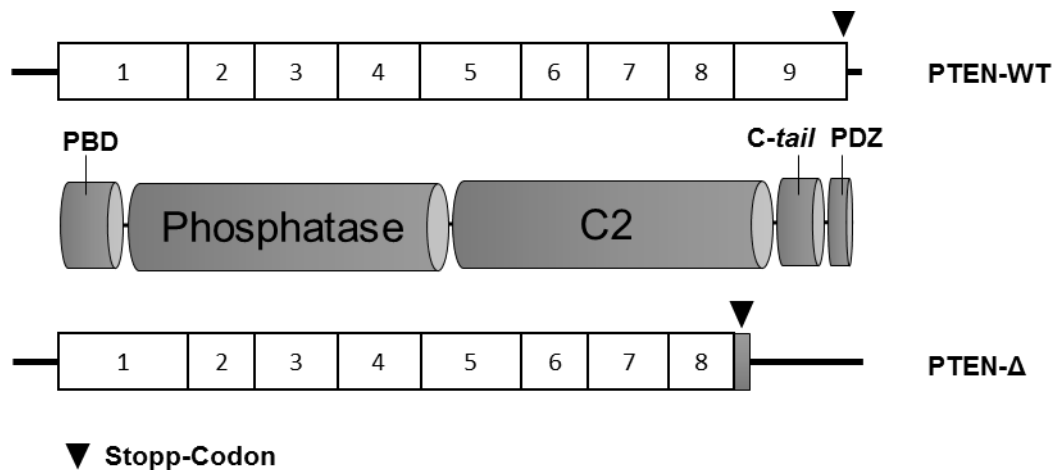


Abbildung 117: Schematische Darstellung von PTEN und der Splice-Variante PTEN- Δ , der Exons sowie der dazugehörigen funktionellen Domänen. Die Gensequenz wird über die durchnummerierten Exons dargestellt. Die Zylinder stellen die fünf funktionellen Domänen dar.

Eine Beteiligung der Splice-Varianten an der Tumorprogression wurde bisher noch nicht untersucht. Agrawal *et al.* zeigten lediglich in einer kleinen Kohorte von 12 Patientinnen mit Brustkrebs, dass die Splice-Varianten SV-5c, SV-3b, SV-3c und SV-DelE6 im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe eine reduzierte Expression aufwiesen. Dagegen war SV-5b im Tumorgewebe verstärkt exprimiert (Agrawal & Eng, 2006). Diese ersten Erkenntnisse zeigen eine mögliche Beteiligung der Splice-Varianten an der Tumorgenese sowie Progression auf. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von PTEN- Δ für die Tumorprogression des NZK und des Mammakarzinoms näher untersucht. Im Brustkrebs konnte an einer Patientinnen-Kohorte gezeigt werden, dass eine erhöhte PTEN- Δ -Expression mit einem längeren metastasierungsfreien Überleben und einem kleinerem G-Stadium assoziiert ist. In den beiden NZK-Zelllinien 786-O und A498 induzierte die Überexpression der Splice-Variante PTEN- Δ einen deutlichen Einfluss auf die Prozesse der Tumorprogression *in vitro*. Dieser zeigte sich vor allem in der Migrations- und Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen. Tumorzellen können durch eine verstärkte Migration und Adhäsion die Invasivität des Tumors fördern und so die Bildung von Fernmetastasen und die Vergrößerung der Tumormasse triggern. PTEN- Δ induzierte in den NZK-Zelllinien eine signifikante Reduktion des Migrationspotentials in Richtung relevanter EZM-Komponenten, sowie eine Reduktion des Adhäsionspotentials an diesen (Tabelle 3). Die Splice-Variante nimmt damit eine eher tumorsuppressive Rolle in der Tumorprogression ein. Migrations- und Adhäsionsprozesse werden vor allem über die Integrin-Signalkaskade vermittelt. Die Analyse verschiedener Integrin-Untereinheiten zeigte, dass in den PTEN- Δ -überexprimierenden 786-O-Zellen die Untereinheiten α 1

und $\alpha 5$, welche nach Komplexierung mit einer β -Untereinheit vor allem Rezeptoren für Laminin, Kollagene und Fibronectin sind, reduziert exprimiert wurden. In den transgenen A498-Zellen, welche endogen PTEN exprimieren, induzierte PTEN- Δ neben einer Reduktion von $\alpha 1$ und $\alpha 5$ zusätzlich eine Reduktion in der Expression von $\alpha 2$, $\alpha 3$, αV , $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 3$ (Tabelle 3). Diese können in Kombination Rezeptoren für die EZM-Komponenten Fibronectin ($\alpha_{4,5,V}\beta 1$, $\alpha V\beta 3$), Vitronectin ($\alpha V\beta_{1,3}$), Laminin ($\alpha_{1,2,3,6}\beta 1$, $\alpha V\beta 3$) und die Kollagene I und IV ($\alpha_{1,2}\beta 1$) ausbilden (Plow *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2007). Die stärkere Veränderung der Integrin-Zusammensetzung in den A498-Zellen spiegelte sich in den vergleichsweise höheren Reduktionen des Migrations- sowie des Adhäsionspotentials wider (Tabelle 3). Die Signalweiterleitung der Integrine erfolgt nach Bindung des Liganden über verschiedene Signalmoleküle, welche *downstream* über MAPK-Signalkaskaden Einfluss auf Transkriptionsfaktoren wie ELK-1, c-Jun oder Fox-P1 nehmen (Aplin *et al.*, 2002; Shi & Simon, 2006). In den beiden PTEN- Δ -überexprimierenden NZK-Zellen konnte eine reduzierte Aktivität der Kinase p38 sowie in den A498-Zellen eine verringerte JNK-Aktivität nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich die Reduktion der Migration und Adhäsion vermittelt hat. Die Integrin-Untereinheit $\alpha 1$ ist in Kolonkarzinomzellen mit der Invasion via der JNK-Kaskade assoziiert (Van Slambrouck *et al.*, 2007). Ebenfalls können die Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ über JNK die Tumorprogression beeinflussen (Jin *et al.*, 2011; Snider *et al.*, 2008). Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Integrin-Untereinheiten $\alpha 2$ und αV via der p38-Signalkaskade die Invasivität von Tumorzellen triggern (Chen *et al.*, 2001; Ivaska *et al.*, 1999). Bei der Tumorprogression spielen neben Adhäsion und Migration auch die Proliferation und Viabilität der Zellen eine wichtige Rolle. Eine Überexpression von PTEN- Δ induzierte in den NZK-Zellen keine Veränderung dieser zellulären Prozesse. Dagegen zeigte sich, dass die Apoptoserate durch PTEN- Δ leicht erhöht wurde (Tabelle 3). Tumorzellen, die über verschiedene Signalkaskaden die Apoptose herunterregulieren, haben einen deutlichen Überlebensvorteil. Die verstärkte Apoptoserate in den transgenen NZK-Zellen könnte durch die AKT-Signalkaskade induziert worden sein, da im Westernblot gezeigt wurde, dass die Zellen eine verringerte AKT-Aktivität aufweisen. Die Kinase AKT ist erst vollständig aktiv, wenn sie an ihren beiden Phosphorylierungsstellen S473 und T308 phosphoryliert wurde (Engelman *et al.*, 2006). Die reduzierte Aktivität zeigte sich in den transgenen NZK-Zellen vor allem durch eine verringerte Phosphorylierung an T308. *Downstream* wirkt AKT auf verschiedene

Transkriptionsfaktoren und kann so Einfluss auf zelluläre Prozesse wie die Apoptose nehmen (Chalhoub & Baker, 2009). Die Effekte von PTEN- Δ auf die untersuchten zellulären Prozesse der Tumorprogression weisen insgesamt auf eine tumorsuppressive Rolle der Splice-Variante hin, denn dessen Überexpression induzierte eher eine Reduktion der tumorfördernden Prozesse.

Bei der Analyse des Transkriptoms zeigten sich in den PTEN- Δ -überexprimierenden NZK-Zellen deutliche Unterschiede zwischen den 786-O-Zellen und den A498-Zellen. In den 786-O-Zellen waren die Genexpressionen von *RASGRF2* und *SLAMF7* im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen signifikant reduziert (Tabelle 3). Durch Reduktion von *RASGRF2* und *SLAMF7*, beides Gene mit eher pro-onkogenen Funktionen (siehe Abschnitt 4.1), übt PTEN- Δ eine eher tumorsuppressive Wirkung aus. Möglicherweise ist die reduzierte p38-Aktivität, welche in den transgenen 786-O-Zellen zu beobachten war, durch die reduzierte *RASGRF2*-Expression bedingt, da p38 ein *downstream* Target von RAS darstellt.

Dagegen war die Expression der Gene *STK33* und *WLS* leicht erhöht (Tabelle 3). Die Kinase *STK33* wird in der Literatur vorwiegend als Onkogen charakterisiert. Sie ist in vielen Tumorentitäten verstärkt exprimiert (siehe Abschnitt 4.1). PTEN- Δ induzierte in den NZK-Zellen eine leichte Erhöhung der *STK33*-Expression. Jedoch zeigte sich die onkogene Rolle von *STK33* in den Veränderungen der zellulären Prozesse in den transgenen 786-O-Zellen nicht (Tabelle 3). Daher ist davon auszugehen, dass die Kinase in diesen Zellen eine untergeordnete Funktion einnimmt oder dass ihre Wirkung durch eine Gegenregulation über andere Signalmediatoren aufgehoben wird.

WLS beeinflusst die Wnt-Sekretion und somit die Adhäsion und Migration der Zelle via Wnt-Signalkaskade (siehe Abschnitt 4.1). Im NZK triggert die Wnt-Signalkaskade über β -Catenin die Aggressivität des Tumors (Kojima *et al.*, 2009). In den PTEN- Δ -überexprimierenden 786-O-Zellen war die *WLS*-Expression im Vergleich zu pcDNA3-Zellen leicht erhöht (Tabelle 3). Allerdings zeigten die nachgeschalteten Signalmoleküle β -Catenin und CREB keine Veränderung in ihrer Aktivität (Abbildung 103). Möglicherweise ist die Wnt-Kaskade weniger relevant für die Tumorprogression in den untersuchten NZK-Zellen oder erfolgt über andere Signalmediatoren. Inoki *et al.* konnten

zeigen, dass Wnt auch über die GSK3 Einfluss auf die AKT-Signalkaskade und auf das Zellwachstum nehmen kann (Inoki *et al.*, 2006).

In den PTEN- Δ -überexprimierenden A498-Zellen wurden dieselben Gene, welche in den PTEN transgenen A498-Zellen verändert exprimiert waren, untersucht. Hier zeigte sich, dass die Gene *CRLF1*, *TNFRSF1B* und *POSTN* signifikant verringert exprimiert wurden und dass die *IFI27*-Expression im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen erhöht war (Tabelle 3). PTEN- Δ induzierte in den A498-Zellen eine erhöhte Apoptoserate, welche wahrscheinlich durch die erhöhte *IFI27*- und die erniedrigte *TNFRSF1B*-Expression induziert wurde (siehe Abschnitt 4.1). Des Weiteren sind Periostin und die Integrine wichtige Modulatoren, welche die Adhäsion und Migration der Zelle beeinflussen können. In den transgenen A498-Zellen könnte das Zusammenspiel der reduzierten Integrin-Untereinheiten und des *POSTN*-Gens das reduzierte Adhäsions- und Migrationspotential bedingen. *CRLF1* triggert via MAPK-Signalkaskaden die Tumorphoresis (siehe Abschnitt 4.1). PTEN- Δ induzierte in den A498-Zellen sowohl eine reduzierte *CRLF1*-Expression als auch eine reduzierte Aktivität der MAP-Kinasen p38 und JNK (Tabelle 3). Periostin, *CRLF1* sowie die Integrine induzierten offenbar alle die reduzierte Aktivität der MAPK p38 und JNK. Dass Periostin via den Integrin-Untereinheiten αV und $\beta 3$ in den Migrationsprozessen des NZK eine wichtige Rolle einnimmt, konnten bereits Chuanyu *et al.* zeigen. Die Migrationsfähigkeit der 786-O-Zellen wurde dabei über JNK reguliert (Chuanyu *et al.*, 2017).

Tabelle 3: Übersicht über die Effekte, die von PTEN- Δ in den Zelllinien 786-O und A498 induziert wurden. Dargestellt ist der Einfluss von PTEN- Δ auf die untersuchten Prozesse bzw. Expressionen. Die relativen Abweichungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen wurden durch die Verwendung von Pfeilen dargestellt.

PTEN- Δ		
	786-O	A498
Migration	FN ↓↓ VN ↓↓ LM ↓↓↓ KI ↓↓ KIV ↓↓	FN ↓↓↓ VN ↓↓↓ LM ↓↓↓ KI ↓↓ KIV ↓↓
Adhäsion	FN ↓ VN ↓ LM ↓↓ KI ↓ KIV ↓	FN ↓ VN ↓↓ LM ↓↓ KI ↓↓ KIV ↓↓
Integrin-Expression	α 1 ↓ α 5 ↓	α 1 ↓↓ α 2 ↓ α 3 ↓ α V ↓ α 5 ↓↓ α 6 ↓ β 1 ↓↓ β 3 ↓
Proliferation	↔	↔
Viabilität	↔	↔
Apoptose	↑	↑↑
Aktivität von Kinasen	p38 ↓ AKT (S473) ↓ AKT (T308) ↓↓↓	p38 ↓↓ JNK ↓↓ AKT (T308) ↓
Gen-Expression	RASGRF2 ↓↓ SLAMF7 ↓↓ STK33 ↑ WLS ↑	CRLF1 ↓↓↓ IFI27 ↑↑ TNFRSF1B ↓↓↓ POSTN ↓↓↓

4.3 PTEN- Δ - ein Tumorsuppressor wie PTEN?

Dass PTEN einen klassischen Tumorsuppressor darstellt, konnte bereits in vielen Studien zu verschiedenen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. In dieser Arbeit zeigte eine Überexpression von PTEN in den NZK-Zelllinien 786-O und A498 ebenfalls den tumorsuppressiven Charakter der Phosphatase auf. Neben PTEN wurde die Relevanz der Splice-Variante PTEN- Δ analysiert. Die Splice-Variante, welche C-terminal um das Exon 9 verkürzt ist und zwei zusätzliche Aminosäuren aus dem Intron H beinhaltet (Sharrard & Maitland, 2000), wies ähnliche tumorsuppressive Eigenschaften in den transgenen NZK-Zellen *in vitro* auf. Sowohl PTEN als auch PTEN- Δ induzierten in den NZK-Zellen ein reduziertes Migrationspotential in Richtung der EZM-Komponenten Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Kollagen I und IV sowie eine reduzierte Adhäsion an diesen EZM-Komponenten. Die Expression relevanter

Integrin-Untereinheiten war deutlich reduziert. Des Weiteren konnte eine leichte Erhöhung der Apoptoserate nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene zeigte sich, dass PTEN und PTEN- Δ die AKT- und die MAPK-Signalkaskade inhibieren (Tabelle 4).

Die dual-spezifische Phosphatase PTEN besteht aus fünf funktionellen Domänen: die PDB-bindende-Domäne, die Phosphatase-Domäne, die C2-Domäne, die C-tail-Domäne und die PDZ-bindende Domäne. Die Phosphatase-Domäne besteht aus einem zentralen fünf-strängigen β -Faltblatt, welches auf der einen Seite von zwei α -Helices und auf der anderen Seite von vier α -Helices flankiert wird. Das katalytische Motiv bildet einen sogenannten P Loop, welcher die Phosphate binden kann. Die C2-Domäne schließt sich C-terminal an die Phosphatase-Domäne an und umfasst knapp 170 Aminosäuren. Sie setzt sich strukturell aus einem β -Sandwich zusammen. Weiter N-terminal befindet sich eine kurze PDB-bindende Domäne und C-terminal die C-tail-Domäne, welche PEST (Pro, Glu, Ser, Thr) Sequenzen aufweist, und die PDZ-bindende Domäne, welche an Protein-Interaktionen beteiligt ist (Song *et al.*, 2012). PTEN- Δ fehlt aufgrund des Abbruchs des offenen Leserahmens im Intron H die C-tail- und die PDZ-bindende Domäne sowie Teile der C2-Domäne. Die C2-Domäne wurde bereits näher untersucht. Laut Georgescu *et al.* nimmt sie vor allem Funktionen bezüglich der Stabilität und enzymatischen Aktivität ein (Georgescu *et al.*, 1999). Im C-terminalen Bereich von PTEN befinden sich viele Binde- und Modifikationsstellen für interagierende Proteine, welche vor allem die Stabilität und Aktivität von PTEN triggern (Song *et al.*, 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PTEN- Δ auf Proteinebene exprimiert wird und somit eine gewisse Stabilität aufweist (Abbildung 14). Des Weiteren zeigte sich, dass PTEN- Δ trotz der fehlenden C-terminalen Domänen ähnliche tumorsuppressive Eigenschaften ausübt. Diese werden vermutlich über die Phosphatase-Domäne und möglicherweise über Reste der C2-Domäne induziert, da für PTEN bereits gezeigt werden konnte, dass hauptsächlich diese Domänen an der Funktion der Phosphatase beteiligt sind, während die anderen Domänen regulatorische Funktionen ausüben. Das katalytische Zentrum der Phosphatase-Domäne ist evolutionär hoch konserviert und häufig bei malignen Erkrankungen mutiert, was eine reduzierte Aktivität von PTEN zur Folge hat (Furnari *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997). Die C2-Domäne von PTEN kann an Phospholipide der Membran binden und die Zellmigration beeinflussen (Raftopoulou *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass

die Stelle, an der die C2-Domäne mutiert ist, entscheidend ist für die resultierende PTEN-Aktivität (Georgescu *et al.*, 2000). Daher könnte es durchaus sein, dass in PTEN- Δ eine Restfunktion der C2-Domäne vorliegt. Die weiter C-terminal befindlichen C-*tail* und PDZ-bindende Domänen weisen vor allem Funktionen in der Membranrekrutierung und Modulierung der PTEN-Aktivität auf. PTEN kann zum einen mit Proteinen, welche eine PDZ-bindende Domäne aufweisen, und zum anderen mit Proteinen, welche ein PtdIns(4,5)P₂-Bindemotiv aufweisen, interagieren. Hierzu gehören die Membranproteine MAGI, PAR-3, MAST, SAST und NEP (Bonifant *et al.*, 2007; Tamguney & Stokoe, 2007; Wu *et al.*, 2000). Des Weiteren wird die Lokalisation an der Plasmamembran durch Phosphorylierung am C-*tail* inhibiert (Bolduc *et al.*, 2013) und durch SUMOylierung getriggert (Huang *et al.*, 2012). Da sowohl die PDZ-bindende als auch die C-*tail* Domäne modulierende Eigenschaften bezüglich der PTEN-Funktion aufweisen, scheint der Verlust in PTEN- Δ nur ein geringes Ausmaß einzunehmen. Dies konnte bereits von Schneider *et al.* und anderen gezeigt werden, wo Mutanten ohne C-terminale Domänen ebenfalls noch eine Funktionalität der Phosphatase aufwiesen (Odriozola *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2011).

Während die NZK-Zelllinie A498 endogen PTEN exprimiert, weisen die 786-O-Zellen eine *Nonsense*-Mutation (c.445C>T) im PTEN-Gen auf. In beiden Zelllinien zeigte eine Überexpression der Splice-Variante PTEN- Δ einen tumorsuppressiven Effekt (Tabelle 4). Daher lässt sich schlussfolgern, dass PTEN- Δ unabhängig von PTEN seine funktionellen Eigenschaften ausüben kann. In beiden Zelllinien induzierte PTEN- Δ eine Reduktion des Migrations- und Adhäsionspotentials, sowie eine veränderte Integrin-Zusammensetzung, eine erhöhte Apoptoserate und eine verringerte Aktivität der AKT- und MAPK-Signalkaskade. Vergleicht man den Einfluss von PTEN- Δ in den beiden Zelllinien im Detail zeigt sich allerdings, dass in den A498-Zellen die Effekte auf die zellulären Prozesse stärker ausfielen. Ebenso waren mehr Integrin-Untereinheiten verändert exprimiert (Tabelle 4). Möglicherweise können PTEN und PTEN- Δ synergistisch wirken, wodurch die stärkeren Auswirkungen in der endogen PTEN-exprimierenden A498-Zelllinie hervorgerufen wurden. Papa *et al.* konnten zeigen, dass PTEN als Homo-Dimer vorliegen kann und diese Dimere aktiver als die Monomere sind. Die Dimere bilden sich vorwiegend, wenn der C-terminale Bereich des Proteins dephosphoryliert ist. Des Weiteren zeigten sie, dass PTEN mit den PTEN-Mutanten C124S und G129E Hetero-Dimere bildet und diese die Funktion von PTEN inhibiert

(Papa *et al.*, 2014). Die Synergie zwischen PTEN und PTEN- Δ könnte somit ebenfalls über eine Dimerisierung erfolgen, wo PTEN/PTEN- Δ -Dimere verstärkt aktiv sind und die fehlenden Domänen von PTEN- Δ , welche an Protein-Interaktionen beteiligt sind, im Hetero-Dimer von PTEN ausgeglichen werden.

Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zeigten sich bei der Analyse des Transkriptoms. Während in den 786-O-Zellen die Gene *RASGRF2*, *SLAMF7*, *WLS* und *STK33* verändert exprimiert wurden, waren in den A498-Zellen die Gene *CRLF1*, *IFI27*, *TNFRSF1B* und *POSTN* verändert exprimiert (Tabelle 4). Diese zellspezifischen Expressions-Unterschiede erzeugten jedoch ähnliche Effekte auf zellulärer Ebene, da sie vermutlich auf dieselben Signalkaskaden einwirken können.

Tabelle 4: Übersicht über die Effekte, die von PTEN- Δ und PTEN in den Zelllinien 786-O und A498 induziert wurden. Dargestellt ist der Einfluss von PTEN- Δ bzw. PTEN auf die untersuchten Prozesse bzw. Expressionen. Die relativen Abweichungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen wurden durch die Verwendung von Pfeilen dargestellt.

	PTEN- Δ		PTEN	
	786-O	A498	786-O	A498
Migration	↓↓	↓↓↓	↓↓	↔
Adhäsion	↓	↓↓	↓	↓↓
Integrin-Expression	$\alpha 1 \downarrow \alpha 5 \downarrow$	$\alpha 1 \downarrow \alpha 2 \downarrow \alpha 3 \downarrow$ $\alpha V \downarrow \alpha 5 \downarrow \alpha 6 \downarrow$ $\beta 1 \downarrow \beta 3 \downarrow$	$\alpha 1 \downarrow \alpha 5 \downarrow$	$\alpha 1 \downarrow \alpha V \downarrow \beta 3 \downarrow$
Proliferation	↔		↔	
Viabilität	↔		↔	
Apoptose	↑	↑↑	↔	↑
Aktivität von Kinasen	p38 ↓ AKT (S473) ↓ AKT (T308) ↓↓↓	p38 ↓↓ JNK ↓↓ AKT (T308) ↓	p38 ↓ AKT (S473) ↓ AKT (T308) ↓↓	p38 ↓ JNK ↓↓
Gen-Expression	<i>RASGRF2</i> ↓↓ <i>SLAMF7</i> ↓↓ <i>STK33</i> ↑ <i>WLS</i> ↑	<i>CRLF1</i> ↓↓↓ <i>IFI27</i> ↑↑ <i>TNFRSF1B</i> ↓↓↓ <i>POSTN</i> ↓↓↓	<i>RASGRF2</i> ↓↓ <i>SLAMF7</i> ↓↓ <i>STK33</i> ↓↓ <i>WLS</i> ↓↓↓	<i>CRLF1</i> ↓↓↓ <i>IFI27</i> ↑↑ <i>TNFRSF1B</i> ↓↓↓ <i>POSTN</i> ↓↓↓

In den NZK-Zellen konnte gezeigt werden, dass PTEN bzw. PTEN- Δ die AKT-Signalkaskade inhibiert. Durch Bindung eines Liganden an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) kommt es zur Rekrutierung der PI3K, welche die Phosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂

zu PtdIns(3,4,5)P₃ katalysiert. PtdIns(3,4,5)P₃ rekrutiert die Kinase AKT an die Zellmembran und triggert dessen Aktivierung über weitere Kinasen. PTEN wirkt dieser Kaskade entgegen, indem es PtdIns(3,4,5)P₃ dephosphoryliert (Chalhoub & Baker, 2009; Engelman *et al.*, 2006). Sowohl PTEN als auch PTEN-Δ induzierten eine reduzierte Aktivität von AKT. Folglich scheint die Splice-Variante PTEN-Δ analog zu PTEN das Molekül PtdIns(3,4,5)P₃ dephosphorylieren zu können. Dies führte zu einer gesteigerten Apoptoserate in den NZK-Zellen (Abbildung 118). Des Weiteren wirkten PTEN bzw. PTEN-Δ auf die MAPK-Signalkaskade ein. Diese können sowohl von Wachstumsfaktoren, welche an RTKs binden, als auch von EZM-Komponenten, welche an Integrine binden, initiiert werden und *downstream* über verschiedene MAP-Kinasen zelluläre Prozesse wie Migration und Adhäsion beeinflussen (Takada *et al.*, 2007; Wagner & Nebreda, 2009). In den transgenen NZK-Zellen konnte sowohl eine veränderte Integrin-Expression als auch eine reduzierte Aktivität der Kinasen p38 und JNK nachgewiesen werden. Sowohl PTEN als auch PTEN-Δ induzierten vermutlich über diese Signalkaskade die verringerten Migrations- und Adhäsionspotentiale in den NZK-Zellen (Abbildung 118).

PTEN-Δ nimmt im NZK offenbar analog zu PTEN eine tumorsuppressive Rolle ein. Eine Überexpression induzierte eine Hemmung der Prozesse der Tumorprogression und beteiligter Signalmediatoren *in vitro*.

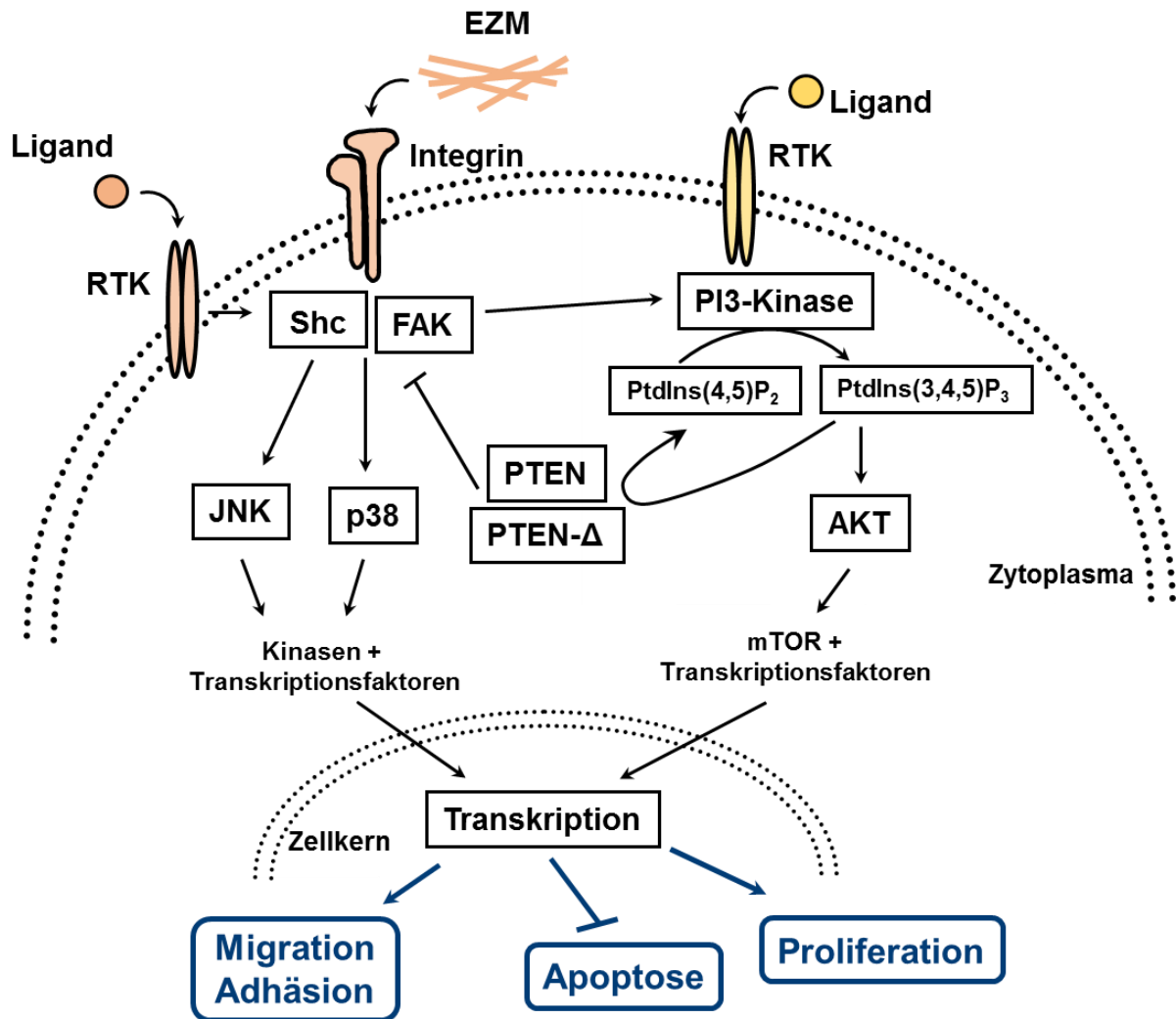


Abbildung 118: Signalweiterleitung von PTEN und PTEN- Δ in der Tumorzelle. Die AKT- und die MAPK-Signalkaskaden werden durch Bindung von Liganden über Integrine oder RTK's aktiviert. *Downstream* nehmen die Kinasen JNK, p38 und AKT über Transkriptionsfaktoren Einfluss auf das Transkriptom und triggern somit die zellulären Prozesse Migration, Adhäsion und Proliferation sowie inhibieren die Apoptose. PTEN und PTEN- Δ wirken diesen Kaskaden entgegen.

4.4 Relevanz in anderen Tumorentitäten

Die Bedeutung der zehn PTEN-Splice-Varianten für verschiedene Tumorentitäten wurde bisher nur unzureichend untersucht. Agrawal *et al.*, welche acht der derzeit bekannten Splice-Varianten identifizierten, analysierten dessen Bedeutung für das sporadische Mammakarzinom in einem cDNA-Panel bestehend aus 12 Patientinnen. Die Tumorstadien wiesen eine reduzierte *PTEN*-Expression auf. Für die Splice-Varianten SV-5c, SV-3b, SV-3c und SV-DeIE6 konnte ebenfalls eine reduzierte Expression im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die SV-5b eine verstärkte Expression im Tumorgewebe. Die Splice-Varianten SV-5a und SV-3a konnten nicht detektiert werden (Agrawal & Eng, 2006). In

dieser Arbeit wurde die Bedeutung von PTEN- Δ für das Mammakarzinom untersucht. In einer N0-Kohorte bestehend aus 42 Patientinnen konnte gezeigt werden, dass die PTEN- Δ -Expression mit steigendem G-Stadium abnimmt (Abbildung 114). Des Weiteren wiesen Patientinnen mit einer höheren PTEN- Δ -Expression ein längeres metastasierungsfreies Überleben auf (Abbildung 115). PTEN- Δ könnte im Mammakarzinom als Biomarker nützlich sein, da eine erhöhte Expression mit den Parametern einer besseren Prognose assoziiert werden konnte. Neben PTEN- Δ wurde in dieser Kohorte auch PTEN analysiert. Die PTEN-Expression korrelierte mit der PTEN- Δ -Expression, nahm ebenfalls mit steigendem G-Stadium ab und erhöhte das metastasierungsfreie Überleben bei erhöhter Expression. PTEN- Δ scheint somit analog zu den bereits untersuchten Splice-Varianten SV-5c, SV-3b, SV-3c und SV-DelE6 tumorsuppressiv im Mammakarzinom zu agieren. Jedoch konnte für diese Splice-Varianten im Gegensatz zu PTEN- Δ kein Einfluss auf die Aktivität der AKT-Kinase nachgewiesen werden (Agrawal & Eng, 2006). Der Abbruch des offenen Leserahmens dieser Splice-Varianten ist weit vor dem von PTEN- Δ , weswegen eine Translation fraglich bleibt, zumal sie bisher in keinem zellulären System gezeigt wurde. Möglicherweise agieren die Splice-Varianten auf mRNA-Ebene. Sie können beispielsweise als lncRNA Einfluss auf die Expression anderer Zielgene nehmen oder miRNAs binden und so dessen Verfügbarkeit für andere mRNAs reduzieren.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Funktion der PTEN-Splice-Variante PTEN- Δ im Nierenzellkarzinom untersucht. Die Bedeutung von Splice-Varianten ist in vielen Fällen noch vollkommen unerforscht. Die physiologische Funktion von Splice-Varianten kann der des Wildtyp-Proteins ähneln, aber auch komplett entgegenwirken. Beispielsweise kodieren die Splice-Varianten der pro-apoptotischen Gene *Bcl-x*, *Caspase-9*, *Ced-4* und *hTid-1* sowohl Splice-Varianten mit pro- als auch mit anti-apoptotischen Funktionen (Syken *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003). Dass auch Splice-Varianten eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielen können, konnte bereits für den Rezeptor CD44 gezeigt werden. CD44 generiert 20 verschiedene Splice-Varianten und diese sind in vielen fortgeschrittenen Tumorentitäten verstärkt exprimiert (Iida & Bourguignon, 1997; Naor *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001). Für die Splice-Variante PTEN- Δ konnte ein ähnlicher tumorsuppressiver Charakter zum

Wildtyp-Protein PTEN aufgezeigt werden. Interessant wäre die Untersuchung der weiteren, bereits identifizierten Splice-Varianten von PTEN. Zunächst sollte ihr Einfluss auf die relevanten Signalkaskaden und zellulären Prozesse analysiert werden. Wichtig wäre allerdings auch die Expression der anderen Splice-Varianten auf Proteinebene nachzuweisen bzw., falls kein Nachweis erfolgt, dessen Funktion auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen. Ein weiterer Schritt wäre die systematische Untersuchung der Expression von PTEN und seinen Splice-Varianten in verschiedenen Tumorentitäten. Somit könnte ein Überblick über die mögliche Funktion der Splice-Varianten in den jeweiligen Tumoren gewonnen sowie eine erste Abschätzung über das Zusammenspiel von PTEN mit seinen Splice-Varianten getroffen werden. In dieser Arbeit wurde die Expression von PTEN- Δ im Mammakarzinom untersucht. Derzeit wird die Splice-Variante im Nierenzellkarzinom untersucht, um die klinische Relevanz der *in vitro* Daten zu bestätigen. Des Weiteren wäre es interessant die gewonnenen Erkenntnisse in den NZK-Zellen weiter zu verfolgen. Es blieb die Frage offen, ob PTEN und PTEN- Δ synergistisch agieren können. Über Protein-Interaktion-Assays könnte nachgewiesen werden ob die Proteine direkt miteinander wechselwirken. Alternativ könnte durch Generierung von stabilen Zellen, welche sowohl PTEN- als auch PTEN- Δ überexprimieren, durch anschließenden Knock-Down eines Proteins indirekte synergistische Effekte nachgewiesen werden. Ferner wäre eine Verifizierung der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse bezüglich PTEN- Δ *in vivo* erforderlich. Es könnte ein Tumormausmodell verwendet werden, indem die Tumorentwicklung von NZK-Zellen ohne PTEN- Δ -Expression mit PTEN- Δ -überexprimierenden Zellen verglichen wird.

5 Zusammenfassung

Das Tumorsuppressor-Protein PTEN spielt in vielen verschiedenen Tumorentitäten, wie auch dem Nierenzellkarzinom, eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und Progression. Während der Translation bildet PTEN mehrere Splice-Varianten aus, unter anderem auch die Variante PTEN- Δ . In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von PTEN- Δ für die Tumorentstehung im Nierenzellkarzinom und seine klinische Relevanz im Mammakarzinom analysiert.

Als Modell für das Nierenzellkarzinom wurde die Zelllinie A498, welche endogen PTEN exprimiert, und die Zelllinie 786-O, defizient für PTEN, stabil mit dem Gen für *PTEN* bzw. *PTEN- Δ* transfiziert. Anschließend wurden *in vitro* konkrete Schritte der Tumorentstehung analysiert. Die Expression von PTEN- Δ in den transgenen Tumorzellen konnte mittels eines V5-Tags im Westernblot nachgewiesen werden. PTEN- Δ sowie PTEN induzierte eine verringerte Migration in Richtung der Chemotaxine Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Kollagen I und Kollagen IV. Ebenfalls konnte eine reduzierte Adhäsion der PTEN- Δ - bzw. PTEN-Klone an den genannten EZM-Komponenten gezeigt werden. Die Apoptoserate der PTEN- Δ -transfizierten Tumorzellen war leicht erhöht. In Westernblot-Analysen wurde eine reduzierte Aktivität der Kinasen AKT, p38 und JNK in den PTEN- Δ - wie auch den PTEN-Klonen gezeigt. Anschließend wurde die Expression der Splice-Variante PTEN- Δ in einer Mammakarzinom-Kohorte von 42 Patientinnen mittels quantitativer Echtzeit-PCR quantifiziert. Die Splice-Variante PTEN- Δ war in Patientinnen mit geringerem G-Stadium tendenziell höher exprimiert. Patientinnen mit einer geringen PTEN- Δ -Expression entwickelten deutlich früher Metastasen.

Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist das Verständnis der molekularen Mechanismen, die an der Tumorentstehung und Progression beteiligt sind. Die Vielfalt des Tumorsuppressor-Proteins PTEN zeigt sich in seinen vielen Splice-Varianten, welche möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf die Tumorentstehung nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass PTEN- Δ , ähnlich wie PTEN, eine eher tumorsuppressive Stellung einnimmt. Dieser Effekt war in *per se* PTEN-exprimierenden Zellen höher als in PTEN-defizienten Zellen. Kenntnisse über die Bedeutung von PTEN- Δ und weiterer Splice-Varianten von PTEN für die Tumorentstehung können möglicherweise neue Therapiemöglichkeiten im Nierenzellkarzinom und anderen Tumorentitäten aufzeigen.

6 Abstract

The tumor suppressor PTEN plays a major role for the tumor progression of several tumor entities as well as renal cell carcinoma. During the translation process PTEN generates a number of splice variants like PTEN- Δ . The importance of PTEN- Δ for the tumor progression of renal cell carcinoma and its clinical relevance for the mamma carcinoma was analyzed in this thesis.

As a model for renal cell carcinoma the cell line A498, which express PTEN endogenous, and the cell line 786-O, deficient for PTEN, was stable transfected with the gene for *PTEN* or *PTEN- Δ* , respectively. Afterwards specific steps of tumor progression were analyzed *in vitro*. The PTEN- Δ expression was verified under use of a V5-tag in a Western blot analysis. PTEN- Δ as well as PTEN induced a reduced migration in direction of the chemotaxins fibronectin, vitronectin, laminin, collagen I and IV. Likewise a decreased adhesion on these ECM-components could be shown for PTEN- Δ or PTEN, respectively. The apoptosis rate of PTEN- Δ -transfected tumor cells was slightly increased. In Western blot analyses a reduced activity of the kinases AKT, p38 and JNK could be shown in PTEN- Δ - as well as in PTEN-transfected cells. Afterwards the PTEN- Δ expression was quantified by Real-Time PCR in a cohort of 42 patients with mamma carcinoma. The splice variant PTEN- Δ showed a higher expression in patients with a lower G stage. Patients with a lower PTEN- Δ expression developed much earlier metastases.

The development of new therapy approaches requires a deeper comprehension of the molecular mechanisms which are contributed to tumorigenesis and tumor progression. The diversity of the tumor suppressor protein PTEN is shown in its several splice variants. These splice variants might also take part on tumor progression processes. In this thesis we could show that PTEN- Δ acts similar to PTEN in a tumor suppressive manner. This effect was in endogenous PTEN expressing cells higher than in PTEN deficient cells. Knowledge about the meaning of PTEN- Δ and other splice variants of PTEN in context of tumor progression might point out new therapy options in renal cell carcinoma and other tumor entities.

7 Referenzen

- Agrawal, S., & Eng, C. (2006). Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet*, *15*(5), 777-787.
- Agrawal, S., Pilarski, R., & Eng, C. (2005). Different splicing defects lead to differential effects downstream of the lipid and protein phosphatase activities of PTEN. *Hum Mol Genet*, *14*(16), 2459-2468.
- Ahmed, S. F., Deb, S., Paul, I., Chatterjee, A., Mandal, T., Chatterjee, U., & Ghosh, M. K. (2012). The chaperone-assisted E3 ligase C terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) targets PTEN for proteasomal degradation. *J Biol Chem*, *287*(19), 15996-16006.
- Al-Khoury, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S., & Mustelin, T. (2005). Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem*, *280*(42), 35195-35202.
- Amodio, N., Scrima, M., Palaia, L., Salman, A. N., Quintiero, A., Franco, R., Botti, G., Pirozzi, P., Rocco, G., De Rosa, N., & Viglietto, G. (2010). Oncogenic role of the E3 ubiquitin ligase NEDD4-1, a PTEN negative regulator, in non-small-cell lung carcinomas. *Am J Pathol*, *177*(5), 2622-2634.
- Aplin, A. E., Hogan, B. P., Tomeu, J., & Juliano, R. L. (2002). Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases. *J Cell Sci*, *115*(Pt 13), 2781-2790.
- Azoitei, N., Hoffmann, C. M., Ellegast, J. M., Ball, C. R., Obermayer, K., Gossele, U., Koch, B., Faber, K., Genze, F., Schrader, M., Kestler, H. A., Dohner, H., Chiosis, G., Glimm, H., Frohling, S., & Scholl, C. (2012). Targeting of KRAS mutant tumors by HSP90 inhibitors involves degradation of STK33. *J Exp Med*, *209*(4), 697-711.
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Paper presented at the Semin Cancer Biol, *19*(5), 329-337.
- Balasa, B., Yun, R., Belmar, N. A., Fox, M., Chao, D. T., Robbins, M. D., Starling, G. C., & Rice, A. G. (2015). Elotuzumab enhances natural killer cell activation and myeloma cell killing through interleukin-2 and TNF-alpha pathways. *Cancer Immunol Immunother*, *64*(1), 61-73.
- Bao, S., Ouyang, G., Bai, X., Huang, Z., Ma, C., Liu, M., Shao, R., Anderson, R. M., Rich, J. N., & Wang, X.-F. (2004). Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*, *5*(4), 329-339.
- Barash, Y., Calarco, J. A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B. J., & Frey, B. J. (2010). Deciphering the splicing code. *Nature*, *465*(7294), 53-59.
- Bartel, D. P. MicroRNAs. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Bartel, D. P., & Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*, *5*(5), 396-400.
- Bassi, C., Ho, J., Srikumar, T., Dowling, R. J., Gorrini, C., Miller, S. J., Mak, T. W., Neel, B. G., Raught, B., & Stambolic, V. (2013). Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. *Science*, *341*(6144), 395-399.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, *432*(7015), 332-337.
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, *72*, 291-336.

- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6(8), 611-622.
- Bolduc, D., Rahdar, M., Tu-Sekine, B., Sivakumaren, S. C., Raben, D., Amzel, L. M., Devreotes, P., Gabelli, S. B., & Cole, P. (2013). Phosphorylation-mediated PTEN conformational closure and deactivation revealed with protein semisynthesis. *Elife*, 2, e00691.
- Bonifant, C. L., Kim, J. S., & Waldman, T. (2007). NHERFs, NEP, MAGUKs, and more: interactions that regulate PTEN. *J Cell Biochem*, 102(4), 878-885.
- Bononi, A., Bonora, M., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Giorgi, C., Pandolfi, P. P., & Pinton, P. (2013). Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca(2+) signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. *Cell Death Differ*, 20(12), 1631-1643.
- Bononi, A., & Pinton, P. (2015). Study of PTEN subcellular localization. *Methods*, 77-78, 92-103.
- Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5), 865-877.
- Brenner, W., Farber, G., Herget, T., Lehr, H. A., Hengstler, J. G., & Thuroff, J. W. (2002). Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis. *Int J Cancer*, 99(1), 53-57.
- Burkhart, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 8(9), 671-682.
- Caceres, J. F., & Kornblihtt, A. R. (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet*, 18(4), 186-193.
- Cao, J., Wan, L., Hacker, E., Dai, X., Lenna, S., Jimenez-Cervantes, C., Wang, Y., Leslie, N. R., Xu, G. X., Widlund, H. R., Ryu, B., Alani, R. M., Dutton-Regester, K., Goding, C. R., Hayward, N. K., Wei, W., & Cui, R. (2013). MC1R is a potent regulator of PTEN after UV exposure in melanocytes. *Mol Cell*, 51(4), 409-422.
- Chalhoub, N., & Baker, S. J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 127-150.
- Chappell, W. H., Green, T. D., Spengeman, J. D., McCubrey, J. A., Akula, S. M., & Bertrand, F. E. (2005). Increased protein expression of the PTEN tumor suppressor in the presence of constitutively active Notch-1. *Cell Cycle*, 4(10), 1389-1395.
- Chen, C. L., Tseng, Y. W., Wu, J. C., Chen, G. Y., Lin, K. C., Hwang, S. M., & Hu, Y. C. (2015). Suppression of hepatocellular carcinoma by baculovirus-mediated expression of long non-coding RNA PTENP1 and MicroRNA regulation. *Biomaterials*, 44, 71-81.
- Chen, H., Suzuki, M., Nakamura, Y., Ohira, M., Ando, S., Iida, T., Nakajima, T., Nakagawara, A., & Kimura, H. (2006). Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 15(5), 1281-1285.
- Chen, J., Baskerville, C., Han, Q., Pan, Z. K., & Huang, S. (2001). Alpha(v) integrin, p38 mitogen-activated protein kinase, and urokinase plasminogen activator are functionally linked in invasive breast cancer cells. *J Biol Chem*, 276(51), 47901-47905.
- Cheng, D. L., Xiang, Y. Y., Ji, L. J., & Lu, X. J. (2015). Competing endogenous RNA interplay in cancer: mechanism, methodology, and perspectives. *Tumour Biol*, 36(2), 479-488.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res*, 6(10), 1521-1533.

- Cheriyath, V., Leaman, D. W., & Borden, E. C. (2011). Emerging roles of FAM14 family members (G1P3/ISG 6-16 and ISG12/IFI27) in innate immunity and cancer. *J Interferon Cytokine Res*, 31(1), 173-181.
- Cho, S. H., Lee, C. H., Ahn, Y., Kim, H., Kim, H., Ahn, C. Y., Yang, K. S., & Lee, S. R. (2004). Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H(2)O(2) mediated cell signaling. *FEBS Lett*, 560(1-3), 7-13.
- Chuanyu, S., Yuqing, Z., Chong, X., Guowei, X., & Xiaojun, Z. (2017). Periostin promotes migration and invasion of renal cell carcinoma through the integrin/focal adhesion kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway. *Tumor Biology*, 39(4), 1-8.
- Cohen, P., & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(10), 769-776.
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, 2004(250), RE13.
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 358(5), 502-511.
- Dahia, P. L., FitzGerald, M. G., Zhang, X., Marsh, D. J., Zheng, Z., Pietsch, T., von Deimling, A., Haluska, F. G., Haber, D. A., & Eng, C. (1998). A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. *Oncogene*, 16(18), 2403-2406.
- Das, S., Dixon, J. E., & Cho, W. (2003). Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7491-7496.
- Demuth, T., Reavie, L. B., Rennert, J. L., Nakada, M., Nakada, S., Hoelzinger, D. B., Beaudry, C. E., Henrichs, A. N., Anderson, E. M., & Berens, M. E. (2007). MAP-ing glioma invasion: mitogen-activated protein kinase kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1212-1222.
- Dey, N., Crosswell, H. E., De, P., Parsons, R., Peng, Q., Su, J. D., & Durden, D. L. (2008). The protein phosphatase activity of PTEN regulates SRC family kinases and controls glioma migration. *Cancer Res*, 68(6), 1862-1871.
- Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet*, 19(4), 348-355.
- DiMeo, T. A., Anderson, K., Phadke, P., Fan, C., Perou, C. M., Naber, S., & Kuperwasser, C. (2009). A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res*, 69(13), 5364-5373.
- Ding, L., Chen, S., Liu, P., Pan, Y., Zhong, J., Regan, K. M., Wang, L., Yu, C., Rizzardi, A., Cheng, L., Zhang, J., Schmechel, S. C., Cheville, J. C., Van Deursen, J., Tindall, D. J., & Huang, H. (2014). CBP loss cooperates with PTEN haploinsufficiency to drive prostate cancer: implications for epigenetic therapy. *Cancer Res*, 74(7), 2050-2061.
- Edwin, F., Singh, R., Endersby, R., Baker, S. J., & Patel, T. B. (2006). The tumor suppressor PTEN is necessary for human Sprouty 2-mediated inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem*, 281(8), 4816-4822.
- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 7(8), 606-619.
- Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H. H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A. D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R. D., Liu, X., & Wu, H. (2003). PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through

- phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, 3(2), 117-130.
- Furnari, F. B., Lin, H., Huang, H. S., & Cavenee, W. K. (1997). Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23), 12479-12484.
- Garcia, J. M., Silva, J., Pena, C., Garcia, V., Rodriguez, R., Cruz, M. A., Cantos, B., Provencio, M., Espana, P., & Bonilla, F. (2004). Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 41(2), 117-124.
- Georgescu, M.-M., Kirsch, K. H., Akagi, T., Shishido, T., & Hanafusa, H. (1999). The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10182-10187.
- Georgescu, M. M., Kirsch, K. H., Kaloudis, P., Yang, H., Pavletich, N. P., & Hanafusa, H. (2000). Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res*, 60(24), 7033-7038.
- Gericke, A., Munson, M., & Ross, A. H. (2006). Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene*, 374, 1-9.
- Gil, A., Andres-Pons, A., Fernandez, E., Valiente, M., Torres, J., Cervera, J., & Pulido, R. (2006). Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Mol Biol Cell*, 17(9), 4002-4013.
- Gillan, L., Matei, D., Fishman, D. A., Gerbin, C. S., Karlan, B. Y., & Chang, D. D. (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res*, 62(18), 5358-5364.
- Gonzalez-Santamaria, J., Campagna, M., Ortega-Molina, A., Marcos-Villar, L., de la Cruz-Herrera, C. F., Gonzalez, D., Gallego, P., Lopitz-Otsoa, F., Esteban, M., Rodriguez, M. S., Serrano, M., & Rivas, C. (2012). Regulation of the tumor suppressor PTEN by SUMO. *Cell Death Dis*, 3, e393.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Gu, T., Zhang, Z., Wang, J., Guo, J., Shen, W. H., & Yin, Y. (2011). CREB is a novel nuclear target of PTEN phosphatase. *Cancer Res*, 71(8), 2821-2825.
- Guil, S., & Esteller, M. (2015). RNA-RNA interactions in gene regulation: the coding and noncoding players. *Trends Biochem Sci*, 40(5), 248-256.
- Guo, X., Deng, L., Deng, K., Wang, H., Shan, T., Zhou, H., Liang, Z., Xia, J., & Li, C. (2016). Pseudogene PTENP1 Suppresses Gastric Cancer Progression by Modulating PTEN. *Anticancer Agents Med Chem*, 16(4), 456-464.
- Hagihara, A., Miyamoto, K., Furuta, J., Hiraoka, N., Wakazono, K., Seki, S., Fukushima, S., Tsao, M. S., Sugimura, T., & Ushijima, T. (2004). Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene*, 23(53), 8705-8710.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hettinger, K., Vikhanskaya, F., Poh, M. K., Lee, M. K., de Belle, I., Zhang, J. T., Reddy, S. A., & Sabapathy, K. (2007). c-Jun promotes cellular survival by suppression of PTEN. *Cell Death Differ*, 14(2), 218-229.
- Hjelmeland, A. B., Hjelmeland, M. D., Shi, Q., Hart, J. L., Bigner, D. D., Wang, X. F., Kontos, C. D., & Rich, J. N. (2005). Loss of phosphatase and tensin homologue

- increases transforming growth factor beta-mediated invasion with enhanced SMAD3 transcriptional activity. *Cancer Res*, 65(24), 11276-11281.
- Hopkins, B. D., Fine, B., Steinbach, N., Dendy, M., Rapp, Z., Shaw, J., Pappas, K., Yu, J. S., Hodakoski, C., Mense, S., Klein, J., Pegno, S., Sulis, M. L., Goldstein, H., Amendolara, B., Lei, L., Maurer, M., Bruce, J., Canoll, P., Hibshoosh, H., & Parsons, R. (2013). A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science*, 341(6144), 399-402.
- Hopkins, B. D., Hodakoski, C., Barrows, D., Mense, S. M., & Parsons, R. E. (2014). PTEN function: the long and the short of it. *Trends Biochem Sci*, 39(4), 183-190.
- Hsieh, Y. H., Wu, T. T., Huang, C. Y., Hsieh, Y. S., Hwang, J. M., & Liu, J. Y. (2007). p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase Calpha-regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 67(9), 4320-4327.
- Huang, J., Yan, J., Zhang, J., Zhu, S., Wang, Y., Shi, T., Zhu, C., Chen, C., Liu, X., Cheng, J., Mustelin, T., Feng, G. S., Chen, G., & Yu, J. (2012). SUMO1 modification of PTEN regulates tumorigenesis by controlling its association with the plasma membrane. *Nat Commun*, 3, 911.
- Iida, N., & Bourguignon, L. Y. (1997). Coexpression of CD44 variant (v10/ex14) and CD44S in human mammary epithelial cells promotes tumorigenesis. *J Cell Physiol*, 171(2), 152-160.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C. Y., He, X., MacDougald, O. A., You, M., Williams, B. O., & Guan, K. L. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126(5), 955-968.
- Iurlaro, R., Leon-Annicchiarico, C. L., & Munoz-Pinedo, C. (2014). Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. *Methods Enzymol*, 542, 59-80.
- Ivaska, J., Reunanen, H., Westermarck, J., Koivisto, L., Kähäri, V.-M., & Heino, J. (1999). Integrin $\alpha 2\beta 1$ mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the $\alpha 2$ cytoplasmic tail. *The Journal of cell biology*, 147(2), 401-416.
- Jacinto, F. V., Ballestar, E., Ropero, S., & Esteller, M. (2007). Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. *Cancer Res*, 67(24), 11481-11486.
- Jin, Y. J., Park, I., Hong, I. K., Byun, H. J., Choi, J., Kim, Y. M., & Lee, H. (2011). Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin $\alpha(5)\beta(1)/\alpha(v)\beta(3)$ -dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Signal*, 23(1), 125-134.
- Jindra, P. T., Bagley, J., Godwin, J. G., & Iacomini, J. (2010). Costimulation-dependent expression of microRNA-214 increases the ability of T cells to proliferate by targeting Pten. *J Immunol*, 185(2), 990-997.
- Johnsson, P., Ackley, A., Vidarsdottir, L., Lui, W. O., Corcoran, M., Grander, D., & Morris, K. V. (2013). A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 20(4), 440-446.
- Jones, R. G., & Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*, 23(5), 537-548.

- Junttila, M. R., Ala-Aho, R., Jokilehto, T., Peltonen, J., Kallajoki, M., Grenman, R., Jaakkola, P., Westermarck, J., & Kahari, V. M. (2007). p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*, *26*(36), 5267-5279.
- Kang, Y. H., Lee, H. S., & Kim, W. H. (2002). Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest*, *82*(3), 285-291.
- Karlan, B. Y., Dering, J., Walsh, C., Orsulic, S., Lester, J., Anderson, L. A., Ginther, C. L., Fejzo, M., & Slamon, D. (2014). POSTN/TGFBI-associated stromal signature predicts poor prognosis in serous epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, *132*(2), 334-342.
- Karreth, F. A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S. M., Rust, A. G., DeNicola, G., Webster, K. A., Weiss, D., Perez-Mancera, P. A., Krauthammer, M., Halaban, R., Provero, P., Adams, D. J., Tuveson, D. A., & Pandolfi, P. P. (2011). In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*, *147*(2), 382-395.
- Klymkowsky, M. W., & Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*, *174*(5), 1588-1593.
- Kojima, T., Shimazui, T., Hinotsu, S., Joraku, A., Oikawa, T., Kawai, K., Horie, R., Suzuki, H., Nagashima, R., Yoshikawa, K., Michiue, T., Asashima, M., Akaza, H., & Uchida, K. (2009). Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene*, *28*(2), 297-305.
- Lee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P., & Pavletich, N. P. (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, *99*(3), 323-334.
- Lee, J. T., Shan, J., Zhong, J., Li, M., Zhou, B., Zhou, A., Parsons, R., & Gu, W. (2013). RFP-mediated ubiquitination of PTEN modulates its effect on AKT activation. *Cell Res*, *23*(4), 552-564.
- Lee, S. R., Yang, K. S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., & Rhee, S. G. (2002). Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem*, *277*(23), 20336-20342.
- Leslie, N. R., Batty, I. H., Maccario, H., Davidson, L., & Downes, C. P. (2008). Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene*, *27*(41), 5464-5476.
- Leslie, N. R., Bennett, D., Lindsay, Y. E., Stewart, H., Gray, A., & Downes, C. P. (2003). Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J*, *22*(20), 5501-5510.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., & Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, *275*(5308), 1943-1947.
- Li, S., Xie, Y., Zhang, W., Gao, J., Wang, M., Zheng, G., Yin, X., Xia, H., & Tao, X. (2015). Interferon alpha-inducible protein 27 promotes epithelial-mesenchymal transition and induces ovarian tumorigenicity and stemness. *J Surg Res*, *193*(1), 255-264.
- Li, Z., Dong, X., Wang, Z., Liu, W., Deng, N., Ding, Y., Tang, L., Hla, T., Zeng, R., Li, L., & Wu, D. (2005). Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol*, *7*(4), 399-404.

- Liang, H., He, S., Yang, J., Jia, X., Wang, P., Chen, X., Zhang, Z., Zou, X., McNutt, M. A., Shen, W. H., & Yin, Y. (2014). PTEN α , a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism. *Cell Metab*, 19(5), 836-848.
- Lin, H. K., Hu, Y. C., Lee, D. K., & Chang, C. (2004). Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol*, 18(10), 2409-2423.
- Lin, M. C., Liu, Y. C., Tam, M. F., Lu, Y. J., Hsieh, Y. T., & Lin, L. Y. (2012). PTEN interacts with metal-responsive transcription factor 1 and stimulates its transcriptional activity. *Biochem J*, 441(1), 367-377.
- Liu, F., Wagner, S., Campbell, R. B., Nickerson, J. A., Schiffer, C. A., & Ross, A. H. (2005). PTEN enters the nucleus by diffusion. *J Cell Biochem*, 96(2), 221-234.
- Lonial, S. (2016). Monoclonal Antibodies for the Treatment of Myeloma: Targeting SLAMF7 and CD38. *Cancer J*, 22(1), 3-6.
- Lu, D., Li, Y., Liu, Q. R., Wu, Q., Zhang, H., Xie, P., & Wang, Q. (2015). Wls promotes the proliferation of breast cancer cells via Wnt signaling. *Med Oncol*, 32(5), 140.
- Maccario, H., Perera, N. M., Davidson, L., Downes, C. P., & Leslie, N. R. (2007). PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr366. *Biochem J*, 405(3), 439-444.
- Maddika, S., Kavela, S., Rani, N., Palicharla, V. R., Pokorny, J. L., Sarkaria, J. N., & Chen, J. (2011). WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN. *Nat Cell Biol*, 13(6), 728-733.
- Makovitzki-Avraham, E., Daniel-Carmi, V., Alteber, Z., Farago, M., Tzehoval, E., & Eisenbach, L. (2013). The human ISG12a gene is a novel caspase dependent and p53 independent pro-apoptotic gene, that is overexpressed in breast cancer. *Cell Biology International Reports*, 20(2), 37-46.
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274.
- Matlin, A. J., Clark, F., & Smith, C. W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5), 386-398.
- Matsuo, Y., Amano, S., Furuya, M., Namiki, K., Sakurai, K., Nishiyama, M., Sudo, T., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Kimura, S., & Kasuya, Y. (2006). Involvement of p38 α mitogen-activated protein kinase in lung metastasis of tumor cells. *J Biol Chem*, 281(48), 36767-36775.
- Mavrakis, K. J., Wolfe, A. L., Oricchio, E., Palomero, T., de Keersmaecker, K., McJunkin, K., Zuber, J., James, T., Khan, A. A., Leslie, C. S., Parker, J. S., Paddison, P. J., Tam, W., Ferrando, A., & Wendel, H. G. (2010). Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol*, 12(4), 372-379.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S. T., & Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2), 647-658.
- Mirmohammadsadegh, A., Marini, A., Nambiar, S., Hassan, M., Tannapfel, A., Ruzicka, T., & Hengge, U. R. (2006). Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res*, 66(13), 6546-6552.
- Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M., & Alessi, D. R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol*, 15(2), 161-170.
- Murray, B., Albiges, L., Van Allen, E. M., Cherniack, A., Fay, A. P., Meyerson, M., & Choueiri, T. K. (2015). Precision medicine approach in kidney cancer: A pan renal cell carcinoma (RCC) study across three cancer genome atlas (TCGA)

- datasets for clinically relevant target identification. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 4564-4564.
- Myers, M. P., Stolarov, J. P., Eng, C., Li, J., Wang, S. I., Wigler, M. H., Parsons, R., & Tonks, N. K. (1997). P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(17), 9052-9057.
- Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L., & Faitelson, Y. (2002). CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 39(6), 527-579.
- Naude, P. J., den Boer, J. A., Luiten, P. G., & Eisel, U. L. (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J*, 278(6), 888-898.
- Odriozola, L., Singh, G., Hoang, T., & Chan, A. M. (2007). Regulation of PTEN activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem*, 282(32), 23306-23315.
- Odunsi, K., & Old, L. J. (2007). Tumor infiltrating lymphocytes: indicators of tumor-related immune responses. *Cancer Immun*, 7, 3.
- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R. M., DePinho, R. A., Cavenee, W. K., & Furnari, F. B. (2006). PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem*, 281(36), 26562-26568.
- Palomero, T., Sulis, M. L., Cortina, M., Real, P. J., Barnes, K., Ciofani, M., Caparros, E., Buteau, J., Brown, K., Perkins, S. L., Bhagat, G., Agarwal, A. M., Basso, G., Castillo, M., Nagase, S., Cordon-Cardo, C., Parsons, R., Zuniga-Pflucker, J. C., Dominguez, M., & Ferrando, A. A. (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*, 13(10), 1203-1210.
- Papa, A., Wan, L., Bonora, M., Salmena, L., Song, M. S., Hobbs, R. M., Lunardi, A., Webster, K., Ng, C., Newton, R. H., Knoblauch, N., Guarnerio, J., Ito, K., Turka, L. A., Beck, A. H., Pinton, P., Bronson, R. T., Wei, W., & Pandolfi, P. P. (2014). Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell*, 157(3), 595-610.
- Patel, L., Pass, I., Coxon, P., Downes, C. P., Smith, S. A., & Macphee, C. H. (2001). Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN. *Curr Biol*, 11(10), 764-768.
- Pazina, T., James, A. M., Cohen, A. D., & Campbell, K. S. (2014). Enhancing the Cytotoxicity of NK Cells Toward Multiple Myeloma Using an Antibody Specific to SLAMF7. *Blood*, 124(21), 2092-2092.
- Penna, E., Orso, F., & Taverna, D. (2015). miR-214 as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple functions. *J Invest Dermatol*, 135(4), 960-969.
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., & Smith, J. W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275(29), 21785-21788.
- Poliseno, L., Salmena, L., Riccardi, L., Fornari, A., Song, M. S., Hobbs, R. M., Sportoletti, P., Varmeh, S., Egia, A., Fedele, G., Rameh, L., Loda, M., & Pandolfi, P. P. (2010). Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal*, 3(117), ra29.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., & Pandolfi, P. P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301), 1033-1038.
- Putz, U., Mah, S., Goh, C. P., Low, L. H., Howitt, J., & Tan, S. S. (2015). PTEN secretion in exosomes. *Methods*, 77-78, 157-163.

- Qin, X., Yan, M., Zhang, J., Wang, X., Shen, Z., Lv, Z., Li, Z., Wei, W., & Chen, W. (2016). TGFbeta3-mediated induction of Periostin facilitates head and neck cancer growth and is associated with metastasis. *Sci Rep*, *6*, 20587.
- Raftopoulou, M., Etienne-Manneville, S., Self, A., Nicholls, S., & Hall, A. (2004). Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science*, *303*(5661), 1179-1181.
- Rahdar, M., Inoue, T., Meyer, T., Zhang, J., Vazquez, F., & Devreotes, P. N. (2009). A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(2), 480-485.
- Rasmussen, U. B., Wolf, C., Mattei, M. G., Chenard, M. P., Bellocq, J. P., Chambon, P., Rio, M. C., & Basset, P. (1993). Identification of a new interferon-alpha-inducible gene (p27) on human chromosome 14q32 and its expression in breast carcinoma. *Cancer Res*, *53*(17), 4096-4101.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*, *146*(3), 353-358.
- Sanchez, T., Thangada, S., Wu, M. T., Kontos, C. D., Wu, D., Wu, H., & Hla, T. (2005). PTEN as an effector in the signaling of antimigratory G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(12), 4312-4317.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, *307*(5712), 1098-1101.
- Schneider, E., Keppler, R., Prawitt, D., Steinwender, C., Roos, F. C., Thuroff, J. W., Lausch, E., & Brenner, W. (2011). Migration of renal tumor cells depends on dephosphorylation of Shc by PTEN. *Int J Oncol*, *38*(3), 823-831.
- Scholl, C., Frohling, S., Dunn, I. F., Schinzel, A. C., Barbie, D. A., Kim, S. Y., Silver, S. J., Tamayo, P., Wadlow, R. C., Ramaswamy, S., Dohner, K., Bullinger, L., Sandy, P., Boehm, J. S., Root, D. E., Jacks, T., Hahn, W. C., & Gilliland, D. G. (2009). Synthetic lethal interaction between oncogenic KRAS dependency and STK33 suppression in human cancer cells. *Cell*, *137*(5), 821-834.
- Sharrard, R. M., & Maitland, N. J. (2000). Alternative splicing of the human PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Biochim Biophys Acta*, *1494*(3), 282-285.
- Shen, W. H., Balajee, A. S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P. P., & Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*, *128*(1), 157-170.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, *116*(2), 235-246.
- Shi, C., & Simon, D. I. (2006). Integrin signals, transcription factors, and monocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med*, *16*(5), 146-152.
- Shi, W., Gerster, K., Alajez, N. M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A. B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., McCready, D., Fyles, A., & Liu, F. F. (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res*, *71*(8), 2926-2937.
- Shin Lee, J., Seok Kim, H., Bok Kim, Y., Cheol Lee, M., & Soo Park, C. (2003). Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol*, *84*(3), 166-172.
- Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., & Schlaepfer, D. D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, *2*(5), 249-256.

- Sims, N. A. (2015). Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) and neuropoietin (NP) signalling and their roles in development, adulthood, cancer and degenerative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 517-522.
- Snider, J. L., Allison, C., Bellaire, B. H., Ferrero, R. L., & Cardelli, J. A. (2008). The beta1 integrin activates JNK independent of CagA, and JNK activation is required for Helicobacter pylori CagA+-induced motility of gastric cancer cells. *J Biol Chem*, 283(20), 13952-13963.
- Song, L. B., Li, J., Liao, W. T., Feng, Y., Yu, C. P., Hu, L. J., Kong, Q. L., Xu, L. H., Zhang, X., Liu, W. L., Li, M. Z., Zhang, L., Kang, T. B., Fu, L. W., Huang, W. L., Xia, Y. F., Tsao, S. W., Li, M., Band, V., Band, H., Shi, Q. H., Zeng, Y. X., & Zeng, M. S. (2009). The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. *J Clin Invest*, 119(12), 3626-3636.
- Song, M. S., Carracedo, A., Salmena, L., Song, S. J., Egia, A., Malumbres, M., & Pandolfi, P. P. (2011). Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell*, 144(2), 187-199.
- Song, M. S., Salmena, L., & Pandolfi, P. P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(5), 283-296.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., & Mak, T. W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 8(2), 317-325.
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., & Tavtigian, S. V. (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 15(4), 356-362.
- Storchova, Z., & Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(1), 45-54.
- Syken, J., De-Medina, T., & Münger, K. (1999). TID1, a human homolog of the Drosophila tumor suppressor I(2)tid, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8499-8504.
- Takada, Y., Ye, X., & Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol*, 8(5), 215.
- Tamguney, T., & Stokoe, D. (2007). New insights into PTEN. *J Cell Sci*, 120(Pt 23), 4071-4079.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R., & Yamada, K. M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 280(5369), 1614-1617.
- Tanimura, Y., Kokuryo, T., Tsunoda, N., Yamazaki, Y., Oda, K., Nimura, Y., Naing Mon, N., Huang, P., Nakanuma, Y., Chen, M. F., Jan, Y. Y., Yeh, T. S., Chiu, C. T., Hsieh, L. L., & Hamaguchi, M. (2005). Tumor necrosis factor alpha promotes invasiveness of cholangiocarcinoma cells via its receptor, TNFR2. *Cancer Lett*, 219(2), 205-213.
- Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S. M., Ala, U., Karreth, F., Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F., Lieberman, J., Rigoutsos, I., & Pandolfi, P. P. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*, 147(2), 344-357.
- Todd, R., & Wong, D. T. (1999). Oncogenes. *Anticancer Res*, 19(6A), 4729-4746.
- Tolkacheva, T., Boddapati, M., Sanfiz, A., Tsuchida, K., Kimmelman, A. C., & Chan, A. M. (2001). Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative

- phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res*, 61(13), 4985-4989.
- Torres, J., & Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem*, 276(2), 993-998.
- Tremblay, P. L., Auger, F. A., & Huot, J. (2006). Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene*, 25(50), 6563-6573.
- Trotman, L. C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N. P., Carver, B. S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Chi, S. G., Kim, H. J., Misteli, T., Jiang, X., & Pandolfi, P. P. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*, 128(1), 141-156.
- van den Berg, A., Mols, J., & Han, J. (2008). RISC-target interaction: cleavage and translational suppression. *Biochim Biophys Acta*, 1779(11), 668-677.
- van Diepen, M. T., Parsons, M., Downes, C. P., Leslie, N. R., Hindges, R., & Eickholt, B. J. (2009). MyosinV controls PTEN function and neuronal cell size. *Nat Cell Biol*, 11(10), 1191-1196.
- Van Slambrouck, S., Grijelmo, C., De Wever, O., Bruyneel, E., Emami, S., Gespach, C., & Steelant, W. F. (2007). Activation of the FAK-src molecular scaffolds and p130Cas-JNK signaling cascades by alpha1-integrins during colon cancer cell invasion. *Int J Oncol*, 31(6), 1501-1508.
- Van Themsche, C., Leblanc, V., Parent, S., & Asselin, E. (2009). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J Biol Chem*, 284(31), 20462-20466.
- Vasudevan, K. M., Gurumurthy, S., & Rangnekar, V. M. (2004). Suppression of PTEN expression by NF-kappa B prevents apoptosis. *Mol Cell Biol*, 24(3), 1007-1021.
- Vazquez, F., Matsuoka, S., Sellers, W. R., Yanagida, T., Ueda, M., & Devreotes, P. N. (2006). Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(10), 3633-3638.
- Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N., & Sellers, W. R. (2000). Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol*, 20(14), 5010-5018.
- Vicent, S., Sayles, L. C., Vaka, D., Khatri, P., Gevaert, O., Chen, R., Zheng, Y., Gillespie, A. K., Clarke, N., Xu, Y., Shrager, J., Hoang, C. D., Plevritis, S., Butte, A. J., & Sweet-Cordero, E. A. (2012). Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res*, 72(22), 5744-5756.
- Virolle, T., Adamson, E. D., Baron, V., Birle, D., Mercola, D., Mustelin, T., & de Belle, I. (2001). The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol*, 3(12), 1124-1128.
- Vivanco, I., Palaskas, N., Tran, C., Finn, S. P., Getz, G., Kennedy, N. J., Jiao, J., Rose, J., Xie, W., Loda, M., Golub, T., Mellinghoff, I. K., Davis, R. J., Wu, H., & Sawyers, C. L. (2007). Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*, 11(6), 555-569.
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(7), 489-501.
- Wagner, E. F., & Nebreda, A. R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*, 9(8), 537-549.
- Wang, C., Bian, Z., Wei, D., & Zhang, J. G. (2011). miR-29b regulates migration of human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 352(1-2), 197-207.

- Wang, P., Cheng, H., Wu, J., Yan, A., & Zhang, L. (2015). STK33 plays an important positive role in the development of human large cell lung cancers with variable metastatic potential. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *47*(3), 214-223.
- Wang, X., Trotman, L. C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., Gao, Z., Wang, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P. P., & Jiang, X. (2007). NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*, *128*(1), 129-139.
- Wang, Z., & Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, *14*(5), 802-813.
- Whelan, J. T., Forbes, S. L., & Bertrand, F. E. (2007). CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle*, *6*(1), 80-84.
- Wrangle, J., Wang, W., Koch, A., Easwaran, H., Mohammad, H. P., Vendetti, F., Vancrackinge, W., Demeyer, T., Du, Z., Parsana, P., Rodgers, K., Yen, R. W., Zahnow, C. A., Taube, J. M., Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Easton, K., Carvajal, R. D., Jones, P. A., Laird, P. W., Weisenberger, D. J., Tsai, S., Juergens, R. A., Topalian, S. L., Rudin, C. M., Brock, M. V., Pardoll, D., & Baylin, S. B. (2013). Alterations of immune response of Non-Small Cell Lung Cancer with Azacytidine. *Oncotarget*, *4*(11), 2067-2079.
- Wu, J. Y., Tang, H., & Havlioglu, N. (2003). Alternative Pre-mRNA Splicing and Regulation of Programmed Cell Death. In P. Jeanteur (Ed.), *Regulation of Alternative Splicing* (pp. 153-185). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wu, Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q., & Lasky, L. A. (2000). Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem*, *275*(28), 21477-21485.
- Wu, Y., Zhou, H., Wu, K., Lee, S., Li, R., & Liu, X. (2014). PTEN phosphorylation and nuclear export mediate free fatty acid-induced oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, *20*(9), 1382-1395.
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, *124*(3), 471-484.
- Xie, Q., Yan, Y., Huang, Z., Zhong, X., & Huang, L. (2014). MicroRNA-221 targeting PI3-K/Akt signaling axis induces cell proliferation and BCNU resistance in human glioblastoma. *Neuropathology*, *34*(5), 455-464.
- Xin, Y., Grace, A., Gallagher, M. M., Curran, B. T., Leader, M. B., & Kay, E. W. (2001). CD44V6 in gastric carcinoma: a marker of tumor progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *9*(2), 138-142.
- Xu, D., Yao, Y., Lu, L., Costa, M., & Dai, W. (2010). Plk3 functions as an essential component of the hypoxia regulatory pathway by direct phosphorylation of HIF-1alpha. *J Biol Chem*, *285*(50), 38944-38950.
- Xu, H., Jiang, W., Zhu, F., Zhu, C., Wei, J., & Wang, J. (2016). Expression of Wntless in colorectal carcinomas is associated with invasion, metastasis, and poor survival. *APMIS*, *124*(6), 522-528.
- Yan, F., Du, R., Wei, F., Zhao, H., Yu, J., Wang, C., Zhan, Z., Ding, T., Ren, X., Chen, X., & Li, H. (2015). Expression of TNFR2 by regulatory T cells in peripheral blood is correlated with clinical pathology of lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, *64*(11), 1475-1485.
- Yang, T., Song, B., Zhang, J., Yang, G. S., Zhang, H., Yu, W. F., Wu, M. C., Lu, J. H., & Shen, F. (2016). STK33 promotes hepatocellular carcinoma through binding to c-Myc. *Gut*, *65*(1), 124-133.

- Yim, E. K., Peng, G., Dai, H., Hu, R., Li, K., Lu, Y., Mills, G. B., Meric-Bernstam, F., Hennessy, B. T., Craven, R. J., & Lin, S. Y. (2009). Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell*, 15(4), 304-314.
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21(3), 497-503.
- Yu, G., Yao, W., Gumireddy, K., Li, A., Wang, J., Xiao, W., Chen, K., Xiao, H., Li, H., Tang, K., Ye, Z., Huang, Q., & Xu, H. (2014). Pseudogene PTENP1 Functions as a Competing Endogenous RNA to Suppress Clear-Cell Renal Cell Carcinoma Progression. *Mol Cancer Ther*, 13(12), 3086-3097.
- Zhang, S., Huang, W. C., Li, P., Guo, H., Poh, S. B., Brady, S. W., Xiong, Y., Tseng, L. M., Li, S. H., Ding, Z., Sahin, A. A., Esteva, F. J., Hortobagyi, G. N., & Yu, D. (2011). Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med*, 17(4), 461-469.
- Zhang, W., Tao, H., Chen, X., Sugimura, H., Wang, J., & Zhou, P. (2017). High expression of WIs is associated with lymph node metastasis and advanced TNM stage in gastric carcinomas. *Pathol Int*, 67(3), 141-146.
- Zhu, C., Wei, J., Tian, X., Li, Y., & Li, X. (2015). Prognostic role of PPAR-gamma and PTEN in the renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(10), 12668-12677.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgen-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AKT	Proteinkinase B
BAD	<i>Bcl-2-associated death promotor</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMI1	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum Albumin</i>
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAIX	Carboanhydrase IX
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBF-1	<i>centromere-binding protein 1</i>
cDNA	komplementäre DNA
ceRNA	<i>competing endogenous RNA</i>
CHIP	<i>chaperone-associated E3 ligase and C terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CK2	<i>casein kinase 2</i>
CLCF1	<i>cardiotrophin-like cytokine factor 1</i>
CNOT6L	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like</i>
CP	<i>Crossing Point</i>
CREB	<i>cAMP responsive-element-binding protein</i>
CRLF1	<i>Cytokine receptor-like factor 1</i>
CUL2	Cullin-2
DAG	Diacylglycerin
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate

DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffer Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
DUSP	dual-spezifischen Proteinphosphatasen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGR-1	<i>early growth response protein 1</i>
ELB	Elongin B
ELC	Elongin C
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ER	endoplasmatischen Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
ESE	<i>exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>exonic splicing silencer</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellular-Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FOXO	<i>forkhead box O</i>
G	Guanin
GF	<i>Growth Factor / Wachstumsfaktor</i>
GFR	<i>Growth Factor Receptor / Wachstumsfaktor-Rezeptor</i>
GLUT-1	Glukose-Transporter 1
GPCR	G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES1	<i>hairy and enhancer of split 1</i>

HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
hnRNP	heterogene nukleäre RNP
HRE	Hypoxie-Response-Element
HRP	Meerrettichperoxidase
IFI27	<i>interferon α-inducible protein 27</i>
ISE	<i>intronic splicing enhancer</i>
ISS	<i>intronic splicing silencer</i>
IVT	<i>In vitro</i> Translation
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
MAM	Mitochondrien-assoziierten Membran
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC1R	<i>melanocortin-1 receptor</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
miRNA	mikro RNA
MKK4	<i>mitogen-activated protein kinase kinase-4</i>
MnCl ₂	Manganchlorid
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MTF-1	<i>metal-responsive transcription factor 1</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
nfd milk	<i>nonfat dried milk</i> / fettfreie Trockenmilch
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEDD4	<i>Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4</i>

NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	Optische Dichte
p	Phospho
p.a.	<i>per analysi</i> / zur Analyse
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBD	PtdIns(4,5)P ₂ -bindende Domäne
PcG	<i>polycomb group</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PHD	Prolylhydroxylase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3	<i>polo-like kinase 3</i>
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC1	Phospholipase C1
PP	Polypropylen
PPAR-γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
pre-mRNA	<i>precursor mRNA</i>
PTEN	<i>Phosphatase und Tensin Homologue</i>
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RASGRF2	<i>RAS-specific guanine nucleotide-releasing factor 2</i>
Rb	Retinoblastom-Protein
Rheb	<i>RAS homolog enriched in brain</i>
Rho	<i>RAS homologue</i>
RNA	Ribonukleinsäure

ROCK	<i>RhoA-associated kinase</i>
rpm	<i>revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
S1PR	<i>sphingosine 1-phosphate receptor</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser / S	Serin
SHC	<i>SRC homology 2 domain containing</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>
Sos	<i>Son of Sevenless</i>
SPRY 2	<i>sprouty homolog 2</i>
SRC	<i>sarcoma</i>
STK33	Serin/Threonin-Kinase 33
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related MOdifier</i>
SV	Splice-Variante
T	Thymidin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Thr / T	Threonin
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNFRSF1B	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B</i>
TNM	<i>tumor-node-metastasis</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
Tyr / Y	Tyrosin
U	Uracil
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
VAPA	<i>vesicle-associated membran protein-associated protein A</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

VHL	von Hippel-Lindau
WLS	<i>wntless Wnt ligand secretion mediator</i>
WWP2	<i>WW domain-containing protein 2</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schritte der Tumorentstehung	1
Abbildung 2: Kennzeichen von Tumoren	4
Abbildung 3: Struktur des Tumorsuppressors PTEN	5
Abbildung 4: Struktur der Phosphatase PTEN.....	6
Abbildung 5: Lipidphosphatase-Funktion von PTEN	7
Abbildung 6: Die AKT-Signalkaskade.....	8
Abbildung 7: Regulation der Lokalisation von PTEN	14
Abbildung 8: Die Splice-Varianten (SV) von PTEN.....	16
Abbildung 9: Konsensussequenzen des Introns.....	17
Abbildung 10: Einfluss von regulatorischen <i>cis-acting</i> und <i>trans-acting</i> Elementen auf das alternative Splicen.....	18
Abbildung 11: pT7CFE1 Vektor	31
Abbildung 12: pGEM-T Vektor.....	31
Abbildung 13: pcDNA3.1 ⁽⁺⁾ -Vektor.....	32
Abbildung 14: Nachweis der Expression von den V5-getaggten PTEN und PTEN- Δ in den transgenen 786-O-Zellen.....	55
Abbildung 15: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von PTEN in 786-O-Zellen	56
Abbildung 16: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von PTEN- Δ in 786-O-Zellen	57
Abbildung 17: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN in den transgenen 786-O-Zellen.....	58
Abbildung 18: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN- Δ in den transgenen 786-O-Zellen.....	58
Abbildung 19: Nachweis der erfolgreichen Transfektion von PTEN (B) und PTEN- Δ (A) in A498-Zellen	59
Abbildung 20: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN in den transgenen A498-Zellen	60
Abbildung 21: Quantitative Expressions-Analyse von PTEN- Δ in den transgenen A498-Zellen.....	60
Abbildung 22: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Fibronectin der Zelllinie 786-O	62
Abbildung 23: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Fibronectin der Zelllinie A498	62

Abbildung 24: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Vitronektin der Zelllinie 786-O	63
Abbildung 25: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Vitronektin der Zelllinie A498	64
Abbildung 26: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Laminin der Zelllinie 786-O	65
Abbildung 27: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Laminin der Zelllinie A498	65
Abbildung 28: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Kollagen I der Zelllinie 786-O	66
Abbildung 29: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Kollagen I der Zelllinie A498	67
Abbildung 30: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Kollagen IV der Zelllinie 786-O.	68
Abbildung 31: Migration der PTEN- und PTEN- Δ -Klone in Richtung Kollagen IV der Zelllinie A498	69
Abbildung 32: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Migration in Richtung verschiedener EZM-Komponenten der Zelllinie 786-O	70
Abbildung 33: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Migration in Richtung verschiedener EZM-Komponenten der Zelllinie A498.....	71
Abbildung 34: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an BSA.	72
Abbildung 35: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 an BSA.	73
Abbildung 36: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Fibronektin.....	74
Abbildung 37: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 an Fibronektin.....	74
Abbildung 38: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Vitronektin.....	75
Abbildung 39: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 an Vitronektin.....	76
Abbildung 40: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Laminin.	77

Abbildung 41: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 an Laminin.	77
Abbildung 42: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Kollagen I	78
Abbildung 43: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 an Kollagen I	79
Abbildung 44: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O an Kollagen IV	80
Abbildung 45: Adhäsion der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498 an Kollagen IV	81
Abbildung 46: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Adhäsion der Zelllinie 786-O an verschiedenen EZM-Komponenten.	82
Abbildung 47: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Adhäsion der Zelllinie A498 an verschiedenen EZM-Komponenten.....	83
Abbildung 48: Durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Integrin-Untereinheiten.	85
Abbildung 49: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 1$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O	86
Abbildung 50: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 1$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	87
Abbildung 51: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 2$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O	88
Abbildung 52: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 2$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	88
Abbildung 53: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O	89
Abbildung 54: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	90
Abbildung 55: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O	91
Abbildung 56: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	91
Abbildung 57: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 6$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O	92

Abbildung 58: Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 6$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	93
Abbildung 59: Expression der Integrin-Untereinheit αV in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O.	93
Abbildung 60: Expression der Integrin-Untereinheit αV in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	94
Abbildung 61: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O	95
Abbildung 62: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 1$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	96
Abbildung 63: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie 786-O	96
Abbildung 64: Expression der Integrin-Untereinheit $\beta 3$ in den PTEN- und PTEN- Δ -transgenen Zellen der Zelllinie A498	97
Abbildung 65: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 3$ (C) und $\alpha 5$ (D) der Zelllinie 786-O. ...	98
Abbildung 66: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 6$ (A), αV (B), $\beta 1$ (C) und $\beta 3$ (D) der Zelllinie 786-O. ...	99
Abbildung 67: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$ (A), $\alpha 2$ (B), $\alpha 3$ (C) und $\alpha 5$ (D) der Zelllinie A498. ...	100
Abbildung 68: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 6$ (A), αV (B), $\beta 1$ (C) und $\beta 3$ (D) der Zelllinie A498. ...	101
Abbildung 69: Proliferation der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O	102
Abbildung 70: Proliferation der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498.....	103
Abbildung 71: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Proliferation der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B)	103
Abbildung 72: Zellviabilität der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O.....	104
Abbildung 73: Zellviabilität der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498	105
Abbildung 74: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Zellviabilität der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B).....	106
Abbildung 75: Zellviabilität der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O.....	107
Abbildung 76: Zellviabilität der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498	107
Abbildung 77: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Zellviabilität der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B).....	108

Abbildung 78: Apoptoserate der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie 786-O....	109
Abbildung 79: Apoptoserate der PTEN- und PTEN- Δ -Klone der Zelllinie A498.....	110
Abbildung 80: Übersicht über den Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Apoptose der Zelllinien A498 (A) und 786-O (B)	110
Abbildung 81: Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Aktivität der Kinasen JNK pan (A, B), p38a (C, D) und ERK1/2 (E, F).....	112
Abbildung 82: Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Aktivität der Kinasen AKT1/2/3 für die Phosphorylierungsstelle S473 (A, B) und T308 (C, D).....	113
Abbildung 83: Einfluss von PTEN bzw. PTEN- Δ auf die Aktivität der Signalmoleküle β -Catenin (A, B) und CREB (C, D).	114
Abbildung 84: Aktivität der Kinase JNK (T183/Y185) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.....	115
Abbildung 85: Aktivität der Kinase JNK (T183/Y185) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.	116
Abbildung 86: Aktivität der Kinase p38 (T180/Y182) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.	117
Abbildung 87: Aktivität der Kinase p38 (T180/Y182) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.....	117
Abbildung 88: Aktivität der Kinasen ERK1/2 (T202/Y204 - T185/Y187) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.	118
Abbildung 89: Aktivität der Kinasen ERK1/2 (T202/Y204 - T185/Y187) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.....	119
Abbildung 90: Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 (Y705) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.....	120
Abbildung 91: Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 (Y705) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.	121
Abbildung 92: Aktivität der Kinasen AKT (S473) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O..	121
Abbildung 93: Aktivität der Kinasen AKT (S473) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.....	122
Abbildung 94: Aktivität der Kinasen AKT (T308) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.	123
Abbildung 95: Aktivität der Kinasen AKT (T308) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.....	123

Abbildung 96: Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (S133) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.....	124
Abbildung 97: Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB (S133) in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.	125
Abbildung 98: Aktivität des Signalmoleküls β -Catenin in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.....	125
Abbildung 99: Aktivität des Signalmoleküls β -Catenin in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.	126
Abbildung 100: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Kinasen JNK (A, B) und p38 (C, D)..	127
Abbildung 101: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Kinasen ERK1/2 (A, B) und STAT3 (C, D).	128
Abbildung 102: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Kinase AKT an der Phosphorylierungsstelle S473 (A, B) und T308 (C, D)..	129
Abbildung 103: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Signalmoleküle CREB (A, B) und β -Catenin (C, D)..	130
Abbildung 104: Expression von <i>CRLF1</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.	131
Abbildung 105: Expression von <i>IFI27</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.	132
Abbildung 106: Expression von <i>TNFRSF1B</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498.	132
Abbildung 107: Expression von <i>POSTN</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie A498..	133
Abbildung 108: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Gene <i>CRLF1</i> (A), <i>IFI27</i> (B), <i>POSTN</i> (C) und <i>TNFRSF1B</i> (D) der Zelllinie A498.	134
Abbildung 109: Expression von <i>RASGRF2</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O..	135
Abbildung 110: Expression von <i>SLAMF7</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.	136
Abbildung 111: Expression von <i>STK33</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.....	136
Abbildung 112: Expression von <i>WLS</i> in den PTEN- und PTEN- Δ -Klonen der Zelllinie 786-O.	137

Abbildung 113: Übersicht über den Einfluss von PTEN und PTEN- Δ auf die Gene <i>RASGRF2</i> (A), <i>SLAMF7</i> (B), <i>STK33</i> (C) und <i>WLS</i> (D) der Zelllinie 786-O.....	138
Abbildung 114: Expression von <i>PTEN</i> (A) und <i>PTEN-Δ</i> (B) in den einzelnen G-Stadien der Patientinnen der Mammakarzinom-Kohorte.	139
Abbildung 115: Metastasierungsfreies Überleben der Patientinnen der Mammakarzinom-Kohorte.	139
Abbildung 116: Korrelation zwischen <i>PTEN</i> und <i>PTEN-Δ</i> in der Mammakarzinom-Kohorte.	140
Abbildung 117: Schematische Darstellung von PTEN und der Splice-Variante PTEN- Δ , der Exons sowie der dazugehörigen funktionellen Domänen..	150
Abbildung 118: Signalweiterleitung von PTEN und PTEN- Δ in der Tumorzelle.....	159

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema SDS-PAGE	41
Tabelle 2: Übersicht über die Effekte, die von PTEN in den Zelllinien 786-O und A498 induziert wurden. Dargestellt ist der Einfluss von PTEN auf die untersuchten Prozesse bzw. Expressionen. Die relativen Abweichungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen wurden durch die Verwendung von Pfeilen dargestellt.	148
Tabelle 3: Übersicht über die Effekte, die von PTEN- Δ in den Zelllinien 786-O und A498 induziert wurden. Dargestellt ist der Einfluss von PTEN- Δ auf die untersuchten Prozesse bzw. Expressionen. Die relativen Abweichungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen wurden durch die Verwendung von Pfeilen dargestellt.	154
Tabelle 4: Übersicht über die Effekte, die von PTEN- Δ und PTEN in den Zelllinien 786-O und A498 induziert wurden. Dargestellt ist der Einfluss von PTEN- Δ bzw. PTEN auf die untersuchten Prozesse bzw. Expressionen. Die relativen Abweichungen im Vergleich zu den pcDNA3-Zellen wurden durch die Verwendung von Pfeilen dargestellt.	157

8.4 Werte zu den Abbildungen

Abbildung 17

		Expression in %	Standardabweichung
786-O	nativ	207,00	36,01
	pcDNA3	100,00	19,76
	PTEN 1	406,15	31,44
	PTEN 2	287,67	38,13
	PTEN 3	668,86	75,17
	PTEN 4	234,46	37,35

Abbildung 18

		Expression in %	Standardabweichung
786-O	nativ	90,15	10,02
	pcDNA3	100,00	34,39
	PTEN-Δ 1	13499,59	1715,27
	PTEN-Δ 2	2835,71	260,44
	PTEN-Δ 3	1087,19	460,47
	PTEN-Δ 4	3431,27	539,50

Abbildung 20

		Expression in %	Standardabweichung
A498	nativ	83,78	5,39
	pcDNA3	100,00	4,75
	PTEN 1	137,67	29,31

Abbildung 21

		Expression in %	Standardabweichung
A498	nativ	108,62	5,20
	pcDNA3	100,00	12,95
	PTEN-Δ 1	592,84	41,86
	PTEN-Δ 2	217,30	20,59
	PTEN-Δ 3	121,34	4,85

Abbildung 22

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	98,81	7,41	0,807
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	54,04	6,52	0,007
	PTEN 2	77,76	18,05	0,166
	PTEN 3	75,96	19,92	0,172
	PTEN 4	49,32	5,96	0,005
	PTEN-Δ 1	61,27	7,77	0,013
	PTEN-Δ 2	62,14	3,74	0,003
	PTEN-Δ 3	49,28	2,16	0,001
	PTEN-Δ 4	85,92	17,89	0,306

Abbildung 23

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	116,48	19,94	0,451
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	115,21	19,39	0,307
	PTEN-Δ 1	34,43	3,76	0,001
	PTEN-Δ 2	56,16	14,86	0,036
	PTEN-Δ 3	39,67	13,41	0,016

Abbildung 24

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	101,25	12,42	0,878
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	59,91	10,71	0,023
	PTEN 2	71,05	1,27	0,001
	PTEN 3	85,85	18,23	0,311
	PTEN 4	55,10	1,58	0,000
	PTEN-Δ 1	53,68	7,65	0,009
	PTEN-Δ 2	54,93	9,82	0,015
	PTEN-Δ 3	55,59	2,82	0,004
	PTEN-Δ 4	68,00	13,84	0,057

Abbildung 25

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	117,62	16,45	0,371
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	74,94	20,60	0,170
	PTEN-Δ 1	33,81	7,04	0,004
	PTEN-Δ 2	58,25	11,07	0,023
	PTEN-Δ 3	46,44	14,57	0,024

Abbildung 26

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	92,14	3,69	0,066
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	18,36	4,20	0,001
	PTEN 2	58,08	7,44	0,010
	PTEN 3	17,97	1,24	0,000
	PTEN 4	53,83	5,16	0,004
	PTEN-Δ 1	43,97	5,98	0,004
	PTEN-Δ 2	51,86	9,75	0,013
	PTEN-Δ 3	44,94	1,47	0,000
	PTEN-Δ 4	61,03	6,23	0,008

Abbildung 27

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	134,20	4,64	0,061
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	134,78	15,14	0,058
	PTEN-Δ 1	35,89	12,74	0,013
	PTEN-Δ 2	52,05	16,84	0,039
	PTEN-Δ 3	14,57	8,10	0,003

Abbildung 28

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	91,57	7,82	0,203
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	52,53	12,34	0,022
	PTEN 2	70,51	8,12	0,024
	PTEN 3	51,95	8,05	0,009
	PTEN 4	63,01	9,75	0,022
	PTEN-Δ 1	53,89	3,25	0,002
	PTEN-Δ 2	58,78	12,10	0,028
	PTEN-Δ 3	56,71	2,90	0,001
	PTEN-Δ 4	60,79	3,75	0,003

Abbildung 29

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	131,80	10,18	0,033
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	111,00	6,27	0,093
	PTEN-Δ 1	56,10	2,82	0,001
	PTEN-Δ 2	79,95	5,04	0,020
	PTEN-Δ 3	64,34	2,84	0,002

Abbildung 30

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	88,21	8,19	0,130
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	55,70	7,66	0,010
	PTEN 2	65,22	7,68	0,016
	PTEN 3	44,16	9,47	0,009
	PTEN 4	65,55	9,39	0,024
	PTEN-Δ 1	49,72	6,39	0,005
	PTEN-Δ 2	51,76	11,69	0,019
	PTEN-Δ 3	46,43	6,49	0,005
	PTEN-Δ 4	53,58	3,81	0,002

Abbildung 31

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	126,77	5,87	0,098
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	111,24	1,53	0,006
	PTEN-Δ 1	47,81	2,14	0,001
	PTEN-Δ 2	76,72	3,25	0,006
	PTEN-Δ 3	52,27	3,91	0,002

Abbildung 32

786-O		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
A (FN)	nativ	98,81	7,41	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	64,27	14,68	0,017
	PTEN-Δ	64,65	15,34	0,019
B (VN)	nativ	101,25	12,42	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	67,98	13,66	0,018
	PTEN-Δ	58,05	6,68	0,001
C (LM)	nativ	92,14	3,69	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	37,06	21,89	0,010
	PTEN-Δ	50,45	7,88	0,001
D (KI)	nativ	91,57	7,82	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	59,50	8,93	0,003
	PTEN-Δ	57,54	2,95	< 0,001
E (KIV)	nativ	88,21	8,19	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	57,66	10,09	0,004
	PTEN-Δ	50,37	3,07	< 0,001

Abbildung 33
A498

		Migration in %	Standardabweichung	p-Wert
A (FN)	nativ	116,48	19,94	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	115,21	19,39	0,307
	PTEN-Δ	43,42	11,34	0,013
B (VN)	nativ	117,62	16,45	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	74,94	20,60	0,170
	PTEN-Δ	46,17	12,22	0,017
C (LM)	nativ	134,20	4,64	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	134,78	15,14	0,058
	PTEN-Δ	34,17	18,80	0,026
D (KI)	nativ	131,80	10,18	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	111,00	6,27	0,093
	PTEN-Δ	66,80	12,12	0,042
E (KIV)	nativ	126,77	5,87	
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	111,24	1,53	0,006
	PTEN-Δ	58,93	15,56	0,045

Abbildung 34

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	94,31	7,67	0,328
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	96,60	3,20	0,207
	PTEN 2	94,12	4,18	0,135
	PTEN 3	89,78	12,41	0,290
	PTEN 4	98,71	2,59	0,478
	PTEN-Δ 1	106,30	12,49	0,475
	PTEN-Δ 2	104,31	20,72	0,753
	PTEN-Δ 3	109,38	15,34	0,400
	PTEN-Δ 4	108,71	11,44	0,318

Abbildung 35

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	117,02	4,95	0,129
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	87,03	8,25	0,112
	PTEN-Δ 1	104,06	8,97	0,515
	PTEN-Δ 2	108,79	14,45	0,403
	PTEN-Δ 3	107,39	21,47	0,612

Abbildung 36

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	102,92	11,65	0,707
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	69,05	19,66	0,112
	PTEN 2	76,72	0,48	0,000
	PTEN 3	82,41	0,84	0,001
	PTEN 4	97,87	17,12	0,849
	PTEN-Δ 1	86,87	4,78	0,041
	PTEN-Δ 2	96,88	23,75	0,841
	PTEN-Δ 3	91,68	11,08	0,323
	PTEN-Δ 4	84,48	13,40	0,183

Abbildung 37

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	87,91	16,68	0,492
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	61,01	13,37	0,037
	PTEN-Δ 1	90,16	11,77	0,284
	PTEN-Δ 2	69,65	11,76	0,047
	PTEN-Δ 3	70,92	18,24	0,110

Abbildung 38

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	105,38	9,74	0,440
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	72,50	25,17	0,199
	PTEN 2	73,89	7,72	0,028
	PTEN 3	78,94	3,86	0,011
	PTEN 4	87,62	14,25	0,271
	PTEN-Δ 1	78,50	12,20	0,093
	PTEN-Δ 2	84,67	20,22	0,320
	PTEN-Δ 3	74,41	20,05	0,158
	PTEN-Δ 4	73,87	23,58	0,195

Abbildung 39

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	91,02	11,87	0,478
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	50,07	16,33	0,034
	PTEN-Δ 1	90,27	7,03	0,139
	PTEN-Δ 2	57,53	12,44	0,027
	PTEN-Δ 3	59,91	14,12	0,039

Abbildung 40

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	93,55	7,56	0,278
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	49,01	17,00	0,035
	PTEN 2	67,04	14,64	0,060
	PTEN 3	63,83	4,42	0,005
	PTEN 4	85,85	21,48	0,372
	PTEN-Δ 1	76,23	3,85	0,009
	PTEN-Δ 2	86,50	16,18	0,285
	PTEN-Δ 3	66,00	19,46	0,094
	PTEN-Δ 4	69,52	28,45	0,205

Abbildung 41

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	100,92	2,70	0,714
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	41,22	10,74	0,011
	PTEN-Δ 1	99,02	8,62	0,862
	PTEN-Δ 2	48,03	15,77	0,029
	PTEN-Δ 3	38,66	8,15	0,006

Abbildung 42

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	108,19	13,32	0,398
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	52,91	13,00	0,024
	PTEN 2	69,63	11,55	0,045
	PTEN 3	73,64	6,55	0,020
	PTEN 4	95,95	14,59	0,678
	PTEN-Δ 1	82,87	10,90	0,113
	PTEN-Δ 2	92,08	12,29	0,380
	PTEN-Δ 3	82,43	16,62	0,208
PTEN-Δ 4	77,42	19,23	0,179	

Abbildung 43

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	94,22	17,84	0,727
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	55,22	17,50	0,047
	PTEN-Δ 1	86,78	8,86	0,123
	PTEN-Δ 2	65,08	14,32	0,052
	PTEN-Δ 3	62,56	17,16	0,063

Abbildung 44

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	105,38	20,20	0,690
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	67,92	13,41	0,054
	PTEN 2	77,61	10,12	0,062
	PTEN 3	76,74	4,92	0,015
	PTEN 4	96,52	22,01	0,810
	PTEN-Δ 1	87,06	11,24	0,184
	PTEN-Δ 2	93,26	14,97	0,517
	PTEN-Δ 3	87,29	16,50	0,314
	PTEN-Δ 4	81,31	25,03	0,325

Abbildung 45

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	94,85	2,76	0,230
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	54,74	14,47	0,032
	PTEN-Δ 1	93,06	4,05	0,097
	PTEN-Δ 2	62,32	16,11	0,056
	PTEN-Δ 3	50,36	13,11	0,022

Abbildung 46
786-O

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A (BSA)	nativ	94,31	7,67	0,328
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	94,80	3,84	0,073
	PTEN-Δ	107,17	2,32	0,009
B (FN)	nativ	102,92	11,65	0,707
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	81,51	12,20	0,056
	PTEN-Δ	89,98	5,49	0,035
C (VN)	nativ	105,38	9,74	0,440
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	78,23	6,84	0,008
	PTEN-Δ	77,86	4,99	0,003
D (LM)	nativ	93,55	7,56	0,278
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	66,43	15,14	0,021
	PTEN-Δ	74,56	9,02	0,011
E (KI)	nativ	108,19	13,32	0,398
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	73,03	17,72	0,056
	PTEN-Δ	83,70	6,11	0,013
F (KIV)	nativ	105,38	20,20	0,690
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	79,70	12,04	0,043
	PTEN-Δ	87,23	4,88	0,014

Abbildung 47
A498

		Adhäsion in %	Standardabweichung	p-Wert
A (BSA)	nativ	117,02	4,95	0,129
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	87,03	8,25	0,112
	PTEN-Δ	106,75	2,43	0,041
B (FN)	nativ	87,91	16,68	0,492
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	61,01	13,37	0,037
	PTEN-Δ	76,91	11,49	0,074
C (VN)	nativ	91,02	11,87	0,478
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	50,07	16,33	0,034
	PTEN-Δ	69,23	18,25	0,100
D (LM)	nativ	100,92	2,70	0,714
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	41,22	10,74	0,011
	PTEN-Δ	61,90	32,48	0,179
E (KI)	nativ	94,22	17,84	0,478
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	55,22	17,50	0,034
	PTEN-Δ	71,47	13,32	0,066
F (KIV)	nativ	94,85	2,76	0,230
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	54,74	14,47	0,032
	PTEN-Δ	68,58	22,03	0,132

Abbildung 49

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	91,34	13,84	0,392
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	55,09	4,30	0,003
	PTEN 2	60,62	11,97	0,029
	PTEN 3	61,74	7,97	0,014
	PTEN 4	91,29	31,14	0,676
	PTEN-Δ 1	100,20	12,55	0,980
	PTEN-Δ 2	85,24	15,72	0,245
	PTEN-Δ 3	64,31	8,01	0,016
	PTEN-Δ 4	56,14	7,04	0,008

Abbildung 50

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	79,58	10,05	0,072
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	80,81	5,03	0,022
	PTEN-Δ 1	101,37	12,22	0,864
	PTEN-Δ 2	17,85	2,93	< 0,001
	PTEN-Δ 3	49,50	12,50	0,020

Abbildung 51

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	142,74	24,51	0,094
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	78,93	5,70	0,024
	PTEN 2	112,16	7,39	0,104
	PTEN 3	115,88	4,23	0,023
	PTEN 4	133,57	22,99	0,127
	PTEN-Δ 1	117,70	4,46	0,021
	PTEN-Δ 2	122,19	4,90	0,016
	PTEN-Δ 3	154,01	4,11	0,002
	PTEN-Δ 4	114,81	4,63	0,031

Abbildung 52

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	55,84	13,95	0,032
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	169,98	9,51	0,006
	PTEN-Δ 1	60,60	9,78	0,020
	PTEN-Δ 2	126,39	16,80	0,113
	PTEN-Δ 3	62,35	13,14	0,038

Abbildung 53

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	115,54	37,48	0,547
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	62,65	17,06	0,063
	PTEN 2	123,73	26,19	0,257
	PTEN 3	86,61	23,19	0,423
	PTEN 4	215,71	3,50	< 0,001
	PTEN-Δ 1	177,07	61,77	0,163
	PTEN-Δ 2	132,57	12,38	0,045
	PTEN-Δ 3	215,86	31,47	0,024
	PTEN-Δ 4	172,91	33,79	0,065

Abbildung 54

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	38,20	16,82	0,024
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	115,92	50,15	0,638
	PTEN-Δ 1	30,71	24,34	0,039
	PTEN-Δ 2	141,76	21,10	0,076
	PTEN-Δ 3	45,16	7,95	0,007

Abbildung 55

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	82,40	7,22	0,052
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	23,14	7,40	0,003
	PTEN 2	76,33	5,66	0,019
	PTEN 3	37,97	8,56	0,006
	PTEN 4	142,27	54,38	0,310
	PTEN-Δ 1	60,65	15,30	0,047
	PTEN-Δ 2	68,95	8,39	0,023
	PTEN-Δ 3	75,58	12,94	0,082
	PTEN-Δ 4	91,57	12,81	0,373

Abbildung 56

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	34,15	4,03	0,001
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	137,28	35,45	0,210
	PTEN-Δ 1	31,92	8,64	0,005
	PTEN-Δ 2	97,80	27,69	0,903
	PTEN-Δ 3	42,33	6,90	0,005

Abbildung 57

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	97,16	3,05	0,413
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	63,70	2,25	0,001
	PTEN 2	104,20	25,68	0,804
	PTEN 3	80,33	11,98	0,105
	PTEN 4	115,97	9,24	0,247
	PTEN-Δ 1	118,66	1,89	0,046
	PTEN-Δ 2	108,59	1,93	0,100
	PTEN-Δ 3	130,04	24,29	0,331
	PTEN-Δ 4	124,28	19,29	0,326

Abbildung 58

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	67,86	6,98	0,015
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	140,90	22,67	0,089
	PTEN-Δ 1	68,20	8,76	0,024
	PTEN-Δ 2	94,39	22,90	0,713
	PTEN-Δ 3	64,49	9,94	0,025

Abbildung 59

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	134,22	12,91	0,044
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	76,79	4,37	0,012
	PTEN 2	120,66	13,29	0,115
	PTEN 3	106,93	2,27	0,034
	PTEN 4	113,13	8,73	0,121
	PTEN-Δ 1	120,34	15,66	0,153
	PTEN-Δ 2	104,80	7,33	0,374
	PTEN-Δ 3	129,05	18,89	0,117
	PTEN-Δ 4	106,42	3,82	0,100

Abbildung 60

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	57,54	15,02	0,039
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	81,28	20,41	0,253
	PTEN-Δ 1	84,54	13,50	0,186
	PTEN-Δ 2	39,13	6,42	0,004
	PTEN-Δ 3	93,52	20,68	0,642

Abbildung 61

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	99,57	13,14	0,960
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	63,22	8,68	0,018
	PTEN 2	106,66	18,02	0,588
	PTEN 3	97,83	23,08	0,886
	PTEN 4	175,25	22,98	0,030
	PTEN-Δ 1	179,44	21,02	0,023
	PTEN-Δ 2	98,96	11,90	0,894
	PTEN-Δ 3	154,65	31,35	0,094
	PTEN-Δ 4	117,83	15,19	0,179

Abbildung 62

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	51,01	5,61	0,004
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	125,28	9,57	0,045
	PTEN-Δ 1	71,08	8,73	0,029
	PTEN-Δ 2	49,93	5,42	0,004
	PTEN-Δ 3	53,97	13,51	0,028

Abbildung 63

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	213,30	44,05	0,047
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	132,53	14,15	0,058
	PTEN 2	160,17	7,87	0,006
	PTEN 3	118,52	26,40	0,348
	PTEN 4	169,36	14,10	0,014
	PTEN-Δ 1	187,27	28,20	0,033
	PTEN-Δ 2	184,89	4,72	0,001
	PTEN-Δ 3	268,11	36,47	0,015
	PTEN-Δ 4	118,53	15,93	0,181

Abbildung 64

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	57,75	20,52	0,070
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	75,48	28,07	0,269
	PTEN-Δ 1	98,80	14,96	0,902
	PTEN-Δ 2	35,91	3,41	0,001
	PTEN-Δ 3	93,26	13,72	0,484

Abbildung 65

786-O		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A (α1)	nativ	91,34	13,84	0,392
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	67,19	16,33	0,028
	PTEN-Δ	76,47	20,01	0,100
B (α2)	nativ	142,74	24,51	0,094
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	110,13	22,81	0,440
	PTEN-Δ	127,18	18,14	0,058
C (α3)	nativ	115,54	37,48	0,547
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	122,17	67,23	0,557
	PTEN-Δ	174,60	34,05	0,022
D (α5)	nativ	82,40	7,22	0,052
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	69,93	53,18	0,340
	PTEN-Δ	74,19	13,10	0,029

Abbildung 66
786-O

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A ($\alpha 6$)	nativ	97,16	3,05	0,413
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	91,05	23,50	0,502
	PTEN- Δ	120,39	9,14	0,021
B (αV)	nativ	134,22	12,91	0,044
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	104,38	19,23	0,680
	PTEN- Δ	115,15	11,60	0,079
C ($\beta 1$)	nativ	99,57	13,14	0,960
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	110,74	46,91	0,678
	PTEN- Δ	137,72	36,17	0,128
D ($\beta 3$)	nativ	213,30	44,05	0,047
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	145,15	23,66	0,032
	PTEN- Δ	189,70	61,21	0,061

Abbildung 67
A498

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A (α1)	nativ	79,58	10,05	0,072
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	80,81	5,03	0,022
	PTEN- Δ	56,24	42,16	0,214
B (α2)	nativ	55,84	13,95	0,032
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	169,98	9,51	0,006
	PTEN- Δ	83,11	37,49	0,517
C (α3)	nativ	38,20	16,82	0,024
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	115,92	50,15	0,638
	PTEN- Δ	72,55	60,37	0,513
D (α5)	nativ	34,15	4,03	0,001
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	137,28	35,45	0,210
	PTEN- Δ	57,35	35,41	0,172

Abbildung 68
A498

		Expression in %	Standardabweichung	p-Wert
A ($\alpha 6$)	nativ	67,86	6,98	0,015
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	140,90	22,67	0,089
	PTEN- Δ	75,69	16,30	0,123
B (αV)	nativ	57,54	15,02	0,039
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	81,28	20,41	0,253
	PTEN- Δ	72,40	29,15	0,243
C ($\beta 1$)	nativ	51,01	5,61	0,004
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	125,28	9,57	0,045
	PTEN- Δ	58,33	11,23	0,023
D ($\beta 3$)	nativ	57,75	20,52	0,070
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	75,48	28,07	0,269
	PTEN- Δ	75,99	34,82	0,355

Abbildung 69

		Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	148,34	34,68	0,137
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 2	104,58	40,20	0,862
	PTEN 3	84,98	19,15	0,307
	PTEN 4	88,75	22,11	0,471
	PTEN- Δ 2	84,53	30,09	0,467
	PTEN- Δ 3	113,16	11,86	0,716
	PTEN- Δ 4	122,73	27,63	0,105

Abbildung 70

		Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	190,79	31,00	0,151
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	137,99	51,14	0,327
	PTEN-Δ 1	123,67	50,09	0,499
	PTEN-Δ 2	199,81	37,64	0,044
	PTEN-Δ 3	93,14	23,53	0,664

Abbildung 71

		Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
A (A498)	nativ	190,79	31,00	0,151
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	137,99	51,14	0,327
	PTEN-Δ	138,87	54,94	0,345
B (786-O)	nativ	148,34	34,68	0,137
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	92,77	10,40	0,352
	PTEN-Δ	106,81	19,88	0,613

Abbildung 72

		Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	0,89	0,08	0,134
	pcDNA3	1,00		
	PTEN 2	0,78	0,22	0,234
	PTEN 3	0,79	0,23	0,254
	PTEN 4	0,78	0,07	0,030
	PTEN-Δ 2	0,88	0,21	0,413
	PTEN-Δ 3	0,57	0,07	0,010
	PTEN-Δ 4	1,18	0,10	0,099

Abbildung 73

		Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	1,17	0,49	0,609
	pcDNA3	1,00		
	PTEN 1	1,14	0,31	0,513
	PTEN-Δ 1	0,85	0,34	0,530
	PTEN-Δ 2	2,14	0,81	0,136
	PTEN-Δ 3	1,09	0,17	0,468

Abbildung 74

		Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
A (A498)	nativ	1,17	0,49	0,609
	pcDNA3	1,00		
	PTEN	1,14	0,31	0,513
	PTEN-Δ	1,36	0,68	0,460
B (786-O)	nativ	0,89	0,08	0,134
	pcDNA3	1,00		
	PTEN	0,79	0,01	< 0,001
	PTEN-Δ	0,88	0,30	0,551

Abbildung 75

		Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	176,04	24,91	0,034
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 2	141,96	44,35	0,243
	PTEN 3	116,64	15,10	0,196
	PTEN 4	141,47	25,45	0,106
	PTEN-Δ 2	125,67	43,96	0,418
	PTEN-Δ 3	155,04	15,15	0,716
	PTEN-Δ 4	176,81	18,95	0,015

Abbildung 76

		Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	74,59	6,45	0,021
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	67,16	11,63	0,039
	PTEN-Δ 1	83,07	8,32	0,072
	PTEN-Δ 2	56,49	4,52	0,004
	PTEN-Δ 3	75,20	30,54	0,295

Abbildung 77

		Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
A (A498)	nativ	74,59	6,45	0,021
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	67,16	11,63	0,039
	PTEN-Δ	71,59	13,65	0,069
B (786-O)	nativ	176,04	24,91	0,034
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	133,36	14,48	0,057
	PTEN-Δ	152,51	25,67	0,071

Abbildung 78

		Apoptose in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	104,04	14,97	0,686
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	107,20	9,15	0,306
	PTEN 2	89,38	11,65	0,255
	PTEN 3	117,59	33,57	0,460
	PTEN 4	99,20	32,34	0,970
	PTEN-Δ 1	105,98	25,25	0,721
	PTEN-Δ 2	121,26	16,57	0,156
	PTEN-Δ 3	218,08	72,66	0,106
	PTEN-Δ 4	115,03	32,77	0,510

Abbildung 79

		Apoptose in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	100,33	15,93	0,975
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	152,22	18,22	0,038
	PTEN-Δ 1	135,87	10,68	0,028
	PTEN-Δ 2	686,61	108,31	0,011
	PTEN-Δ 3	130,63	15,95	0,080

Abbildung 80

		Apoptose in %	Standardabweichung	p-Wert
A (A498)	nativ	100,33	15,93	0,975
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	152,22	18,22	0,038
	PTEN-Δ	317,70	260,87	0,359
B (786-O)	nativ	104,04	14,97	0,686
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	103,34	11,97	0,616
	PTEN-Δ	140,09	36,81	0,223

Abbildung 81

		Aktivität in %	
		786-O	A498
A, B JNK pan	nativ	106	89
	pcDNA3	100	100
	PTEN	123	84
	PTEN-Δ	70	67
C, D p38α	nativ	90	68
	pcDNA3	100	100
	PTEN	100	102
	PTEN-Δ	82	61
E, F ERK1/2	nativ	88	43
	pcDNA3	100	100
	PTEN	245	100
	PTEN-Δ	314	83

Abbildung 82

		Aktivität in %	
		786-O	A498
A, B AKT S473	nativ	77	73
	pcDNA3	100	100
	PTEN	42	85
	PTEN-Δ	78	60
C, D AKT T308	nativ	111	89
	pcDNA3	100	100
	PTEN	99	104
	PTEN-Δ	105	85

Abbildung 83

		Aktivität in %	
		786-O	A498
A, B β-Catenin	nativ	104	63
	pcDNA3	100	100
	PTEN	137	93
	PTEN-Δ	61	53
C, D CREB	nativ	149	75
	pcDNA3	100	100
	PTEN	176	153
	PTEN-Δ	123	82

Abbildung 84

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	127,28	72,33	0,581
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	251,89	113,90	0,147
	PTEN 2	100,17	35,75	0,994
	PTEN 3	103,21	6,37	0,606
	PTEN 4	177,76	119,64	0,377
	PTEN-Δ 1	246,57	106,44	0,140
	PTEN-Δ 2	119,38	4,40	0,101
	PTEN-Δ 3	310,13	83,84	0,049
	PTEN-Δ 4	255,89	123,90	0,326

Abbildung 85

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	63,14	17,02	0,064
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	50,34	12,87	0,022
	PTEN-Δ 1	71,28	26,76	0,204
	PTEN-Δ 2	33,58	16,33	0,020
	PTEN-Δ 3	45,84	1,74	0,014

Abbildung 86

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	61,64	26,91	0,293
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	191,45	98,80	0,250
	PTEN 2	36,59	2,11	0,015
	PTEN 3	28,94	10,96	0,069
	PTEN 4	64,68	4,05	0,051
	PTEN-Δ 1	206,22	169,49	0,538
	PTEN-Δ 2	46,13	24,32	0,197
	PTEN-Δ 3	36,92	12,32	0,012
	PTEN-Δ 4	36,66	10,69	0,076

Abbildung 87

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	57,31	35,17	0,336
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	86,91	18,79	0,505
	PTEN-Δ 1	46,66	25,06	0,066
	PTEN-Δ 2	30,16	19,55	0,025
	PTEN-Δ 3	61,41	41,87	0,417

Abbildung 88

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	102,01	57,64	0,969
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	97,62	6,26	0,686
	PTEN 2	84,80	0,59	0,017
	PTEN 3	117,67	51,68	0,713
	PTEN 4	270,12	44,97	0,118
	PTEN-Δ 1	118,56	67,37	0,763
	PTEN-Δ 2	81,56	5,62	0,135
	PTEN-Δ 3	222,44	45,69	0,164
	PTEN-Δ 4	105,85	14,45	0,669

Abbildung 89

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	80,81	26,83	0,341
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	105,23	52,01	0,878
	PTEN-Δ 1	107,43	48,26	0,815
	PTEN-Δ 2	61,86	25,70	0,124
	PTEN-Δ 3	75,73	13,37	0,088

Abbildung 90

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	126,31	61,71	0,655
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	172,41	5,28	0,033
	PTEN 2	111,02	8,84	0,328
	PTEN 3	92,50	18,96	0,675
	PTEN 4	78,45	20,65	0,379
	PTEN-Δ 1	117,24	70,85	0,789
	PTEN-Δ 2	211,36	59,72	0,231
	PTEN-Δ 3	110,21	24,09	0,656
	PTEN-Δ 4	77,56	2,61	0,052

Abbildung 91

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	141,47	21,16	0,030
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	91,65	21,48	0,494
	PTEN-Δ 1	170,41	31,90	0,022
	PTEN-Δ 2	113,39	27,37	0,400
	PTEN-Δ 3	113,88	25,51	0,356

Abbildung 92

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	87,23	21,11	0,550
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	135,49	4,70	0,059
	PTEN 2	42,77	7,04	0,055
	PTEN 3	53,39	8,10	0,078
	PTEN 4	68,10	10,85	0,150
	PTEN-Δ 1	42,05	3,19	0,025
	PTEN-Δ 2	103,29	7,83	0,659
	PTEN-Δ 3	87,20	1,00	0,035
	PTEN-Δ 4	52,93	2,83	0,027

Abbildung 93

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	79,72	7,38	0,012
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	103,33	1,94	0,042
	PTEN-Δ 1	109,84	6,19	0,050
	PTEN-Δ 2	101,59	5,25	0,587
	PTEN-Δ 3	88,22	12,59	0,158

Abbildung 94

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	103,00	99,01	0,821
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	84,70	35,49	0,652
	PTEN 2	23,63	8,44	0,050
	PTEN 3	37,31	26,25	0,183
	PTEN 4	68,81	14,47	0,202
	PTEN-Δ 1	54,72	20,30	0,195
	PTEN-Δ 2	41,66	22,51	0,170
	PTEN-Δ 3	39,40	26,39	0,190
	PTEN-Δ 4	18,92	7,06	0,039

Abbildung 95

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	67,24	12,42	0,045
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	105,59	12,79	0,528
	PTEN-Δ 1	63,74	5,32	0,066
	PTEN-Δ 2	106,05	4,90	0,166
	PTEN-Δ 3	43,86	1,38	0,011

Abbildung 96

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	115,70	69,76	0,804
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	95,04	12,50	0,674
	PTEN 2	108,19	31,94	0,778
	PTEN 3	119,02	0,27	0,006
	PTEN 4	57,59	12,74	0,133
	PTEN-Δ 1	77,50	33,64	0,518
	PTEN-Δ 2	128,48	5,42	0,085
	PTEN-Δ 3	72,93	8,64	0,141
	PTEN-Δ 4	101,67	21,44	0,930

Abbildung 97

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	68,67	46,34	0,269
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	84,55	27,52	0,343
	PTEN-Δ 1	116,35	23,48	0,258
	PTEN-Δ 2	143,98	66,68	0,279
	PTEN-Δ 3	78,79	9,70	0,022

Abbildung 98

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	96,85	8,20	0,683
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	172,11	10,68	0,066
	PTEN 2	111,64	0,74	0,028
	PTEN 3	96,40	23,32	0,863
	PTEN 4	98,84	1,79	0,529
	PTEN-Δ 1	107,47	11,23	0,519
	PTEN-Δ 2	82,29	1,19	0,030
	PTEN-Δ 3	77,39	4,18	0,083
	PTEN-Δ 4	71,95	13,52	0,209

Abbildung 99

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	100,88	5,35	0,763
	pcDNA3	100,00		
	PTEN 1	107,54	10,49	0,246
	PTEN-Δ 1	120,60	19,49	0,125
	PTEN-Δ 2	120,53	17,96	0,106
	PTEN-Δ 3	92,19	15,59	0,390

Abbildung 100

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A JNK (786-O)	nativ	127,28	72,33	0,581
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	158,26	72,00	0,204
	PTEN-Δ	232,99	80,76	0,046
B JNK (A498)	nativ	63,14	17,02	0,064
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	50,34	12,87	0,022
	PTEN-Δ	50,23	19,23	0,046
C p38 (786-O)	nativ	61,64	26,91	0,290
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	80,41	28,98	0,640
	PTEN-Δ	81,48	54,20	0,687
D p38 (A498)	nativ	57,31	35,17	0,336
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	86,91	18,79	0,505
	PTEN-Δ	46,08	15,63	0,027

Abbildung 101

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A ERK1/2 (786-O)	nativ	102,01	57,64	0,969
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	142,55	86,11	0,396
	PTEN-Δ	132,10	62,15	0,378
B ERK1/2 (A498)	nativ	80,81	26,83	0,341
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	105,23	52,01	0,878
	PTEN-Δ	81,67	23,36	0,307
C STAT3 (786-O)	nativ	126,31	61,71	0,655
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	113,59	41,42	0,558
	PTEN-Δ	129,09	57,51	0,386
D STAT3 (A498)	nativ	141,47	21,16	0,030
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	91,65	21,48	0,494
	PTEN-Δ	132,56	32,78	0,227

Abbildung 102

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A AKT S473 (786-O)	nativ	87,23	21,11	0,550
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	74,94	41,68	0,315
	PTEN-Δ	71,37	28,69	0,140
B AKT S473 (A498)	nativ	79,72	7,38	0,012
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	103,33	1,94	0,042
	PTEN-Δ	99,88	10,91	0,987
C AKT T308 (786-O)	nativ	103,00	99,01	0,821
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	53,61	28,06	0,046
	PTEN-Δ	38,67	14,80	0,004
D AKT T308 (A498)	nativ	67,24	12,42	0,045
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	105,59	12,79	0,528
	PTEN-Δ	71,21	31,76	0,568

Abbildung 103

		Aktivität in %	Standardabweichung	p-Wert
A CREB (786-O)	nativ	115,70	69,76	0,804
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	94,96	26,77	0,732
	PTEN-Δ	95,15	25,55	0,729
B CREB (A498)	nativ	68,67	46,34	0,269
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	84,55	27,52	0,343
	PTEN-Δ	113,04	32,72	0,561
C β-Catenin (786-O)	nativ	96,85	8,20	0,683
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	119,75	35,54	0,347
	PTEN-Δ	84,78	15,71	0,148
D β-Catenin (A498)	nativ	100,88	5,35	0,763
	pcDNA3	100,00		
	PTEN	107,54	10,49	0,246
	PTEN-Δ	111,11	16,39	0,361

Abbildung 104

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	0,320	0,077	0,004
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	0,058	0,010	< 0,001
	PTEN-Δ 1	0,025	0,003	< 0,001
	PTEN-Δ 2	0,013	0,002	< 0,001
	PTEN-Δ 3	0,059	0,013	< 0,001

Abbildung 105

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	2,328	1,300	0,219
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	2,102	0,415	0,044
	PTEN-Δ 1	2,551	0,780	0,075
	PTEN-Δ 2	0,178	0,075	0,003
	PTEN-Δ 3	4,961	1,399	0,039

Abbildung 106

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	0,285	0,132	0,011
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	0,103	0,025	< 0,001
	PTEN-Δ 1	0,046	0,062	0,001
	PTEN-Δ 2	0,015	0,013	< 0,001
	PTEN-Δ 3	0,034	0,034	< 0,001

Abbildung 107

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
A498	nativ	0,046	0,005	< 0,001
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	0,122	0,021	< 0,001
	PTEN-Δ 1	0,077	0,022	< 0,001
	PTEN-Δ 2	0,000	0,000	< 0,001
	PTEN-Δ 3	0,048	0,004	< 0,001

Abbildung 108

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
A CRLF1	nativ	0,320	0,077	0,004
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	0,058	0,010	< 0,001
	PTEN-Δ	0,032	0,024	< 0,001
B IFI27	nativ	2,328	1,300	0,219
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	2,102	0,415	0,044
	PTEN-Δ	2,563	2,392	0,375
C POSTN	nativ	0,046	0,005	< 0,001
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	0,122	0,021	< 0,001
	PTEN-Δ	0,042	0,039	0,001
D TNFRSF1B	nativ	0,285	0,132	0,011
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	0,103	0,025	< 0,001
	PTEN-Δ	0,032	0,016	< 0,001

Abbildung 109

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	0,237	0,066	0,002
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	0,061	0,021	< 0,001
	PTEN 2	0,115	0,039	0,001
	PTEN 3	0,133	0,032	< 0,001
	PTEN 4	0,089	0,033	< 0,001
	PTEN-Δ 1	0,103	0,083	0,003
	PTEN-Δ 2	0,147	0,052	0,001
	PTEN-Δ 3	0,127	0,004	< 0,001
	PTEN-Δ 4	0,153	0,088	0,004

Abbildung 110

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	0,430	0,023	0,001
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	0,061	0,064	0,002
	PTEN 2	0,029	0,009	< 0,001
	PTEN 3	0,167	0,050	0,001
	PTEN 4	0,015	0,008	< 0,001
	PTEN-Δ 1	0,333	0,242	0,041
	PTEN-Δ 2	0,256	0,090	0,005
	PTEN-Δ 3	0,057	0,020	< 0,001
	PTEN-Δ 4	0,308	0,211	0,030

Abbildung 111

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	1,029	0,109	0,687
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	0,157	0,157	0,011
	PTEN 2	0,024	0,016	< 0,001
	PTEN 3	0,045	0,028	< 0,001
	PTEN 4	0,056	0,064	0,002
	PTEN-Δ 1	1,967	0,285	0,028
	PTEN-Δ 2	2,794	0,230	0,005
	PTEN-Δ 3	0,836	0,104	0,112
	PTEN-Δ 4	1,227	0,117	0,078

Abbildung 112

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
786-O	nativ	1,277	0,132	0,068
	pcDNA3	1,000		
	PTEN 1	0,056	0,051	0,001
	PTEN 2	0,046	0,023	< 0,001
	PTEN 3	0,020	0,011	< 0,001
	PTEN 4	0,021	0,029	< 0,001
	PTEN-Δ 1	1,455	1,012	0,518
	PTEN-Δ 2	1,918	0,111	0,005
	PTEN-Δ 3	0,930	0,400	0,791
	PTEN-Δ 4	2,389	1,023	0,143

Abbildung 113

		Expression	Standardabweichung	p-Wert
A RASGRF2	nativ	0,237	0,066	0,002
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	0,100	0,031	< 0,001
	PTEN-Δ	0,133	0,023	< 0,001
B SLAMF7	nativ	0,430	0,023	0,001
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	0,068	0,069	< 0,001
	PTEN-Δ	0,238	0,125	0,001
C STK33	nativ	1,029	0,109	0,687
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	0,071	0,059	< 0,001
	PTEN-Δ	1,706	0,864	0,409
D WLS	nativ	1,277	0,132	0,068
	pcDNA3	1,000		
	PTEN	0,036	0,018	< 0,001
	PTEN-Δ	1,673	0,625	0,225

Abbildung 114

		Median	25 % Perzentil	75 % Perzentil
A PTEN-Δ	G1	0,05259	0,03427	0,05865
	G2	0,03692	0,02402	0,05398
	G3	0,02800	0,02202	0,11924
B PTEN	G1	0,82500	0,51250	1,09000
	G2	0,71500	0,55750	1,00750
	G3	0,35500	0,26750	0,54750

8.5 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Ines Breuksch

geboren am 28. März 1989 in Aurich, ledig

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

- 01/2014-vorr. 08/2017 **Promotion**
„Bedeutung der PTEN-Splice-Variante PTEN- Δ für die Tumorprogression“
- Förderung für zwei Jahre durch das Rheinland-Pfalz-Stipendium seit 03/2015
 - Teilnahme am Allgemeinen Promotionskolleg der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- seit 06/2016 Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit, Universitätsmedizin Mainz
- 01/2014-06/2016 Urologische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz
- 10/2011-12/2013 **Studium Biomedizin (M.Sc.), Note: 1,0**
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Masterarbeit: „Regulationsmechanismen des Calcium-sensitiven Rezeptors im Nierenzellkarzinom“, Urologische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz
 - Förderung durch das Deutschlandstipendium für begabte und leistungsstarke Studierende
- 09/2008-09/2011 **Studium Biochemie (B.Sc.), Note: 1,4**
Leibniz Universität, Hannover
- Bachelorarbeit: „The Role of Hedgehog Signaling in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Reactivation“, Institut für Virologie, Medizinische Hochschule Hannover
- 08/2005-07/2008 **Abitur, Note: 1,8**
Gymnasium Ulricianum, Aurich
- Leistungskurse: Mathematik, Chemie, Biologie

NEBENTÄTIGKEITEN

- 06/2013-12/2013 **wissenschaftliche Hilfskraft**
Urologische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz
- Durchführung und Kontrolle sicherheitstechnischer Aufgaben
 - Betreuung von Praktikanten
- 05/2012-02/2013 **wissenschaftliche Hilfskraft**
Experimentelle Ophthalmologie, Universitätsmedizin Mainz
- Durchführung von experimentellen Studien
 - Einweisung und Betreuung von Praktikanten sowie Abschlussarbeiten
- 04/2009-09/2011 **geringfügig beschäftigte Mitarbeiterin**
McDonald's Restaurant, Hannover
- Herstellung und Verkauf der Produkte im Rotationssystem des Restaurants
- 12/2006-09/2008 **geringfügig beschäftigte Mitarbeiterin**
McDonald's Restaurant, Aurich
- Herstellung und Verkauf der Produkte im Rotationssystem des Restaurants

VERÖFFENTLICHUNGEN

- Publikationen **Breuksch I**, Weinert M, Brenner W, "The role of extracellular calcium in bone metastasis", JBO 5: 143-145, 2016
- Ishibashi K, Haber T, **Breuksch I**, Gebhard S, Sugino T, Kubo H, Hata J, Koguchi T, Yabe M, Kataoka M, Ogawa S, Hiraki H, Yanagida T, Haga N, Thüroff JW, Prawitt D, Brenner W, Kojima Y, „Overriding TKI resistance of renal cell carcinoma by combination therapy with IL-6 receptor blockade“, submitted in Oncotarget
- Breuksch I**, Prosinger F, Baehr F, Bauer HK, Prawitt D, Brenner W, „Integrin $\alpha 5$ triggers the metastatic potential in renal cell carcinoma“, submitted in Oncotarget
- Kongressbeiträge **Breuksch I**, Schmidt M, Hengstler J, Edlund K, Büttner B, Gebhard S, Prawitt D, Hasenburg A, Brenner W, „Die Bedeutung der Splice-Variante PTEN- Δ für die Tumorprogression“. Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie, Düsseldorf, 10.-11.11.2016

Breuksch I, Proisinger F, Baehr F, Brenner W, "The importance of integrin $\alpha 5$ for the progression of RCC". 23rd Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR16), Parma, Italien, 20.-22.10.2016

Breuksch I, Proisinger F, Baehr F, Brenner W, „Integrin $\alpha 5$ als Trigger für das metastatische Potential des Nierenzellkarzinoms". 5. Symposium Nierenzelltumoren 2016 "Klinische und experimentelle Forschung beim Nierenzellkarzinom", Saarbrücken, 08.-09.04.2016

Breuksch I, Haber T, Roos FC, Thüroff JW, Brenner W, "The calcium-sensing receptor as a biomarker for bone metastasis". 7. AuF-Symposium 2015 "Biomarker in der Urologie", Dresden; Der Urologe 55, 2016

***Breuksch I**, Haber T, Roos FC, Hampel C, Junker K, Thüroff JW, Brenner W, "Influence of protein kinase C isoforms on calcium-sensing receptor in renal cell carcinoma". 6. AuF-Symposium 2014 "Interdisziplinäre Forschung in der Urologie", Homburg/Saar; Der Urologe 54: 117, 2015

*Auszeichnung für die beste Präsentation

Breuksch I, Haber T, Roos CF, Hampel C, Junker K, Thüroff JW, Brenner W, „Protein Kinase C epsilon is involved in the regulation of calcium-sensing receptor in renal cell carcinoma“. EMBO Conference 2014 „Cellular Signaling & Cancer Therapy“, Cavtat, Kroatien, 23.-27.05.2014

Haber T, **Breuksch I**, Hampel C, Roos FC, Thüroff JW, Brenner W: Low concentration of tyrosine kinase inhibitors induces tumor progression in renal cell carcinoma via AKT and SRC activity. EMBO Conference, Cellular Signaling & Cancer Therapy, Cavtat, Kroatien, 23.-27.05.2014

KENNTNISSE UND FÄHIGKEITEN

Weiterbildungen

Allgemeines Promotionskolleg

- „Good Scientific Practice“
- „Schreibwerkstatt für Promovierende“
- „Scientific Publishing: Editor, Referee & Author Responsibilities“
- „Gekonnt Präsentieren“
- „Projektmanagement“
- „Intercultural Communication“

	<ul style="list-style-type: none">▪ „Career Planning for PhD: Career Pathing and Skills Inventory“ AuF-Workshop „Skills for Medical Writing - Successful scientific publishing“ Projektleiterschein und Fachkunde „Sicherheit in der Gentechnik“ Strahlenschutz-Sachkenntnis nach Fachkundegruppe S4.2 Spezielles Recht für Chemiker
Mitgliedschaften	Mitglied in der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM)
Sprachen	Englisch: Fließend in Schrift und Sprache
EDV-Kenntnisse	MS Office, Adobe Photoshop, GraphPad Prism, SPSS Statistics

8.6 Danksagung

Zu aller erst möchte ich Walburgis für die Überlassung des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit danken. Du bist eine tolle Chefin, die einem genug Freiheiten beim Forschen lässt, dabei jedoch stets für einen da ist. Vielen Dank für die gesamte Promotionszeit und für die Korrektur und Begutachtung meiner Dissertation.

Ich danke Prof. Dr. Hankeln für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit als Zweitkorrektor und den damit verbundenen Arbeitsaufwand.

Der Rheinlandpfalz-Stiftung danke ich für die Unterstützung in Form eines Forschungsstipendiums.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Thüroff und bei Prof. Dr. Hasenburg für die Möglichkeit bedanken, dass ich in Ihren Forschungslaboren meine Dissertation anfertigen durfte.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Forschungslabor der ehemaligen Urologie, nun Gynäkologie, sowie bei der Kinderklinik. Heide, Tobi, Wiebke, Flo, Uschi und Thorsten - vielen Dank für die schöne Zeit im Labor, die unterhaltsamen Gespräche, vielen Ratschläge und tollen Stammtische. Heide du bist eindeutig die beste Kollegin und hast mich immer hervorragend unterstützt, Danke dafür! Wiebi, Danke für's Dasein, Aufbauen und die vielen Gespräche. Dirk, ich danke dir dafür, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest und stets einen guten Tipp parat hattest. Pia danke ich für die Unterstützung bei den vielen Sequenzierungen.

Besonderen Dank gilt allen Freunden, insbesondere der **Lunch & Learn PhD Group** und der **STIPI GANG**, für die wunderbare Zeit während meiner Promotion. All die Partys, Städte-Trips, Urlaube, Festivals, Grill-Abende am Rhein, Konzerte und Wein-Events haben definitiv zur Erholung und Unterstützung beigetragen.

Der größte Dank geht an meine Familie, meine Schwester Kathrin und meine Eltern Hildegard und Harald. Ich danke euch vom Herzen für die riesige Unterstützung, den Rückhalt und, dass ihr mir dieses Studium und vieles weiteres ermöglicht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ines Breuksch, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Mainz, den 30. Mai 2017

Ines Breuksch