

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung der Rolle von Nck2 in ErbB2-
vermittelten, promigratorischen Signalwegen in
Brustkrebszellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kristina Keitel

aus Frankfurt am Main

Gutachter: 1. Prof. Dr. P. Ruiz-Noppinger
2. Prof. Dr. A.-M. Frischauf
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Chr. Sers

Datum der Promotion: 14.06.2009

Erklärung

„Ich, Kristina Keitel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Charakterisierung der Rolle von Nck2 in ErbB2-vermittelten, promigratorischen Signalwegen in Brustkrebszellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

20.02.2009

Kristina Keitel

Für Gertrud Keitel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Die ErbB-Familie der Rezeptortyrosinkinasen	7
1.1.1. Aktivierung durch Dimerisierung	7
1.1.2. Expression der ErbBR	8
1.2. Extrazelluläre Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie	8
1.2.1. EGF-related growth factors	8
1.2.2. Neureguline	9
1.3. Erzeugen der Signalvielfalt der ErbB-Rezeptoren	9
1.4. Intrazelluläre Effektoren der ErbB2-Signalwege	11
1.5. Intrazelluläre Bindungspartner des ErbB2R	11
1.5.1. Vorarbeit der Arbeitsgruppe: Nck2 bindet an ErbB2 in Hefezellen	11
1.5.2. Nck2, ein SH2/SH3 Adaptorprotein	12
1.6. ErbB2-Nrg-Modul: biologische Funktion	13
1.6.1. Embryogenese	13
1.6.2. ErbB2 in Tumorzellen	13
1.6.3. ErbB2: direkte Krebstherapeutika	14
1.6.4. Nrg und Tumorgenese	15
1.7. Migration, ein Kernschritt der Krebsmetastasierung	16
1.7.1. Zellbewegung	16
1.7.2. Akteure der Zellbewegung	16
2. Material und Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1. Chemikalien, Zellkultur-Materialien und Geräte	20
2.1.2. Antikörper	21
2.2. Methoden	22
2.2.1. Zellbiologische Methoden	22
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden	26

3. Ergebnisse	29
3.1. Nck2 interagiert phosphorylierungsabhängig mit ErbB2 in menschlichen Brustkrebszellen	29
3.1.1. Überexpressionsstudien	29
3.1.2. Endogene Koimmunpräzipitation	32
3.2. ErbB2-Nck2 Interaktion: Entschlüsselung der Funktion	34
3.2.1. Expression von dominant-negativen Nck-Mutanten	34
3.2.2. Intrazelluläres Signaling	35
3.2.3. Brustkrebszellmigration: vermindert in Nck-Mutantenzellen	42
3.2.4. Mutantenzellen: veränderte Zellmorphologie	45
3.2.5. Proliferation: unbeeinflusst in Mutantenzellen	53
4. Diskussion	55
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	55
4.2. Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2	55
4.2.1. Hefe-2-Hybrid Screen und Microarray-Studien	55
4.2.2. Überexpressionsstudien	57
4.2.3. Endogene Koimmunpräzipitation	57
4.3. Interaktion zwischen ErbB2 Nck2: Biologische Rolle	58
4.3.1. Expression von dominant-negativen Mutanten	60
4.3.2. Migrationsversuche	60
4.3.3. Veränderte Morphologie der Mutantenzellen	63
4.3.4. Intrazelluläre Signalwege: MAPK- und AKT/PKB-Signalwege	71
4.3.5. Proliferation	73
4.3.6. Das Nrg-ErbB2-Nck-Interaktom-neue therapeutische Ansätze?	74
5. Zusammenfassung	77
6. Schriftenverzeichnis	78
7. Abkürzungsverzeichnis	89
8. Danksagungen	92
9. Lebenslauf	93

1 Einleitung

1.1 Die ErbB-Familie der Rezeptortyrosinkinasen

Auf der Grundlage von Sequenzhomologie und strukturellen Charakteristika werden Wachstumsfaktorrezeptoren in verschiedene Gruppen gegliedert. Die Familie der humanen EGF-Rezeptortyrosinkinasen setzt sich aus vier Mitgliedern zusammen: EGFR (HER1, ErbB1), ErbB2 (HER2, neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (Olayioye et al., 2000). Diese Rezeptoren bestehen aus einem glykosilierten extrazellulären Ligandenbindungsanteil mit zwei zystinreichen Domänen, einer einzelnen transmembranen Domäne und einer intrazellulären Region. Letztere enthält wiederum eine Tyrosinkinasedomäne und einen C-terminalen Bereich, der die Autophosphorylierungsstellen trägt (Yarden and Sliwkowski, 2001).

1.1.1 Aktivierung durch Dimerisierung

Nur die ErbB1- und ErbB4-Rezeptoren sind bezüglich Ligandenbindung und Kinaseaktivität voll funktionsfähig: ErbB3 besitzt keine Kinaseaktivität und ist von seinen Heterodimerisierungspartner abhängig (Guy et al., 1994). ErbB2 kann wiederum keinen der bekannten ErbB-Liganden binden sondern wird allein durch Heterodimerisierung mit anderen ErbBR aktiviert. Die starke Kinaseaktivität des Rezeptors wirkt jedoch als wichtiger Signalverstärker in allen ErbB-Heterodimeren (Pinkas-Kramarski et al., 1996). Während die Ligandenbindung eine Rezeptordimerisierung fördert und stabilisiert, zeigen umgekehrt auch dimerisierte Rezeptoren eine höhere Affinität zu Liganden (Warren et al., 2006).

Die extrazelluläre Region der ErbBR besteht aus vier Domänen (I-IV), wobei Domäne II für die direkte Rezeptor-Rezeptor Interaktion zuständig ist (Garrett et al., 2003). Im ruhenden Stadium nehmen die Rezeptoren eine inaktive Konstellation ein, in der die Dimerisierungsstelle der Domäne II durch eine intramolekulare Brücke versteckt liegt (Abbildung 1). Nach Ligandenbindung löst sich letztere auf und die Dimerisierungsdomäne wird bloßgelegt. Das Andocken von Wachstumsfaktoren an die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren induziert entsprechend eine Rezeptordimerisierung und nähert die intrazellulären Kinasedomänen an. Die Struktur der extrazellulären Domäne von ErbB2 unterscheidet sich hierin jedoch radikal von den anderen Mitgliedern der ErbBR-Familie: Sie ist von vornherein in einer aktivierten Konformation und bereit mit anderen, durch Liganden aktivierten, ErbBR zu interagieren (Garrett et al., 2003). Die Rezeptoruntereinheiten des dimerischen Komplexes kreuz-

phosphorylieren dann Tyrosinreste in der *activation loop* (A-loop) Domäne seines Partners, wodurch eine physikalische Barriere aufgehoben und die Kinaseaktivität gesteigert wird (Hubbard et al., 1998). Die Rezeptoruntereinheiten kreuz-phosphorylieren sich daraufhin gegenseitig an spezifischen Tyrosinresten; daraufhin werden intrazelluläre Signalmoleküle rekrutiert und aktiviert, sowie schließlich spezifische zelluläre Antworten ausgelöst (Yarden and Sliwkowski, 2001).

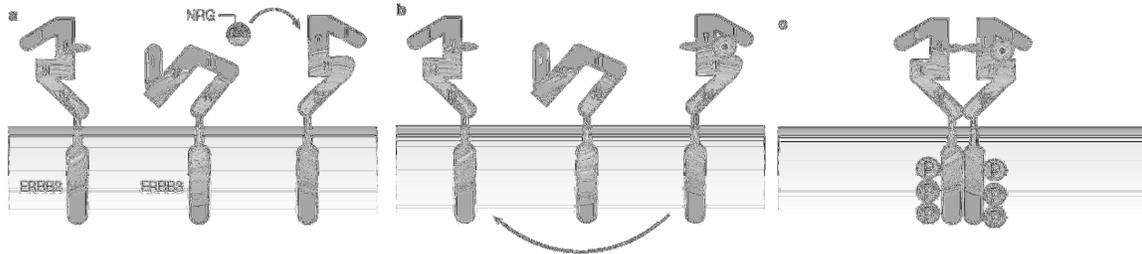


Abbildung 1: ErbBR Ektodomänenstruktur

Die extrazelluläre Region der ErbBR besteht aus vier Domänen (I-IV). Im inaktiven Zustand nimmt ErbB3 eine blockierte Konstellation ein (a). Als bald Domänen I und III binden Nrg, woraufhin Domäne II freigelegt wird (b) und die Rezeptorinteraktion ermöglicht (c). ErbB2 hat eine festgelegte Konformation, die dem aktiven Zustand gleicht. (Hynes and Lane, 2005)

1.1.2 Expressionsmuster der ErbBR

Bezüglich ihrer *in vivo* Expression zeigen ErbBR unterschiedliche Muster: ErbB1 wird von Leberparenchymzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und von einigen Epithelgeweben sowie in der Basalmembran der Haut exprimiert (Adamson, 1990; Partanen, 1990); ErbB2 ist in einer Reihe von Geweben zu finden wie dem Nervensystem, dem Bindegewebe und dem sekretorischen Epithel (Kokai et al., 1987); ErbB3 wird vor allem im Epithel verschiedener Organe exprimiert sowie im peripheren Nervensystem und in Oligodendrozyten, während die Expression von ErbB4 weitgehend auf das zentrale Nervensystem sowie Herzmuskel- und Gliazellen beschränkt ist (Pinkas-Kramarski et al., 1997).

1.2 Extrazelluläre Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie

1.2.1 EGF-related growth factors

Die bekannten Liganden der ErbBR sind die *EGF-related growth factors*. Diese Substanzen werden meist als transmembrane Vorläufer synthetisiert, von denen dann die biologisch aktive, extrazelluläre Domäne proteolytisch abgespalten wird. Diese binden schließlich auto- oder

parakrin an nahe gelegene Rezeptoren (Warren and Landgraf, 2006). Allen ErbB-Liganden ist eine EGF-ähnliche Domäne von ungefähr 60 Aminosäuren gemeinsam, die notwendig und ausreichend für die entsprechende Rezeptorbindung und -aktivierung ist.

1.2.2 Neureguline

Liganden von ErbB3 und ErbB4, die Neureguline (Nrg), umfassen eine große Familie, die aus alternativem Spleißen der vier Nrg-Gene hervorgeht wobei Nrg1 und Nrg2 an ErbB3 und ErbB4 binden, Nrg3 und Nrg4 an ErbB4 (Burden and Yarden, 1997). Nrg1 wiederum kann mehr als 15 durch Spleißen entstehenden Isoformen bilden; basierend auf der N-terminalen Domäne werden sie in drei Typen unterteilt: Heregulin (Hrg, Typ 1), *glial growth factor* (GGF, Typ 2) und *sensory and motor neuron derived factor* (SMDF, Typ 3) (Falls, 2003), wobei die TypI-Isoformen (α und β) am besten untersucht sind (Warren and Landgraf, 2006). Vier verschiedene Nrg-Gene kodieren für die Nrg10-Isoformen (Falls, 2003). Nrg1-Isoformen werden in einer Reihe von Gewebearten exprimiert wie zum Beispiel in Gehirn, Herz, Muskel, Brust, Leber und Lunge (Meyer and Birchmeier, 1995).

1.3 Erzeugen der Signalvielfalt der ErbB-Rezeptoren

Die Bausteine des ErbB-Signalnetzwerkes sind evolutionär betrachtet alt. Auf den ersten Blick ähneln sie einfachen Wachstumsfaktorsignalwegen: Die Ligandenbindung an eine monomere Rezeptortyrosinkinase aktiviert die zytoplasmatische, katalytische Funktion, indem sowohl die Dimerisierung als auch die Autophosphorylierung des Rezeptors ausgelöst werden. Die phosphorylierten Phosphotyrosinreste fungieren als Andockstellen für intrazelluläre Adaptorproteine oder Enzyme, die simultan mehrere Signalkaskaden auslösen können, um eine physiologische Antwort zu erzeugen. Dieser einfache lineare Signalweg hat sich zu einem reichen interaktiven und vielschichtigen Netzwerk entwickelt, in dem die kombinatorische Expression und Aktivierung der Komponenten kontextspezifische biologische Antworten ermöglicht (Yarden and Sliwkowski, 2001). Durch die Fülle der Isoformen des ErbB-Nrg Moduls kann auf mindestens drei Ebenen eine Diversifikation der Signalantworten generiert werden: Erstens durch die Vielzahl der Bindungspartner; zweitens durch die Fähigkeit der ErbB-Moleküle verschiedene Homo- und Heterodimere zu bilden; und schließlich durch die Eigenschaft der unterschiedlichen Rezeptordimere an verschiedene Gruppen von zytoplasmatischen Signalproteinen zu binden (Burden and Yarden, 1997).

Obwohl es Evidenz von in-vitro Versuchen für die Existenz aller zehn möglichen ErbBR-Homo- und Heterodimere, einschließlich eines ErbB2-Homodimers, gibt, das durch onkogene Mutation oder Überexpression stabilisiert wird, ist dieses Netzwerk von Rezeptorzusammenspielen keinesfalls ein Zufallsprodukt, sondern folgt vielmehr einer strikt hierarchischen Ordnung, die maßgeblich von extrazellulären Liganden bestimmt wird (Riese et al., 1995; Tzahar et al., 1996). Extrazelluläre Liganden stabilisieren spezifisch bestimmte Rezeptordimerpaare; Nrg1 β zum Beispiel induziert bevorzugt die Bildung von ErbB2/ErbB3 und ErbB2/ErbB4 Heterodimeren (Jones et al., 1999). Entgegen vorheriger Hypothesen zeigen Kristallstrukturdaten, dass die extrazellulären Liganden nicht direkt als Brücke in der Rezeptor-Rezeptor Interaktion beteiligt sind. Vielmehr legt deren Bindung die Dimerisierungsdomäne des Rezeptors bloß und gibt somit die entscheidende Bindungsdomäne frei. Homodimere sind meist schwächer als Heterodimere. Dabei sind Heterodimere, die ErbB2 enthalten, besonders potent insbesondere im Hinblick auf ihren transformierenden und mitogenen Charakter (Yarden and Sliwkowski, 2001). ErbB2 ist in diesem Zusammenhang der bevorzugte Heterodimerisierungspartner aller Rezeptoren und wirkt als Signalverstärker; dies ist sicherlich unter anderem durch die unveränderte aktivierte Konformation und die niedrige Dissoziationsrate des Rezeptors zu erklären (Graus-Porta et al., 1995; Garrett et al., 2003).

Eine weitere Hypothese zur Erzeugung von Signaldiversifikation besteht darin, dass das Autophosphorylierungsmuster von Tyrosinresten durch verschiedene Heterodimerkombinationen (Olayioye et al., 1998) oder auch durch die Liganden moduliert werden kann (Sweeney and Carraway, 2000). Für die Liganden-induzierte differenzierte Phosphorylierung wurden drei mögliche Mechanismen postuliert (Sweeney and Carraway, 2000): So kann ein Ligand zum einen eine spezifische Rezeptordimerisierung und Phosphorylierung von Tyrosinresten induzieren. Zum anderen kann das Binden von Liganden die Phosphorylierung von intrazellulären Resten auch dadurch beeinflussen, indem es die Assoziation des Rezeptorkomplexes mit anderen zellulären Proteinen wie Kinasen, Phosphatasen oder sogar Zelloberflächenrezeptoren fördert. Schließlich kann der Ligand auch eine direkte Konformationsänderung des Rezeptordimers bewirken (Sweeney and Carraway, 2000).

Insgesamt darf das Nrg-ErbBR-Signalmodul also keinesfalls in ein starres, mechanisches Bild umgedeutet werden. Vielmehr hängt die Flexibilität der zellulären Antwort von Faktoren wie dem zellulären Milieu, den Liganden, der ErbBR-Dimerbildung, und dann auch von der katalytischen Aktivität, dem Rezeptor-Routing, sowie der Transmodulation der ErbBR selber ab.

1.4 Intrazelluläre Effektoren der ErbBR-Signalwege

Die ErbBR interagieren mit einer Fülle von intrazellulären Signaltransduktionsproteinen. Analog zu anderen Rezeptortyrosinkinasen legt die ligandeninduzierte Autophosphorylierung der ErbBR an spezifischen Tyrosinresten (pTyr) Andockstellen für intrazelluläre Signalmoleküle frei, die SH2-Domänen oder PTB-Domänen enthalten (Pawson, 1995). Die Bindungsspezifität dieser Interaktionen ist durch die an die Phosphotyrosine angrenzenden Aminosäuren festgelegt: N-terminal-liegende Aminosäuren bestimmen dabei das Binden von spezifischen PTB-Proteinen, C-terminal-lokalisierte das von SH2-Proteine (Janes et al., 1997).

Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren oder tyrosin-phosphorylierte Substrate sind Anknüpfungspunkte für Proteine mit SH2- und PTB-Domänen. Es sind alleine in menschlichen Zellen über 200 verschiedene Typen von Signalmolekülen mit SH2- und PTB-Domänen bekannt, die in drei Klassen eingeteilt werden können: (1) Enzyme, wie die Familie der Src-Tyrosinkinasen, Phospholipase $C\gamma$ und *Ras GTPase activating protein* (RasGAP); (2) Regulatorproteine wie die Vav-Familie der Rho-GEFs, sowie die Cbl und STAT Proteine; und schließlich (3) Adaptorproteine ohne katalytische Aktivität (Buday et al., 2002).

1.5 Intrazelluläre Bindungspartner des ErbB2R

ErbB2 besitzt fünf Autophosphorylierungsstellen, die in dieser Arbeit mit Y1 (der am weitesten N-terminal gelegene Tyrosinrest) bis Y5 (der am weitesten C-terminal lokalisierte) bezeichnet werden (Akiyama et al., 1991). Vor Beginn dieser Arbeit wurden etwa 20 Interaktionspartner von ErbB2 identifiziert, unter ihnen Shc (Segatto et al., 1993), Grb2 (Howard et al., 2003), Grb-7, c-Src und Ras-GAP (Olayioye et al., 2000; DiCesare, 2001).

1.5.1 Vorarbeit der Arbeitsgruppe: Nck2 bindet an ErbB2 in Hefezellen

In Vorfeld wurde durch die Arbeitsgruppe auch Nck2 als ein Interaktionspartner von ErbB2 mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid Screens identifiziert (Keitel et al., 2008). Bei diesem Screen wurden chimerische TrpMet-ErbB2-Konstrukte als konstitutiv aktive Köder eingesetzt, bei denen das C-terminale Ende des TrpMet-Rezeptors durch das C-terminale Ende des ErbB2-Rezeptors ersetzt wurde (Abbildung 2). TrpMet ist eine onkogene, zytoplasmatische Variante des Met-Rezeptors, die durch eine N-terminale *Trp translocated promoter region* (Trp)-Dimerisationsdomäne konstitutiv aktiv ist. Durch diese konstitutiv-aktive Kinase dimerisiert und autophosphoryliert

sich das chimäre TrpMet-ErbB2-Konstrukt ligandenunabhängig, wobei der C-terminale Bereich mit ErbB2-spezifischen Bindungseigenschaften ausgestattet ist. Im Screen wurden zwei verschiedene TrpMet-ErbB2-Konstrukte als Köderprotein verwendet (Abbildung 2). Diese wurden dann gegen Maus-cDNA Konstrukte (*Hollenberg library*) gescreent (DiCesare, 2001).

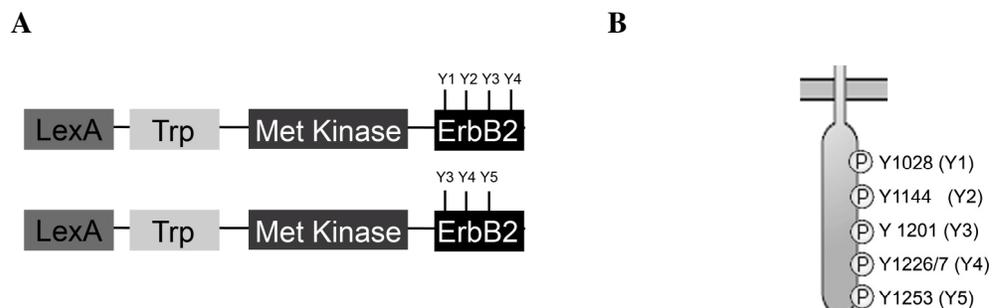


Abbildung 2, A: Struktur des im Hefe-2-Hybrid Screen verwendeten, chimärischen ErbB2 Proteinköders.

Der im Hefe-2-Hybrid Screen verwendete Proteinköder besteht aus einer LexA DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne, gefolgt von der Kinasedomäne von TrpMet; das C-terminale Ende von TrpMet ist durch Sequenzen der ErbB2 *multiple docking region* ersetzt. Der TrpMet-ErbB2-Y1-Y4-Proteinköder birgt die Tyrosinreste Y1028 (Y1, human 1023), Y1144 (Y2, human 1139), Y1201 (Y3 human 1201) und Y1226/7 (Y4, human 1221/2); der TrpMet-ErbB2-Y3-Y5-Proteinköder enthält die Reste Y1201 (Y3), Y1226/7 (Y4) und Y1253 (Y5, human 1248) (DiCesare, 2001).

B: ErbB2R: Nomenklatur der intrazellulären Tyrosinkinasereste

Neben anderen bereits bekannten Interaktionspartnern, z.B. Shc (Dankort et al., 2001b), wurde das intrazelluläre Adaptorprotein Nck2 als Interaktionspartner des TrpMet-ErbB2-Konstrukts identifiziert (Keitel et al., 2008), das ein Adaptormolekül ohne katalytische Aktivität darstellt. In einem systematischen Interaktionsscreen anhand von Deletions- und Punktmutanten konnte die genaue Interaktionsstelle von Nck2 mit dem ErbB2-Rezeptorresiduum bestimmt werden: Der Y3-Rest des TrpMet-ErbB2-Konstrukts war notwendig für eine Interaktion von Nck2 mit dem aktivierten Konstrukt (Keitel et al., 2008).

1.5.2 Nck2, ein SH2/SH3 Adaptorprotein

SH-Adaptorproteine ohne katalytische Aktivität wie Nck setzen sich meist aus einer einzelnen SH2-Domäne und einer variierenden Anzahl von SH3-Domänen zusammen; sie haben darüber hinaus keine anderen funktionellen Motive (Birge et al., 1996). Nck ist 47kDa groß und umfasst drei aneinander gereihte SH3-Domänen gefolgt von einer C-terminalen SH2-Domäne (Lehmann et al., 1990). In der Nck-Proteinfamilie wurden bisher zwei Mitglieder, nämlich Nck1 und Nck2,

identifiziert (Park, 1997; Tu et al., 1998), deren Aminosäuren zu 68 Prozent identisch sind (Braverman and Quilliam, 1999). Das Nck1-Gen befindet sich im Menschen auf dem 3q21 Locus von Chromosom 3, das Nck2-Gen ist auf Chromosom 2 am 2q12 Locus angesiedelt (Huebner et al., 1994; Vorobieva et al., 1995). Beide Proteine sind weit reichend exprimiert und nehmen eine wichtige Funktion als Regulatoren des Aktinzytoskeletts ein (Buday et al., 2002).

1.6 ErbBR-Nrg-Modul: biologische Funktion

1.6.1 Embryogenese

Genetische Studien untermauern die Tragweite des ErbBR-Nrg1-Moduls in der kardialen und neuronalen Entwicklung: ErbB2-, ErbB3-, ErbB4- und auch Nrg1-Knockout-Mäuse sind embryonal letal durch Defekte des Herzens und der Neuralleiste (Gassmann et al., 1995; Lee et al., 1995; Meyer and Birchmeier, 1995; Burden and Yarden, 1997; Erickson et al., 1997). Diese Studien zeigen außerdem, dass ErbB2, ErbB3, ErbB4 und Nrg1 eine funktionale Einheit bilden, da die Tiere überlappende Phänotypen in der neuronalen und kardialen Entwicklung aufweisen (Gassmann et al., 1995; Lee et al., 1995; Meyer and Birchmeier, 1995; Erickson et al., 1997; Britsch et al., 1998). Das ErbB2-ErbB4-Nrg1-Modul scheint z.B. in der Ausbildung von Herztrabekeln und das ErbB2-ErbB3-Nrg1 System in der Migration von Neuronen der Neuralleiste zu agieren. Diese Studien verdeutlichen, dass ErbB2 auch in vivo an Nrg1-aktivierten ErbB3 und ErbB4 Signalwegen beteiligt ist und dass diese Komponenten als eine funktionale Einheit zu betrachten sind.

1.6.2 ErbB2 in Tumorzellen

In der Erforschung der biologischen Rolle von ErbB2 wurde aufgrund der zellulären Effekte des Rezeptors ein besonderes Augenmerk auf die Klärung der Funktion von ErbB2 in der Krebsentstehung gelegt. Die Rolle von ErbB2 in der Tumorgenese wurde zunächst in Brustkrebszellen entdeckt, in denen es bei etwa 25% der Karzinomtypen überexprimiert ist. Es ist aber mittlerweile bekannt, dass ErbB2 in einer Reihe von Krebsarten wie Ovariarkarzinomen, Magenkarzinomen, Speicheldrüsenkrebs und dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom eine wichtige Rolle spielt (Slamon et al., 1987; Stephens et al., 2004; Hynes and Lane, 2005). ErbB2 ist ein bedeutender diagnostischer und prognostischer Faktor sowie ein therapeutisches Target in der Tumorthherapie geworden. Als Protoonkogen führt dessen Amplifikation zu einer Überexpression des Rezeptors. Die Überexpression wiederum kann eine liganden-unabhängige Homodimerisation und konstitutive Rezeptoraktivierung bewirken, die ausreicht, um eine

Tumortransformation zu induzieren. Alternative Mechanismen liganden-unabhängiger, konstitutiver ErbB2-Signale umfassen Punktmutationen in der Transmembrandomäne und das fehlende von nicht katalytischen Sequenzen. Im Falle von ErbB2 ist jedoch bei fast allen Krebsarten lediglich das Überexpressionsniveau der entscheidende klinische Parameter (Stove and Bracke, 2004). Im Falle von ErbB3 und ErbB4 ist eine Überexpression oder Mutation kein klinisch robuster Marker; erhöhte ErbB3-Level verstärken aber das Wachstumspotential, die Metastasierungsrate und die Wahrscheinlichkeit der Arzneimittelresistenz in Krebszellen, die bereits erhöhte ErbB1 oder ErbB2 Expressionsniveaus besitzen (Chen et al., 2000b).

Das transformierende Potential übt ErbB2 vor allem über dessen promotogene und proliferationsfördernde Wirkung aus. Darüber hinaus ist aber auch die Förderung der ligandeninduzierten Invasion von angrenzendem Gewebe und der Metastasierung ein entscheidender Faktor (Hynes and Lane, 2005). Durch Mutationsanalysen wurde festgestellt, dass hierbei alle Tyrosinreste eine unabhängige Funktion in der Tumortransformation einnehmen: Y2, Y4 und Y5 agieren in diesem Zusammenhang über Ras Y3 operiert unabhängig von Ras (Dankort et al., 2001a).

Der Heterodimerisierungspartner von ErbB2 in Brustkrebszellen scheint hierbei ErbB3 zu sein, denn die Überexpression von ErbB2 ist mit einer hohen Expression von ErbB3 assoziiert (Naidu et al., 1998) und erhöhte Expressionen von ErbB2 und ErbB3 sind an der Induktion von Brustkrebszelltumorstadium in transgenen Mäusen beteiligt. Außerdem wurde gezeigt, dass ErbB2 ErbB3 für die Wachstumsstimulation von Brustkrebszellen benötigt (Siegel et al., 1999; Holbro et al., 2003).

1.6.3 ErbB2: direkte Krebstherapeutika

ErbB2 als singulärer und gut zugänglicher Membranrezeptor sowie prognostisch ungünstiger Faktor wurde ein attraktives therapeutisches Target in der Krebstherapie. Monoklonale Antikörper gegen ErbB2 wie Trastuzumab und Pertuzumab waren unter den ersten und erfolgreichsten direkten Krebstherapeutika (Hynes and Lane, 2005). Trastuzumab am weitesten erprobt und für die Therapie von ErbB2-überexprimierenden Brustkrebstypen zugelassen; Pertuzumab befindet sich in der klinischen Erprobungsphase. Die beiden Antikörper unterscheiden sich in ihren Bindungseigenschaften: Trastuzumab bindet an die Domäne IV, Pertuzumab an die Domäne II des ErbB2-Rezeptors (Cho et al., 2003; Franklin et al., 2004). Pertuzumab wird aufgrund dessen eine spezielle Fähigkeit zur Blockade von

Heterodimerbildung zugesprochen, dessen klinische Realität aber fraglich ist (Hynes and Lane, 2005). Neben diesen Ektodomän-bindenden Antikörpern existieren noch Inhibitoren kleinmolekularer Tyrosinkinase (TKIs), die mit ATP um die Tyrosinkinase-Domäne konkurrieren (Hynes and Lane, 2005). Diese Therapeutika, zu denen zum Beispiel Lapatinib zählt, hemmen sowohl ErbB1 als auch ErbB2 (Hynes and Lane, 2005).

1.6.4 Nrg und Tumorgenese

Verschiedene Studien unterstreichen auch die entscheidende Rolle von Nrg1 in der Tumorgenese von Brustkrebszellen. Nrg1 β begünstigt aggressivere Phänotypen, gekennzeichnet durch Hormonunabhängigkeit, Antiöstrogenresistenz, Invasion und Metastasierung (Stove and Bracke, 2004). Obwohl der Mechanismus, durch den Nrg zur Malignität von Zellen führt, für verschiedene Zelltypen unterschiedlich sein kann, gibt es einige generelle Aspekte, die für fast alle zutreffen: Krebszellen, die abnormal Nrg1 produzieren, benutzen dies meist auf eine autokrine Weise. Dies aktiviert ErbBR und *downstream* Signalproteine konstitutiv und resultiert schließlich in einer gesteigerten Proliferation, einer Alteration des Phosphorylierungsgrades von Regulatormolekülen des Zytoskeletts und der Modulation von Nrg-responsiven Genen. Alle diese Vorgänge können einen malignen Phänotyp fördern (Stove and Bracke, 2004).

ErbBR und Nrg scheinen in normalem Gewebe als eine gut balancierte, funktionelle Einheit zu wirken. Mesenchymales Nrg ist typischerweise ein pro-Differenzierungs- und Überlebenssignal für angrenzendes Epithel (Stove and Bracke, 2004). Eine Unterbrechung dieser Balance zwischen Differenzierung und Proliferation wie zum Beispiel durch autokrine Signalloops kann die Daueraktivierung der ErbBR bewirken, selbst wenn diese den Rezeptor nicht überexprimieren (Stove and Bracke, 2004). So wurden in Atemwegsepithelzellen ein interessanter Mechanismus der Regulation des Nrg-ErbB-Systems beschrieben: Hier ist das apikal sezernierte Nrg unter physiologischen Bedingungen von den basolateralen ErbBR abgeschirmt. Nach Verletzung von *tight junctions* der Epithelien kann Nrg lokal die basolateralen Rezeptoren aktivieren und einen autokrinen Loop erzeugen (Vermeer et al., 2003). Nrg und ErbB2 scheinen also auch in der Tumorgenese eng verwoben zu sein.

1.7 Migration, ein Kernschritt der Krebsmetastasierung

Krebsmetastasierung ist ein komplexer Ablauf aus mehreren Schritten, in dem Krebszellen sich zunächst von ihrem Muttertumor ablösen und in das umgebende Bindegewebe und Blutgefäße einbrechen (Chambers et al., 2002). Dieses Eindringen wird durch chemische Lockstoffe angetrieben, die aus Blutgefäßen diffundieren und von anderen Zellen sekretiert werden (Wyckoff et al., 2004). Eine Anzahl dieser Lockstoffe wurde identifiziert: Chemokine, Lipidmediatoren, Wachstumsfaktoren und Zytokine (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999).

1.7.1 Zellbewegung

Zellbewegung an sich, sei es physiologisch oder pathologisch, ist ein mehrschrittiger Prozess, der die Protusion des vorangehenden Zellteils, die Adhäsion an das Substrat, die Retraktion des hinteren Zellteils und schließlich die Deadhäsion umfasst. Das Vehikel dieser Migration ist das zelluläre Mikrofilamentsystem, ein Netzwerk von Proteinfibrillen, das sich aus Aktin und Aktinbindenden Proteinen zusammensetzt (Alberts et al., 2002).

1.7.2 Akteure der Zellbewegung

Damit sich eine Zelle fortbewegen kann, muss sie sich an ein Substrat anheften und Zugkraft ausüben. Diese Adhäsion erfolgt an bestimmten Stellen, an denen das Aktinzytoskelett über Transmembranrezeptoren (Integrine) an die extrazelluläre Matrix bindet. Diese Adhäsionsstellen sind aus mehr als 50 Proteinen zusammengesetzt, die Struktur-, Signal- und Adaptormoleküle beinhalten (Zamir and Geiger, 2001). Die Adhäsionsstellen können sich nach ihrer Entstehung entweder nach einigen wieder Minuten auflösen oder in größere *Focal Adhesion*-Komplexe differenzieren (Abbildung 3). Unterschiedliche Zelltypen wenden je nach Migrationsrate verschiedene Adhäsionsstrategien zur Fortbewegung an: Die schneller migrierenden Zelltypen zeigen eine größere Anzahl an *Focal Complexes* als an *Focal Adhesions* (Alberts et al., 2002).

Adhäsionsstellen sind mit Bündeln von Mikrofilamenten verbunden (*stress fibers*), die aus Aktin, Myosin und alpha-Aktinin bestehen. *Stress fibers* sind kontraktile Zugseile, die durch die Zelle verlaufen und formgebende Elemente mit der Unterlage verspannen (Abbildung 3). Durch Kontraktion der *stress fibers* wird der Schwerpunkt der Zelle zu dem jeweiligen Anhaftungspunkt verlagert. Durch das konzertierte Anhaften und Lösen von Kontaktpunkten bewegt sich so die Zelle wie auf Hunderten von Raupenfüßen, wobei die Bewegungsrichtung

durch Botenstoffe vorgegeben ist, die an Rezeptoren an der Zelloberfläche binden und eine lokale Auflockerung des Zytoskeletts bewirken. An diesen Stellen kann Aktinpolymerisation zur Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien führen, Auswüchse des Zytoplasma, die anhaften und die Zelle nach sich ziehen (Condeelis and Segall, 2003; Pollard and Borisy, 2003).

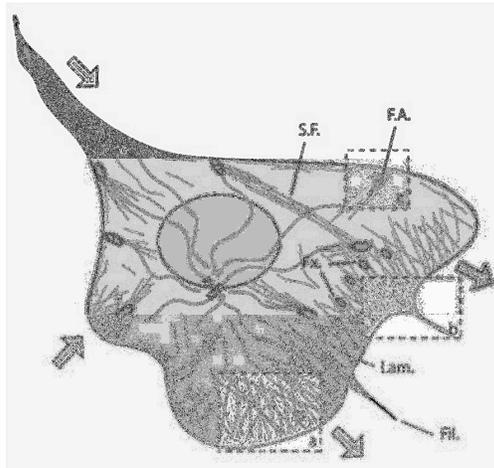


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aktinzytoskeletts in einem polarisierten Fibroblasten

Die verschiedenen Organisationsformen von Aktinfilamenten sind bildlich beschrieben: Diagonales Geflecht von Aktinfilamenten in Lamellipodien (Lam.) mit assoziierten radialen Bündeln (Filopodien, fil.); kontraktile Aktinbündel (*stress fibers*, S.F.) im Zellkörper und am Zellrand sowie ein lockeres, verstreutes Aktinnetzwerk. Die Stellen der Adhäsion von Zellen zu Substraten sind an den Enden der Aktin-*Stress-Fibers* dargestellt (Focal Complexes, Fx., und Focal Adhäsions, F.A.)

Lamellipodien und die molekulare Regulation der Zellbewegung

Lamellipodien sind aus einem Geflecht von Aktinfilamenten zusammengesetzt, das von radialen Bündeln (Mikrospikes oder Filopodien) durchbrochen ist. Während der Zellbewegung bleibt der Umfang des Aktinnetzwerks im Lamellipodium konstant. Diese Eigenschaft entsteht durch das so genannte „*treadmilling*“ von Aktinfilamenten: hierbei bleibt das Anhaften von Aktinuntereinheiten an die (+)-Enden im vorangehenden Teil des Lamellipodiums durch das Loslösen von Aktinmonomeren an den (-)-Enden der Hinterseite des Geflechts (Pantaloni et al., 2001) im Gleichgewicht (Abbildung 4). Zellen enthalten einen Pool von unpolymerisierten Aktinmonomeren, die an Profilin gebunden sind. Neue Filamente entstehen, wenn Signalwege *nucleation-promoting factors* wie die Mitglieder der WASP/SCAR Proteinfamilie aktivieren (Pollard and Borisy, 2003). Diese aktivierten *nucleation-promoting factors* regen dann den Arp2/3-Komplex an. Der Arp2/3-Komplex ist eine stabile Verbindung von zwei aktinnahen Proteinen, Arp2 und Arp3. Dieser Komplex bindet Aktin und initiiert das Anknüpfen von frischen Filamenten in einem 70° Winkel an bereits bestehenden Filamenten (Mullins et al., 1998) und fungiert somit als ein Kernstück der Aktinpolymerisation. Der Arp2/3-Komplex ist intrinsisch inaktiv und auf extrinsische Aktivatoren angewiesen. Letztere sind teilweise identifiziert worden und umfassen z.B. ActA (Welch et al., 1998) und WASP/SCAR (Machesky

and Insall, 1998). Gefüttert aus dem Pool von Aktinmonomeren wachsen rasch neue Zweige, die die Zellmembran vorwärts drücken. Jedes Filament vergrößert sich jedoch nur vorübergehend, weil *capping*-Proteine ihr Wachstum beenden (Abbildung 4). An jedem Filament bilden sich also eine Reihe von Verzweigungspunkten, und es verlängert sich ständig an seinem (+)-Ende, wogegen sein (-)-Ende stetig abgeschnitten wird; schließlich wird das Wachstum am (+)-Ende durch *capping*-Proteine beendet und das Filament langsam vollständig abgebaut (Pollard and Borisy, 2003).

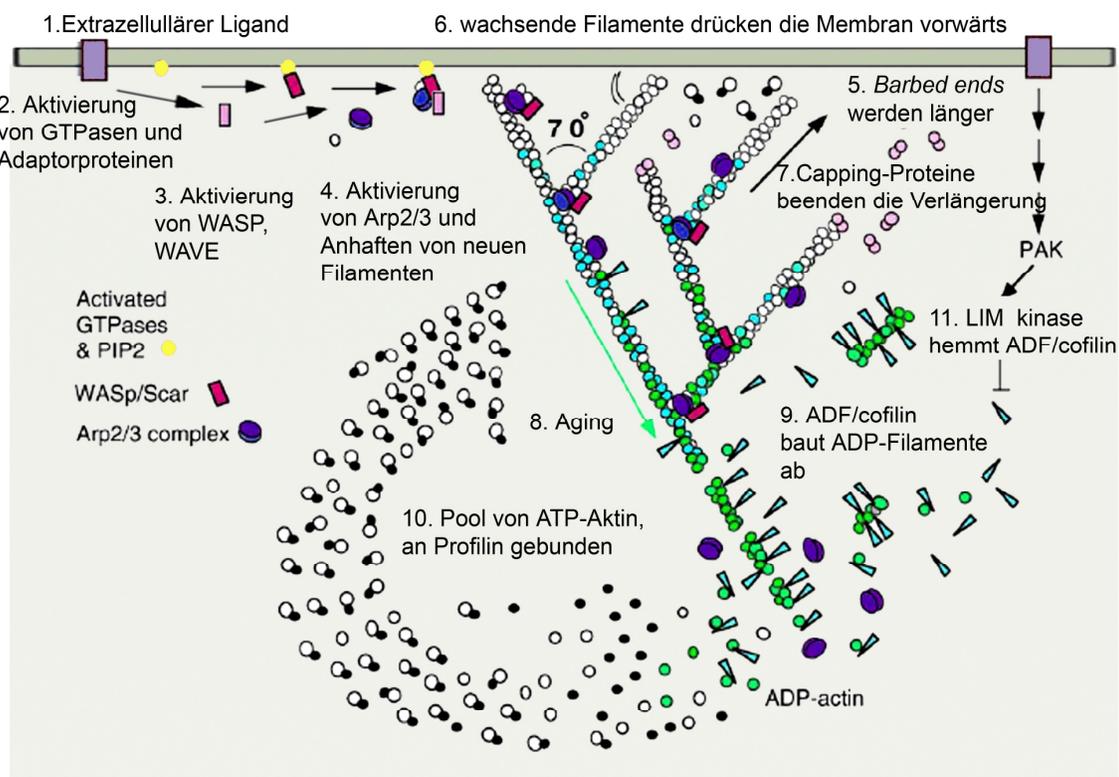


Abbildung 4: Treadmilling-Modell der Aktinnukleation und des Vorstoßens des vorangehenden Zellteils migrierender Zellen

(1) Extrazelluläre Signale aktivieren Rezeptoren; (2) über intrazelluläre Signalwege und Adaptorproteine werden (3) WASP und WAVE aktiviert, die wiederum den (4) Arp2/3-Komplex anschalten; Letzterer heftet Aktinfilamente als Abzweigung von existierenden Filamenten an; (5) die (+)-Enden werden länger und (6) drücken die vorangehende Zellmembran nach vorne; (7) Capping-Proteine beenden die Verlängerung; (8) Filamente altern durch das Umwandeln von ATP in ADP und (9) ADF-Cofilin baut ADP-gebundene Filamente ab, wobei ADF-Cofilin wiederum von (11) LIM-Kinasen inhibiert wird; abgebaute Filamente werden erneut an ATP gebunden und stehen als (10) Pool von ATP-gebundenem Aktin zur Verfügung (Pollard and Borisy, 2003).

Neben den bereits erwähnten Regulatoren sind auch die Mitglieder der Rho-Familie von kleinen GTPasen wichtige Akteure in verschiedenen Signalwegen des Aktinzytoskeletts (Abbildung 4, 27). Rac leitet die Entstehung von Lamellipodien ein, während Cdc42 für die Bildung von Filopodien zuständig ist (Hall, 1998). Außerdem wird die Transition eines *focal complex*, der mit Lamellipodien assoziiert ist, in *focal adhesions*, die in *stress fibers* lokalisiert sind, durch eine Veränderung des Signalgleichgewichts von Rac zu Rho erzielt (Rottner et al., 1999).

Das in dieser Arbeit untersuchte ErbB2-Nrg-Modul ist ein wichtiger Regulator der Zellmigration. ErbB2 fördert die Umstrukturierung des Zytoskeletts und hat eine entscheidende Funktion in der Migration von Brustkrebszellen (Marone et al., 2004). Nrg1 ist ein bedeutender pro-migratorischer Botenstoff. Die Stimulation von non-invasiven Brustkrebszellen mit Nrg1 und die konsekutive Phosphorylierung von ErbB2 verstärkt die Umrüstung von Aktin zu filamentärem Aktin und die Ausbildung von *membrane ruffles*, *stress fibers*, Filopodien, Lamellipodien: Dies wird von einer verstärkten Zellwanderung begleitet (Adam et al., 1998). Diese merklichen durch Nrg1 induzierten Veränderungen werden von starken Veränderungen im Phosphorylierungsstatus mehrerer Proteine begleitet, die in *focal adhesions* lokalisiert sind. Letztere dienen als Verankerungspunkte für *stress fibers* und als Integrin-vermittelte Interaktionsstellen mit der extrazellulären Matrix (Stove and Bracke, 2004).

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Relevanz der im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe identifizierte Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 in menschlichen Zellsystemen zu überprüfen; anschließend wurde die Rolle des an ErbB2 intrazellulär bindenden Adaptorproteins in durch das Nrg1 β -ErbB2 Signalssystem induzierten zellulären Antworten untersucht. Objekt der Untersuchungen war hierbei die Brustkrebszelllinie T47D, die endogen sowohl Nck2 als auch ErbB2 exprimiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Zellkultur-Materialien und Geräte

Die nachfolgend aufgeführten Materialien wurden zur Erstellung der Arbeit verwendet.

Material	Hersteller
8-well Objektträger	BD Falcon
AG 825	Calbiochem
Alexa 565 Phalloidin	Molecular Probes (Invitrogen)
Aprotinin	Roche
Autoklave	SYSTEC
Bradford Reagenz	Bio-Rad
BSA	Sigma
DAPI	Molecular Probes
DMEM	Biochrom AG
DMSO	Sigma
ECL	Amersham Biosciences
EDTA	Merck
Elektrophorese System	Bio-Rad
ELISA-reader	Bio-Rad (Benchmark Plus microplate photometer)
FCS	Biochrom AG
Glycerol	Merck
HEPES	Gibco
Lipofectamine Plus	Invitrogene
MgCl ₂	Merck
Mikroskop	Leica
Mikroplatten Spektrophometer	BioRAD
Mounting Medium	Mobiglow
NaCl	Roth
NaF	Merck
Natriumorthovanadat	Merck
Natriumpyrophosphat	Merck
NGF	Promega
Nitrozellulosemembran	Ge Helthcare
Nrg1 β (Heregulin β)	RDI Research Diagnostics, Inc.
PBS	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
PFA	Roth
Phenylarsinoxid	Sigma
Photoentwicklungsgerät	AGFA (Curix 60)
Photometer	Bio-Rad
PMSF	Merck
Protein-G-Sepharose	Amersham Biosciences
Rattenschwanzkollagen	Roche
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	GE Healthcare
Semi dry elctro blotter	Bio-Rad

Spincap tubes	Pierce
Triton X	Sigma
Trypsin-EDTA	Biochrom AG
Tween 20	Sigma
WST-Reagenz	Roche
Zellkulturschalen/ -material	TPP
Zellkulturschrank	Thermo Forma
Zwei-Kammer-Migrationssystem	Corning Costar

2.1.2 Antikörper

Antikörper	Verdünnung Western/ IP	Verdünnung Immuno- fluoreszenz	Hersteller	Katalog- nummer
Primäre Antikörper				
Polyklonaler anti-FLAG	1:500	-	Sigma- Aldrich	F7425
Monoklonaler anti-FLAG	1 :500	-	Stratagene	200471
Anti-Nck2 V14	1:500/ 1:200	-	Santa Cruz	Sc-22508
Anti-Nck2 Ab 8.8	1 :500/1 :200	1:100	Santa Cruz	Sc-36018
Polyklonaler Anti-Nck2	1:500/1:100	-	Upstate Bio- technology	07-100
Polyklonaler Anti-ErbB2 Ab-8	1:1000/1:100	1 :200	Neomarkers	MS-325-P
Monoklonaler Anti-ErbB2 Ab-2	1 :1000/ 1 :100	1 :200	Neomarkers	MS-229-P
Polyklonaler Anti-Phospho- HER2/ErbB2 (Tyr 1248)	1:1000	-	Cell Signaling	2247
Anti-PhosphoSer473Akt	1:1000	-	Cell Signaling	9271
Polyklonaler Anti-Phospho Thr308 Akt	1:1000	-	Cell Signaling	9275
Polyklonaler Anti- Phospho(Thr202/Tyr204) p42/44 MAPK	1:1000	-	Cell Signaling	9101
Polyklonaler Anti-Phospho	1:1000	-	Cell Signaling	9211

p38MAPK				
Polyklonaler Anti-Phospho SAPK/JNK	1:1000	-	Cell Signaling	9251
ErBB3/HER-3 Ab6 (Clone 2B5) Mouse monoclonal Antibody	1:200	-	Neo Markers	Ab6
ErbB4 (C-term) Rabbit polyclonal Antibody	1.100-1:500	-	ABGENT	5671
ErbB-4 (C-18) rabbit	1 :500/ 1 :200	-	Santa Cruz	Sc-36018
Sekundäre, immunofluoreszenz markierte Antikörper				
Anti-Maus-IgG, Meerrettichperoxidase-gekoppelt (vom Schaf)	1:10000	1:5000	GE Healthcare	
Anti-Kaninchen IgG, Meerrettichperoxidase-gekoppelt (von der Ziege)	1:10000	1:5000	Calbiochem	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Zellkultur

Die Zelllinie der menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) wurden von Prof. A. Ullrich, Max Planck Institut München, zur Verfügung gestellt. Die SKBR3-Zelllinie stammen von der DMRZ. Die humane Brustkrebszelllinie T47D wurde vom Max Planck Institut für Molekulare Genetik zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C im CO₂-Inkubator (5%) in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium, das mit 10% fetalem Kälberserum, 50 µg/ml Streptomycin sowie 50 U/ml Penicillin ergänzt wurde. Bei etwa 80-90% Konfluenz wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS kurz gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung für die benötigte Zeit bis zum

Ablösen inkubiert. Wenn nötig, wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Für die Experimente wurde darauf geachtet, dass alle Zellen etwa die gleiche Passagenummer haben.

Zum Zurückfrieren von Zellstocks wurden Zellpellets in FCS/10%DMSO resuspendiert und in Kryo-Röhrchen in einem Isopropanolbad bei -80°C eingefroren. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden die Cryo-Röhrchen rasch bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Medium pipettiert.

Transiente Transfektion

HEK293-Zellen

Für die Transfektion der Zellen wurde das *Lipofectamine Plus Reagenz* verwendet, das auf dem Prinzip der Komplexierung von DNA mit polykationischen Lipid-Partikeln beruht. Dann wurden am Tag vor der Transfektion 3,000,000 HEK293-Zellen auf mit Polylysin beschichteten 15cm-Zellkulturschalen ausgesät. Für die Transfektion wurden $4\mu\text{g}$ Plasmid-DNA in $100\mu\text{l}$ serumfreiem und antibiotikafreiem DMEM-Medium verdünnt und $20\mu\text{l}$ *Plus Reagenz* hinzugegeben. $20\mu\text{l}$ Liposomen-Reagenz (Lipofectamine) wurden in $480\mu\text{l}$ DMEM-Medium gelöst. Nach 5min wurden beide Ansätze gemischt und für 20min zur Bildung der DNA-Lipid-Komplexe inkubiert. Die Mischung wurde anschließend direkt auf die Zellen gegeben, und nach 3h wurde das Transfektionsmedium gegen das Vollmedium ausgetauscht. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurde das Vollmedium gegen serumfreies Medium ersetzt; nach weiteren 48 wurden die Zellen für die Stimulationsexperimente eingesetzt.

T47D-Zellen

Die Transfektion der T47D-Zellen erfolgte nach dem gleichen Protokoll, wobei $4\mu\text{g}$ Plasmid DNA, $20\mu\text{l}$ *Plus-Reagenz* und $20\mu\text{l}$ Liposomen-Reagenz eingesetzt wurden. Die Transfektionseffizienz wurde durch Einbau eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in die Transfektionskonstrukte visualisiert. Die Transfektionseffizienz wurde durch Auszählen unter dem Mikroskop kontrolliert und lag ungefähr zwischen 65 und 70%.

Chemotaktischer Transwell-Migrations-Assay (Boyden Chamber)

Um die Migration der Zellen zu testen, wurden chemotaktische Transwell-Migrations-Assays durchgeführt. Diese basieren, wie schematisch in Abbildung 5 gezeigt, auf einem Zwei-Kammer Kultur-System, bei dem die beiden Kammern durch eine poröse, innen mit einer künstlichen

extrazellulären Matrix beschichteten Membran getrennt sind (6,4 mm, 8 µm Porendurchmesser, Corning Costar). Die Unterseite der Membran wurde mit 50µl 25µM Rattenschwanzkollagen-I beschichtet. Die Zellen wurden daraufhin für 24 h in serumfreien Medium gehalten und dann 120,000 Zellen/Well in 300µl serumfreien Medium in die obere Kammer ausplattiert. In die untere Kammer wurde entweder serumfreies Medium mit, oder serumfreies Medium mit 1nM Nrg1β gegeben. Die Ansätze wurden weitere 24 h inkubiert. Die nicht migrierten Zellen auf der Oberseite der Membran wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Dann wurden die restlichen Zellen für 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit 4% Paraformaldehyd in PBS (ca. 600 µl/Well) fixiert und permeabilisiert. Die Färbung erfolgte für 30 sec mit 200ng/ml DAPI. Pro Ansatz wurden fünf Felder bei 20-facher Vergrößerung ausgezählt und die Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Um die Migration nach Zugabe des ErbB2-Inhibitors AG825 zu messen, wurden die Zellen 30min lang mit dem Inhibitor (25µM) vorbehandelt.

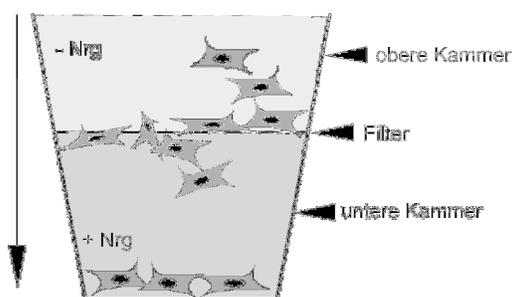


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zweikammer-Transwellmigrationsassays

In dem Zwei-Kammer Kultursystem sind die obere und untere Kammer durch eine poröse Membran getrennt. Letztere ist innen mit einer künstlichen extrazellulären Matrix beschichtet. In der oberen Kammer befindet sich serumfreies Medium, in der unteren das Testmedium.

Proliferations-Assay

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens von Zellen wurde der kolorimetrische WST-1 Zellproliferations-ELISA eingesetzt, dessen Prinzip auf der Spaltung des Tetrazolium-Salzes WST-1 durch die mitochondriale Dehydrogenase beruht. Durch die Spaltung von WST-1 entsteht der Farbstoff Formazan, der spektrophotometrisch in einem ELISA-reader quantifiziert werden kann. Die Menge des gemessenen Farbstoffs korreliert dabei direkt mit der Menge der lebenden Zellen. 72 h nach der Transfektion wurden 10,000 Zellen in Triplika in eine 96-well Zellkulturplatte ausgesät. Den Zellen wurde über Nacht das Serum entzogen; am nächsten Morgen wurden sie mit 1nM Nrg1β über 24 h stimuliert. Danach wurden die Zellen mit 10µl WST-1 Reagenz für 2 h im Brutschrank inkubiert. Die Absorptionsrate wurde danach in einem Mikroplatten-Spektrophometer bei 450nm/600nm gemessen.

Indirekte Immunfluoreszenz

Die zelluläre Lokalisation von Proteinen kann durch die indirekte Immunfluoreszenz untersucht werden. Dazu werden Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine eingesetzt. Diese Antikörper werden dann von sekundären fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert und somit sichtbar gemacht. Die Benutzung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Cy2 (grüne Emission), Rhodamin (rote Emission) und DAPI (blau fluoreszierender, in die DNA interkalierender Farbstoff) erlaubt eine Mehrfachfärbung und somit die gleichzeitige Darstellung mehrerer Strukturen in derselben Zelle.

Zur morphologischen Untersuchung von T47D Zellen wurden 8-well-Objektträger mit 25µg/ml Rattenschwanzkollagen beschichtet. Auf diesen wurden dann 30,000 Zellen ausgesät. Nachdem die Zellen 2 h lang adhärirt hatten, wurden die sie über Nacht in serumfreiem Medium gehalten. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 30 min lang mit 1nM Nrg-1β stimuliert und danach kurz mit PBS abgespült. Die Fixierung erfolgte mit 3% Paraformaldehyd gelöst in PBS für 15 min bei RT. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit 0,1% Triton-X in PBS für 1 min permeabilisiert. Für die Aktinfärbungen wurden die Proben danach für 15 min mit Alexa565-Phalloidin inkubiert. Für die Nck2 und ErbB2 Färbungen wurden die Proben 60 min lang mit 5% BSA in PBS/0,1% Triton-X blockiert. Danach wurden sie über Nacht mit dem primären Antikörper in PBS/Triton-X verdünnt bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde nach dreimaligem, fünfminütigem Waschen mit PBS der sekundäre, fluochrommarkierte Antikörper hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei RT erfolgte ein erneutes Waschen mit PBS. Anschließend wurden bei allen Proben die Zellkerne 1 min lang mit DAPI angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Plastikkammern entfernt und die Objektträger mit PBS-gepuffertem Einschlussmedium gedeckelt und 2 h bei RT getrocknet. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde bei 200-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, CTR MIC) aufgenommen, das mit einer digitalen Farbkamera (Leica) ausgerüstet war. Alle Bilder wurden zur weiteren Bearbeitung in Adobe Photoshop importiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

Stimulation der Zellen

HEK 293-Zellen

Die transfizierten HEK 293 Zellen wurden vor der Stimulation für 24 h in serumfreiem Medium gehalten. Die Stimulation erfolgte 10 min lang bei 37°C mit 50ng/ml NGF unter Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors Phenylarsinoxid (1µM).

T47D und SKBR3-Zellen

Den Zellen wurden vor der Stimulation 24 h lang in serumfreien Medium gehalten und danach— je nach Experiment—15, 30, oder 60 min mit 1nM Nrg1-β unter Zusatz von 1µM Phenylarsinoxid stimuliert.

Herstellung von Zellysaten und Extraktion von Proteinen

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen nach der Stimulation zweimal mit PBS gewaschen, trocken gesaugt, und in Zellkulturschalen auf Eis gestellt. Danach wurde zu den HEK293 500µl, zu den T47D Zellen 100-2000µl Lysis-Puffer gegeben, wobei die zugegebene Menge sich nach der Größe der Zellkulturschalen richtete. Der Lysis-Puffer war mit Protease-Inhibitoren angereichert (Lysis-Puffer: 50mM HEPES pH 7,5, 50mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 5% Glycerol, 1% Triton-X; Protease-Inhibitoren wurden in folgender Endkonzentration hinzugefügt: 1mM NaF, 1mM Natriumorthovanadat, 10nM Natriumpyrophosphat, 1mM PMSF, 10µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Leupeptin). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 4°C lysiert. Das Lysat wurde anschließend durch 10-minütige Zentrifugation bei 14,000 rpm und 4°C geklärt. Der Überstand wurde als Zellextrakt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach der Bradford Methode bestimmt.

Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

10µl der Proteinprobe wurden 1:10 in H₂O verdünnt und mit 200µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Lösung wurde innerhalb von 15min photometrisch bei 595nm gemessen. Zur Proteinbestimmung diente eine Proteineichreihe, die mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt wurde.

Immunopräzipitation

Zur Immunopräzipitation wurden 300µl Zellysat mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer gemischt (HNTG-Puffer: 20mM HEPES, 50mM NaCl, 10% Glycerol, 0,1% Triton-X-100, Proteininhibitoren wie beim Lyse-Puffer). Das Gemisch wurde mit den Antikörpern in entsprechenden Endkonzentrationen 2 h lang bei 4 °C inkubiert. Die Protein-G Sepharose wurde 5 Mal mit HNTG Puffer gewaschen; die freien Bindungsstellen wurden mit einprozentigem, in HNTG-Puffer gelöstem BSA bei 4 °C für 2 h blockiert. Zu den Lysaten wurde jeweils 50µl 50%-ige Sepharose-Suspension gegeben und das Gemisch bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Proben in *spin cap tubes* überführt, bei 3000 rcf für 1 min bei 4°C zentrifugiert und mit HNTG-Puffer gewaschen. Der Vorgang wurde 4 Mal wiederholt. Die an die Protein-G Sepharose gebunden Proteine wurden durch 5-minütiges Kochen in 30µl 4x SDS-Ladepuffer unter der Zugabe von DDT gelöst. Der Überstand wurde dann durch SDS-PAGE aufgetrennt.

SDS-PAGE nach Laemmli

Für die vertikale Elektrophorese wurden diskontinuierliche Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel verwendet. Es wurde zunächst das Trenngel gegossen und dessen Polymerisation das Sammelgel darauf gegossen. Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die proteinhaltigen Proben wurden im Verhältnis 4:1 mit 4-fachem Probenpuffer unter der Zugabe von DDT als reduzierendem Agenz gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120V. Als Referenz wurde ein Proteinmarker mit definierten Proteingrößen aufgetragen. (Trenngellösung (10prozentig): 8,3ml Acrylamid, 9,9ml H₂O, 6,3ml 1,5M Tris (pH8,8), 250µl 10% SDS, 250µl 10%APS, 20µl TEME; Sammelgellösung (10ml): 1,3ml Acrylamid, 6,0ml ddH₂O, 2,5ml 0,5M Tris (pH 6,8), 100µl 10% SDS, 100µl 10% APS, 20µl TEMED; Laufpuffer (10fach): 0,25M Tris (pH8,8) , 1,92M Glycin, 1% SDS; 1X Laufpuffer: 1 Vol 10X Laufpuffer, 9Vol ddH₂O; SDS-Ladepuffer (2fach): 100mM Tris (pH6,8), 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerol, 200nM Beta-Mercaptoethanol).

Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden nach der Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel nach dem Semi-Dry-Verfahren für 40 min mit Hilfe eines Trans-Blot SD *semi-dry electro blotter* bei einer Stromstärke von 100mA/Blot auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Zum immunohistochemischen Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden die

freien Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation bei RT mit Blockierungs-Puffer (5% Magermilchpulver oder BSA in TBS-T; TBS-T: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem jeweiligen in Blockierungs-Puffer verdünnten primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Membran in TBS-T-Puffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit den entsprechenden Meerrettich-Peroxydase-gekoppelten sekundären Antikörpern. Danach wurde die Membran 3 Mal in TBS gewaschen. Die gebundenen Protein-Antikörper-Komplexe wurden anschließend mit einem ECL-Detektionssystem detektiert und durch Belichtung eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und die Daten mit dem Softwareprogramm ImageJ ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Phosphorylierungsabhängige Interaktion von Nck2 mit ErbB2 in menschlichen Brustkrebszellen

3.1.1 Überexpressionsstudien

In dieser Arbeit wurde zunächst die in der Hefezelle neu identifizierte Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 in einem Säugetierzellmodell überprüft. Dies ist unter anderem aufgrund der verschiedenen zellulären Milieus in Säugetierzellen und Hefezellen und deren unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen essentiell.

Hierzu wurde die humane Nierenepithelzelllinie HEK293, die endogen lediglich ein niedriges ErbB2 Expressionsniveau hat, jedoch aber Nck2 exprimiert, transient mit Nck2 sowie mit einem TrkA-ErbB2 Fusionsprotein ko-transfiziert. Die Konstrukte wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (DiCesare, 2001). Das TrkA-ErbB2 Fusionsprotein besteht aus der extrazellulären Domäne von TrkA, das den NGF-Rezeptor enthält, und der intrazellulären Domäne von ErbB2 (Abbildung 6), wobei die transmembrane Domäne von ErbB2 an die extrazelluläre Sequenz von TrkA fusioniert ist (Sachs et al., 1996; Keitel et al., 2008). Dieses Hybridkonstrukt kann durch den TrkA Bindungspartner NGF aktiviert werden; dies erwirkt die Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste durch die ErbB2-Kinasestelle (Sachs et al., 1996; Keitel et al., 2008). Als Negativkontrolle wurde außerdem ein Konstrukt verwendet, das eine Punktmutation im Aktivitätszentrum der Kinase an der Stelle K758A führt (Kin.def.ErbB2) (für detaillierte Beschreibung der Generation der Mutante siehe: (DiCesare, 2001; Keitel et al., 2008) Zur Erhöhung der Spezifität der Detektion der Interaktion wurde für das Nck2-Konstrukt ein mit FLAG markierter Vektor eingesetzt.

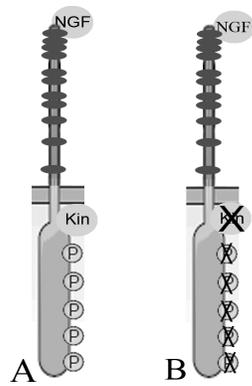


Abbildung 6: Schematische Darstellung der TrkA-ErbB2 Fusionsproteine

Das TrkA-ErbB2 Fusionsprotein besteht aus der extrazellulären Domäne von TrkA, das den NGF-Rezeptor enthält, und der intrazellulären Domäne von ErbB2, wobei die transmembrane Domäne von ErbB2 an die extrazelluläre Sequenz von TrkA fusioniert ist. Dieses Hybridkonstrukt kann durch den TrkA Bindungspartner NGF aktiviert werden; dies erwirkt die Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste durch die ErbB2-Kinasestelle (A). Es wurde ausserdem ein Konstrukt verwendet, das eine Mutation in der Kinasestelle enthält (B).

Zur Aktivierung des intrazellulären ErbB2-Anteils des Konstrukts wurden die Zellen nach der Transfektion mit NGF stimuliert. Für die anschließende Koimmunpräzipitation wurden die Zellysate zunächst mit einem anti-ErbB2 Antikörper inkubiert und das Präzipitat mit einem FLAG-Antikörper detektiert (Abbildung 7). Exogenes Nck2 koimmunpräzipitierte mit dem phosphorylierten TrkA-ErbB2 Hybridrezeptor, wobei keine Interaktion mit dem Kinase-mutierten Rezeptorkonstrukt festgestellt wurde (Abbildung 7). Diese phosphorylierungsabhängige Interaktion wurde ebenfalls beobachtet, als die Lysate mit einem FLAG-Antikörper ausgefällt und anschließend mit einem ErbB2-Antikörper detektiert wurden (Abbildung 7). Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass die im Hefesystem aufgedeckte phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 auch in menschlichen Zellen stattfindet.

A

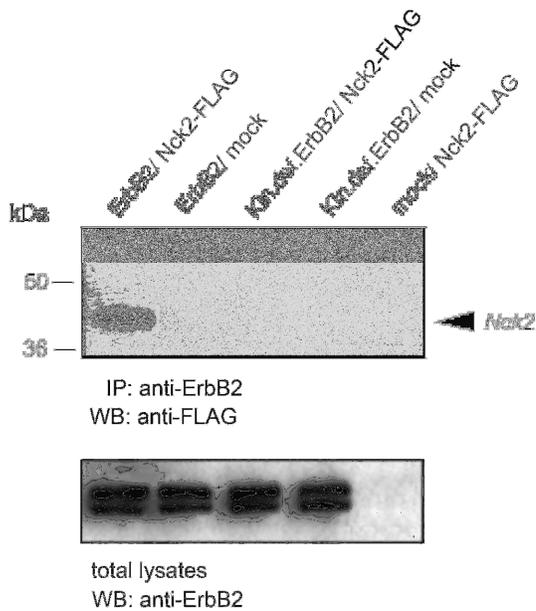
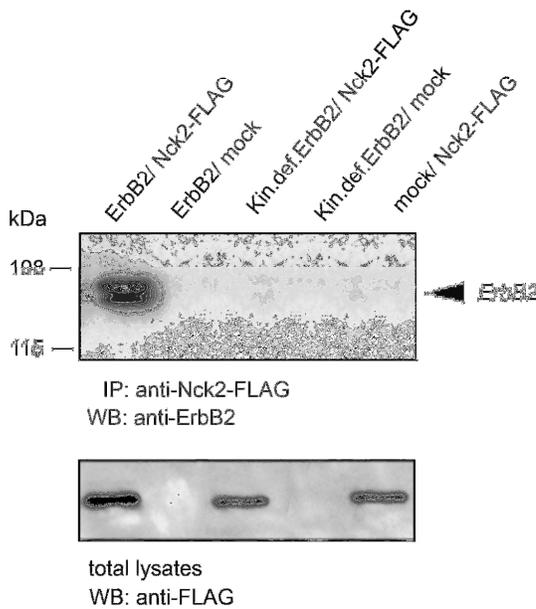


Abbildung 7: Nck2 bindet an aktiviertes ErbB2 in menschlichen Zellen

(A,B) Phosphorylierungsabhängige Interaktion von Nck2 mit ErbB2 nach Überexpression der Konstrukte in HEK293 Zellen. ErbB2- und Nck2-FLAG-cDNAs wurden in HEK293 Zellen kotransfiziert. Nck2-FLAG bindet an aktiviertes ErbB2, nicht jedoch an den Kinase-defizienten Rezeptor (Kin.def.ErbB2). (A, oben): Immunopräzipitation von ErbB2 gefolgt von einer Western-Blot Detektion von Nck2-FLAG. (B, oben): Immunopräzipitation von Nck2-FLAG, gefolgt von einer Western-Blot Detektion von ErbB2. (A und B, unten): Kontroll-Immunoblots der gesamten Zelllysate.

B



3.1.2 Endogene Koimmunpräzipitation

Um die Assoziation zwischen ErbB2 und Nck2 unter biologisch relevanteren Bedingungen zu beleuchten, wurde die durch Hefe-2-Hybrid Screens und Überexpressionsstudien gefundene Interaktion auch endogen in der humanen Brustkrebszelllinie T47D, die alle vier ErbB-Rezeptorsubtypen sowie Nck2 exprimiert, untersucht (Abbildung 8, 10). T47D Brustkrebszellen eignen sich unter anderem deshalb für eine endogene Koimmunpräzipitation, weil sie eine moderate ErbB2-Expression haben und sich ErbB2-Rezeptoren somit auf diesen Zellen mit Nrg aktivieren lassen, wobei die Rezeptoren nicht—wie zum Beispiel bei der Brustkrebszelllinie SKBR3—durch eine endogene Überexpression konstitutiv aktiv sind (Abbildung 8,9).



Abbildung 8: Expressionsprofil der verschiedenen ErbBR

Die in dieser Arbeit eingesetzte T47D-Brustkrebszelllinie wurde mittels Immunoblotting auf die Expression der verschiedenen ErbBR überprüft. Sie exprimiert sowohl EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, als auch ErbB4.

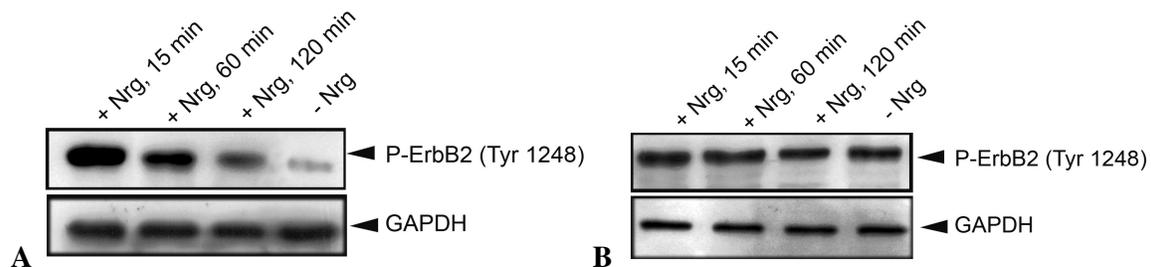


Abbildung 9: ErbB2-Phosphorylierungsniveau nach Stimulation mit Nrg1β

Subkonfluente T47D Zellen in serumfreien Medium wurden über 15, 60 und 120 min mit 1nM Nrg1β stimuliert und anschließend lysiert. Anhand eines P-Tyr ErbB2-Antikörpers wurde mittels Western-Blotting das Phosphorylierungsniveau des Rezeptors bestimmt. (A) In der verwendeten T47D-Zelllinie zeigte sich eine Steigung der Signalintensität, wobei das Maximum bei 15 min lag. (B) In den eingesetzten SKBR3-Zellen änderte sich die Signalintensität nach der Stimulation kaum. Letzteres ist höchstwahrscheinlich auf das hohe ErbB2-Expressionsniveau der Zellen zurückzuführen, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führt (Yuste et al., 2005).

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 durch endogene Koimmunpräzipitation wurden subkonfluente T47D Zellen 15 min lang mit Nrg1β behandelt, um den endogenen ErbB2-Rezeptor zu aktivieren, und anschließend lysiert; ein Teil der Zellen blieb unbehandelt. Die Immunopräzipitation der Lysate mit einem ErbB2-Antikörper gefolgt von Western-Blotting mit einem Nck2-Antikörper zeigte, dass Nck2 in T47D-Zellen mit ErbB2

assoziiert (Abbildung 10). Auch ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren besteht eine gewisse Basisaktivität des ErbB2-Rezeptors. Dies konnte bereits im Western-Blot mit Phospho-ErbB2 Antikörpern gezeigt werden (Abbildung 9). Letzteres bietet eine mögliche Erklärung für die Assoziation von Nck2 und ErbB2 unter serumfreien Kulturbedingungen.

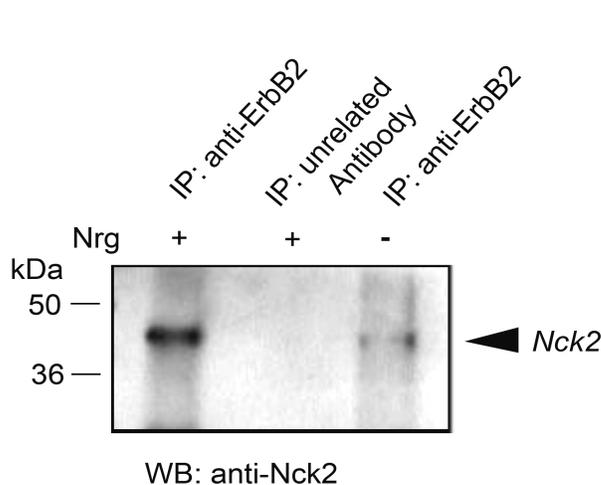


Abbildung 10:
Endogene Koimmunpräzipitation von ErbB2 und Nck2 in T47D Zellen

T47D Zellen wurden 15 min lang mit Nrg1 β stimuliert, ein Drittel blieb unstimuliert. Anschließend folgte die Präzipitation der Lysate mittels eines ErbB2-Antikörpers beziehungsweise eines FLAG-Antikörpers (unrelated antibody). Nach Detektion mittels eines Nck2-Antikörpers zeigte sich eine Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2. Die Signalstärke im Western Blot war um etwa 80% stärker, wenn die Zellen mit Nrg1 β behandelt wurden.

In dieser Arbeit wurde auch die intrazelluläre Lokalisation der beiden Interaktionspartner immunhistologisch untersucht, um die gefundene Interaktion visuell zu bestätigen. Dazu wurden T47D-Zellen mit Nrg1 β stimuliert, mit ErbB2- beziehungsweise Nck2-Antikörpern inkubiert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern angefärbt. Wie erwartet, wurde ErbB2 vor allem an der Zellmembran gefunden. Nck2 hingegen war intrazellulär ubiquitär lokalisiert mit einer Häufung im perinuklearen Anteil der Zellen. Es konnte hierbei keine Kolo-kalisation der beiden Proteine detektiert werden. ErbB2 und Nck2 scheinen jedoch im selben Zellkompartement lokalisiert zu sein. Eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen ist also theoretisch möglich, auch wenn diese nicht immunhistochemisch detektiert werden konnte. Selbst wenn diese Untersuchungen die gefundene Interaktion nicht unterzeichnen, sind die vorangegangenen Koimmunpräzipitationen doch sensitiver für die Detektion von Proteinassoziationen (Maier and Deinzer, 2005).

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass Nck2 phosphorylierungsabhängig mit ErbB2 interagiert. Darüber hinaus wird diese Interaktion sehr wahrscheinlich durch eine Aktivierung des ErbB2-Rezeptors durch Nrg1 β verstärkt und ist von physiologischer Relevanz in menschlichen Brustkrebszellen.

3.2 ErbB2-Nck2 Interaktion: Entschlüsselung der Funktion

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, handelt es sich bei ErbB2 um einen *orphan*-Rezeptor, das heißt, dass für ihn keine direkten extrazellulären Bindungspartner bekannt sind. ErbB2 wird durch Heterodimerisierung mit ErbB1, ErbB3 oder ErbB4 aktiviert (Yarden and Sliwkowski, 2001). Der in dieser Arbeit verwendete Aktivator Nrg1- β , eine Spleißvariante von Nrg1, bindet an ErbB3 und ErbB4, und löst hiernach vorwiegend eine Heterodimerisierung mit ErbB2 und dessen Aktivierung aus (Burden and Yarden, 1997). Die Stimulation mit Nrg1- β führt zu einer Reihe von zellulären Reaktionen, unter anderem zu einer verstärkten Proliferation und zur Induktion von Chemotaxis und zytoskelettalen Veränderungen. Auf molekularer Ebene aktiviert Nrg-1 β eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen und induziert die Phosphorylierung von Signalproteinen wie MAPK, Akt/PKB und FAK (Aguilar et al., 1999; Le et al., 2001; Marone et al., 2004; Kuramochi et al., 2006). Ziel dieser Arbeit war es nun, die Rolle des Adaptorproteins Nck2, und somit auch des ErbB2-Nck2 Interaktoms in der durch Nrg1 β -induzierten zellulären Reaktionen und Signalwegen zu charakterisieren.

3.2.1 Expression von dominant-negativen Nck-Mutanten

Die strukturellen Eigenschaften der Nck-Proteine verleihen diesen ihre Funktion als Adaptor in intrazellulären Signaltransduktionsketten: mit ihrer SH2-Domäne können sie an Tyrosinphosphorylierte Peptide andocken und anhand ihrer drei SH3-Domänen wiederum Proteine binden, die Prolin-reiche Sequenzen enthalten. Letztere werden somit in die Nähe von Phosphotyrosinproteinen transloziert; Nck erfüllt deshalb die Rolle als ein *second messenger*, der Rezeptortyrosinkinasen mit intrazellulären *downstream*-Signalnetzwerken verknüpft (Buday et al., 2002). Um die Funktion der Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 im Nrg1 β -induzierten *signaling* zu charakterisieren, wurden T47D-Zellen mit dominant-negativen Mutanten transfiziert. Die dominant-negativen Mutanten enthielten entweder nur die SH2- oder die SH3-Domäne von Nck2 (Abbildung 11). Eine Überexpression der SH2-Domäne sollte die Nck2-Bindungsstellen an Y3 des aktivierten ErbB2-Rezeptors absättigen sowie das Binden von endogenem Nck2 an ErbB2 und die Weiterleitung des ErbB2-vermittelte Signals an *downstream* Signalproteine verhindern. Analog dazu hat die SH3 Domäne das Potential letztere abzufangen, ohne jedoch an den ErbB2-Rezeptor binden zu können (Abbildung 11). Mit Hilfe dieser dominant-negativen Mutanten ist somit die Blockierung einer durch Nck2-vermittelte intrazelluläre Weiterleitung des Nrg1 β -induzierten ErbB2-Signals möglich. Parallel zu den Nck2 Mutanten wurden auch die entsprechenden Nck1 Mutanten untersucht, um zu beleuchten, ob die

gefundenen Effekte spezifisch für die funktionelle Einheit von Nrg1 β -ErbB3/4-ErbB2-Nck2 sind. Hierbei ist jedoch nicht auszuschliessen, dass der beobachtete Effekt durch Bindung der dominant-negativen Mutanten an andere bekannte Bindungspartner vermittelt wird. Das Expressionsniveau der Mutanten wurde nach Transfektion mittels Western-Blot überprüft und lag bei allen Transfektanten in der gleichen Grössenordnung (Abbildung 12)

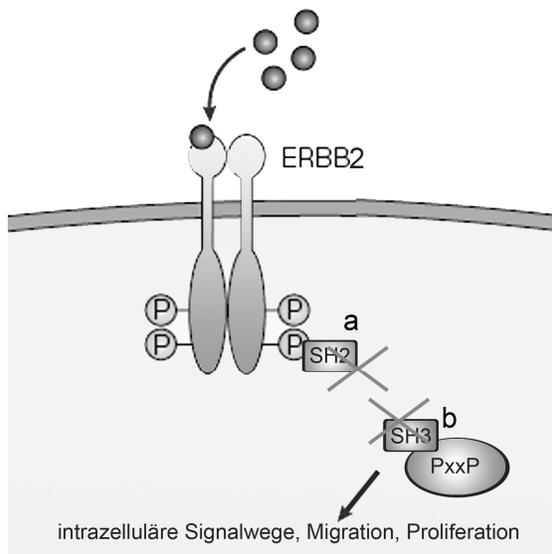


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Nck-Mutanten

Die SH2-Mutanten (a) bestehen alleine aus der SH2-Domäne von Nck-Proteinen und blockieren die Weiterleitung der Signale des ErbB2R; die SH3-Mutanten (b) vermögen Proteine abzufangen, die mit ihrer PxxP-Domäne an Nck-Proteine binden.



Abbildung 12: Kontrolle des Expressionsniveaus der transfizierten dominant-negativen Konstrukte

Vor Einsatz der transfizierten T47D Zellen für verschiedene zelluläre assays wurde das Expressionsniveau der verwendeten Konstrukte mittels eines gfp-spezifischen Antikörpers überprüft.

3.2.2 Intrazelluläres Signaling

Um die Rolle des ErbB2-Nck2-Interaktoms in zellulären Hauptsignalkaskaden zu untersuchen, wurde zunächst die Aktivierung der intrazellulären Hauptsignalwege (Akt/PKB und MAPK) durch Nrg1 β untersucht, in denen ErbB2 ein essentieller Baustein ist. Hierbei ist bekannt, dass diese Signalwege unter anderem über Ras angeschaltet werden können, das wiederum zum Beispiel über den ErbB2-Bindungspartner Shc aktiviert wird (Esparis-Ogando et al., 2002). Angesichts der Komplexität und Redundanz intrazellulärer Signalkaskaden ist jedoch neben diesem klassischen Aktivierungsweg eine Vielzahl anderer Transduktionswege vorstellbar.

Zunächst wurde die Aktivierung dieser Signalkaskaden im verwendeten Modellsystem, der T47D-Brustkrebszelllinie, untersucht. Die Zellen wurden für unterschiedlich lange Zeitintervalle inkubiert, und die resultierende Aktivierung im Western-Blot mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern gemessen. In einem zweiten Schritt wurde die Aktivierung der Signalwege in T47D-Zellen bestimmt, die mit den dominant-negativen Nck-Mutanten transfiziert wurden. Hierdurch soll die Rolle der Adaptorproteine Nck1 und Nck2 in der durch Nrg1 β -vermittelten Aktivierung der oben beschriebenen Signalwege ermittelt werden.

Nrg1 β induziert eine transiente Aktivierung des MAPK-Signalweges in T47D-Zellen

In dieser Arbeit wurde durch den Einsatz von phospho-spezifischen p42/44 MAPK-, p38 MAPK- und SAPK/JNK-Antikörpern die Aktivierung von drei Säulen des MAPK-Signalweges in T47D-Zellen untersucht (Abbildung 13).

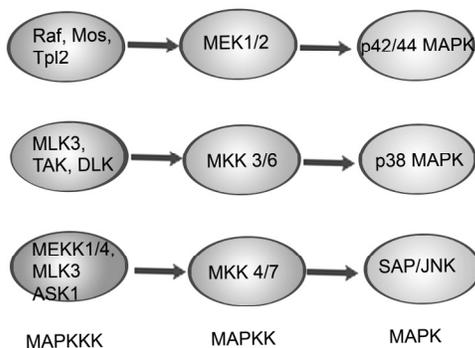


Abbildung 13: Schematische Darstellung der MAPK-Signalwege (Pearson et al., 2001)

Analog zu vorherigen Studien (Neve et al., 2002; Marone et al., 2004), führte auch eine Stimulation der in dieser Arbeit verwendeten T47D-Zellen mit Nrg1 β zu einer Aktivierung der p42/44 MAPK, p38 MAPK und SAPK/JNK-Signalwege (Abbildung 14). Bei der Immundetektion der aktivierten MAPK-Isoformen konnte eine frühe Aktivierung nach einer Inkubation der Zellen mit Nrg1 β für 5 min nachgewiesen werden; die maximale MAPK-Aktivierung wurde nach 15 minütiger Agonisten-Inkubation erreicht; Nach einer Nrg1 β -Behandlung von 1 h zeigte sich eine erhebliche Reduktion der MAPK-Aktivierung (Abbildung 14). Die Signalintensität stieg bei p42/44 MAPK etwa um den Faktor 4, bei der p38 MAPK und bei der SAPK/JNK um etwa den Faktor 4,5 an.

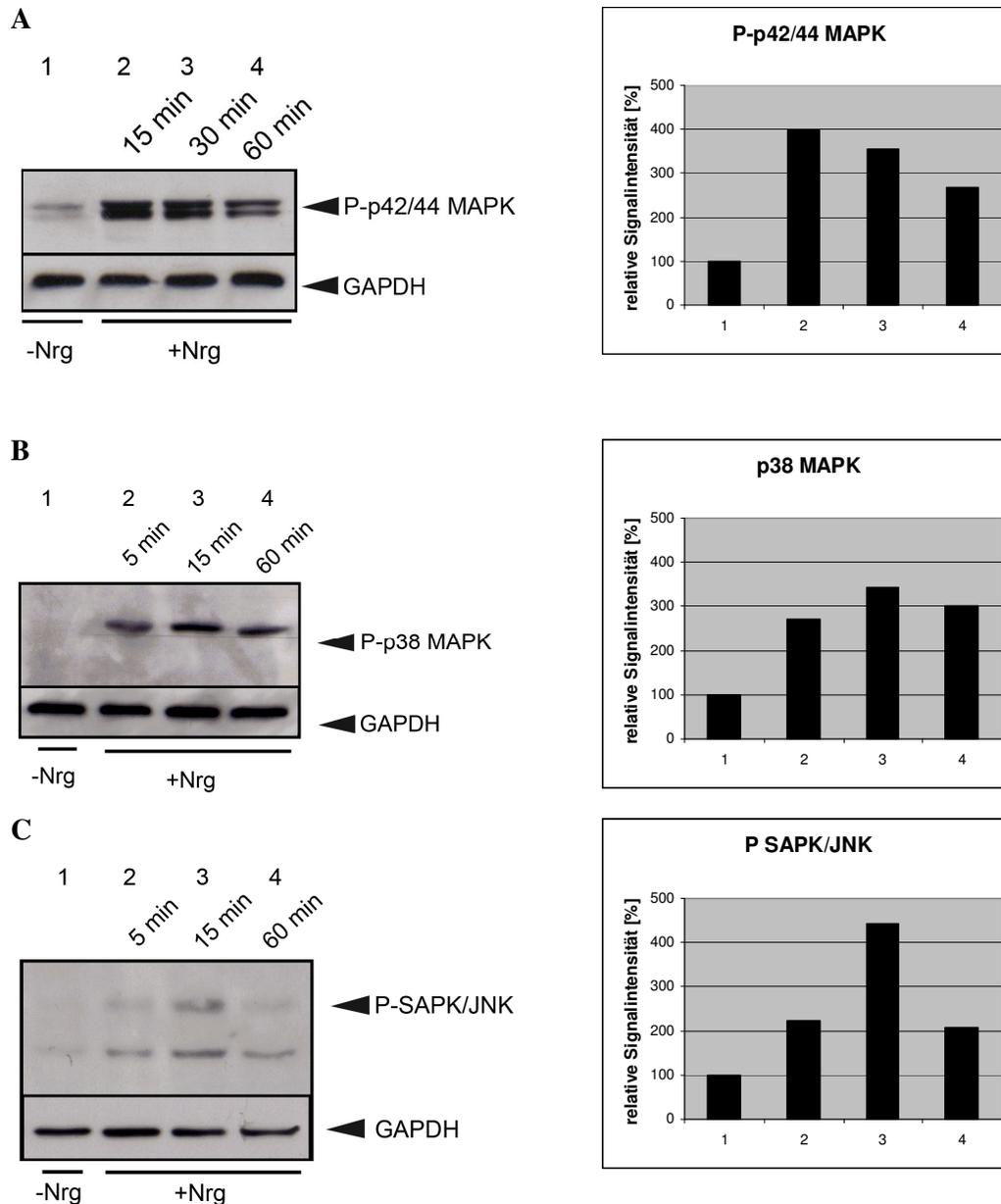


Abbildung 14: Aktivierung der MAPK-Signalwege durch Nrg1 β

T47D Zellen wurden unterschiedlich lang mit 1nM Nrg1 β stimuliert und die Lysate anschließend mit phosphospezifischen MAPK-Antikörpern untersucht. **A, links:** Western-Blot Detektion mit P-p42/44 MAPK Antikörper nach 15- (2), 30- (3) und 60-minütiger (4) Stimulation mit 1nM Nrg1 β , eine Probe blieb unstimuliert (1). **B, links:** Western-Blot Detektion mit P-p38 MAPK Antikörper nach 5- (2), 15- (3) und 60-minütiger (4) Stimulation mit 1nM Nrg1 β , eine Probe blieb unstimuliert (1). **C, links:** Western-Blot Detektion mit P-SAPK/JNK Antikörper nach 5- (2), 15- (3) und 60-minütiger (4) Stimulation mit 1nM Nrg1 β , eine Probe blieb unstimuliert (1). **A-C, rechts:** Semi-Quantifizierung der relativen Signalintensität mittels Image-J. Als Ladekontrolle wurde ein GAPDH-Antikörper verwendet.

Nrg1 β induziert eine transiente Aktivierung des Akt/PKB-Signalweges in T47D-Zellen

Im Folgenden wurde die Aktivierung des Akt/PKB Signalweges im Western-Blot mit Hilfe von phospho-spezifischen Akt-Antikörpern geprüft, wobei zwei Phosphorylierungsstellen von Akt (Thr 308, Ser 473) untersucht wurden. Akt spielt eine regulatorische Rolle in vielen zellulären Prozessen wie Apoptose und Proliferation. Analog zu den Ergebnissen für das MAPK-signaling und zu vorhergehenden Studien führte Nrg1 β zu einer Akt-Aktivierung (Neve et al., 2002), wobei das Maximum nach einer 15-minütigen Stimulation erreicht war (Abbildung 15). Die gemessenen Signale der Serin473- sowie der Threonin308-Phosphorylierungsstelle wurden in beiden Fällen um etwa das sechsfache verstärkt (Abbildung 15).

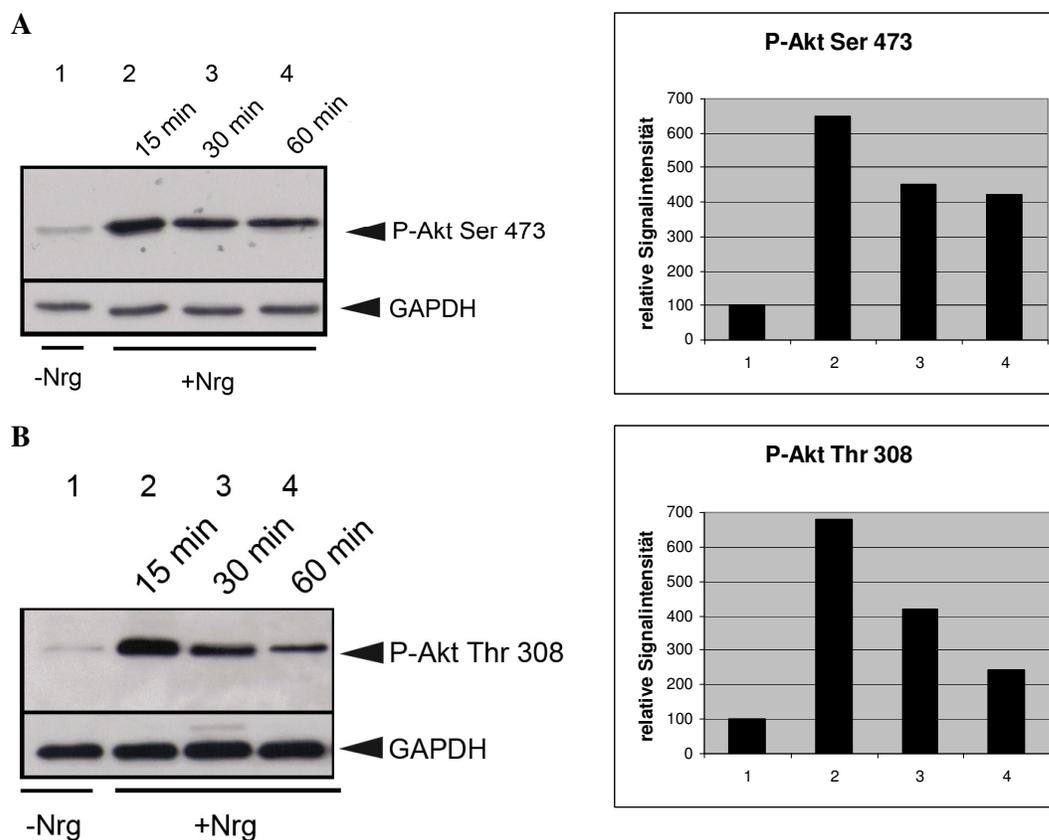


Abbildung 15: Aktivierung der Akt-Signalwege durch Nrg1 β

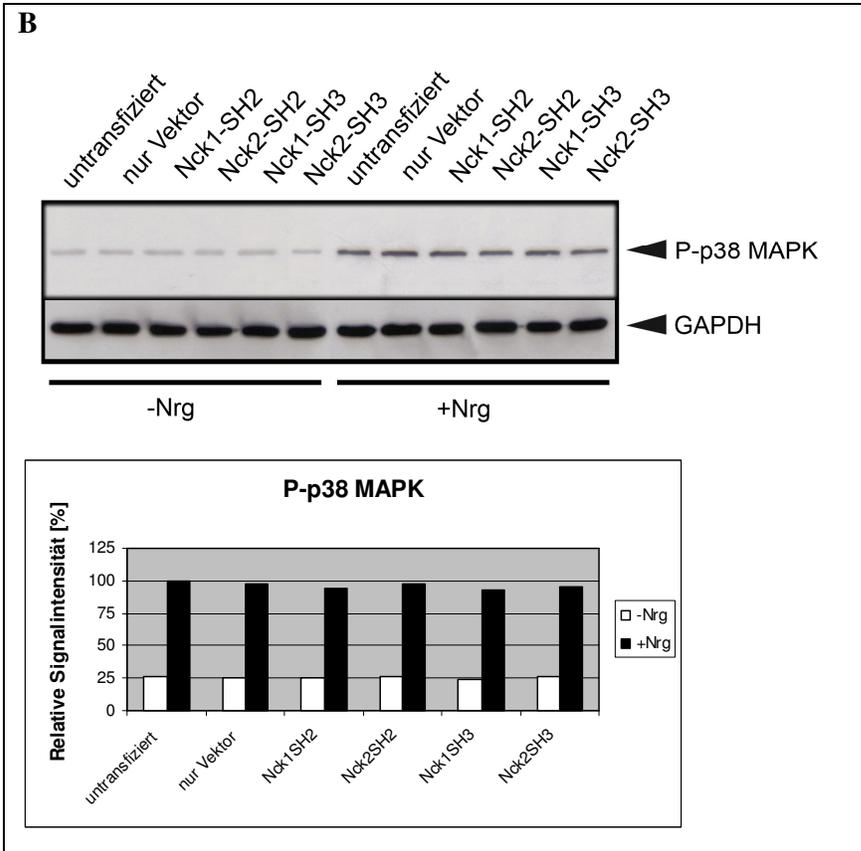
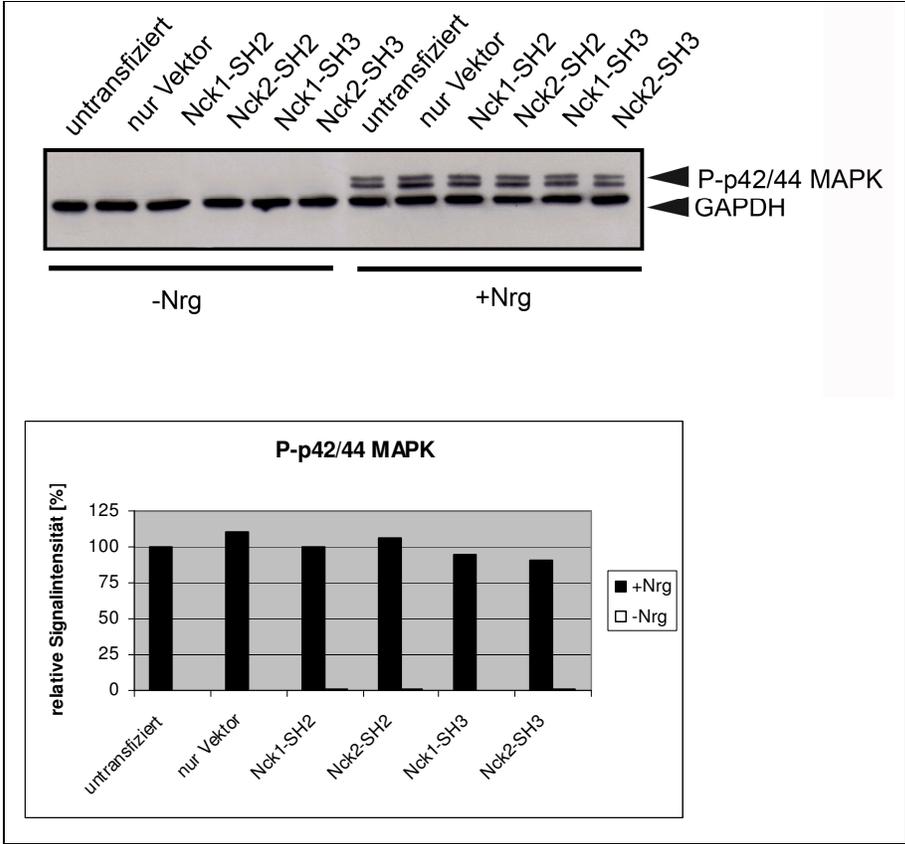
Analog zum vorherigen Versuch wurden T47D-Zellen unterschiedlich lang mit 1nM Nrg1 β stimuliert und die Lysate anschließend mit phosphospezifischen Akt-Antikörpern untersucht. **A, links:** Western-Blot Detektion mit P-Akt Ser473 Antikörper nach 15- (2), 30- (3) und 60-minütiger (4) Stimulation mit 1nM Nrg1 β , eine Probe blieb unstimuliert (1). **B, links:** Western-Blot Detektion mit P-Akt Thr308 Antikörper nach 15- (2), 30- (3) und 60-minütiger (4) Stimulation mit 1nM Nrg1 β , eine Probe blieb unstimuliert (1). **A-B, rechts:** Semi-Quantifizierung der relativen Signalintensität mittels Image-J. Als Ladekontrolle wurde ein GAPDH-Antikörper verwendet.

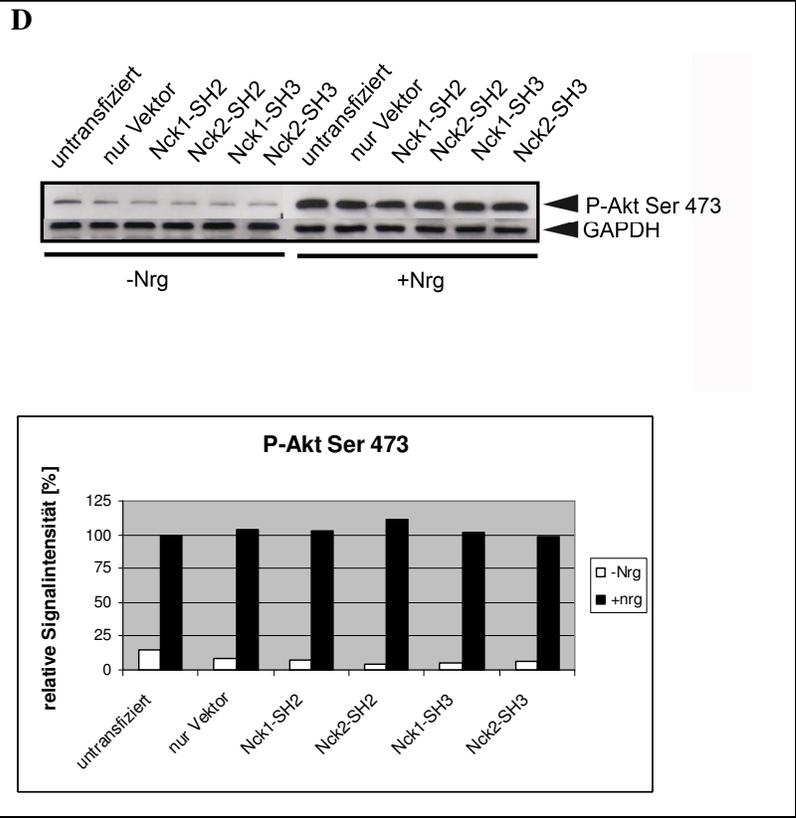
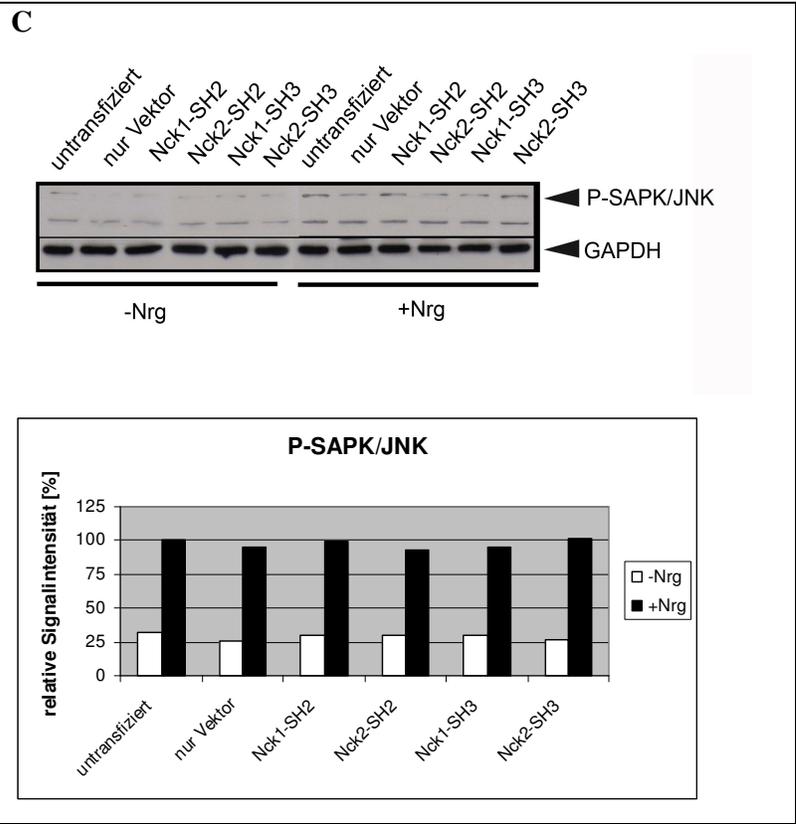
Aktivierung der MAPK und Akt-Signalwege; keine Beeinflussung durch die Nck-Mutanten

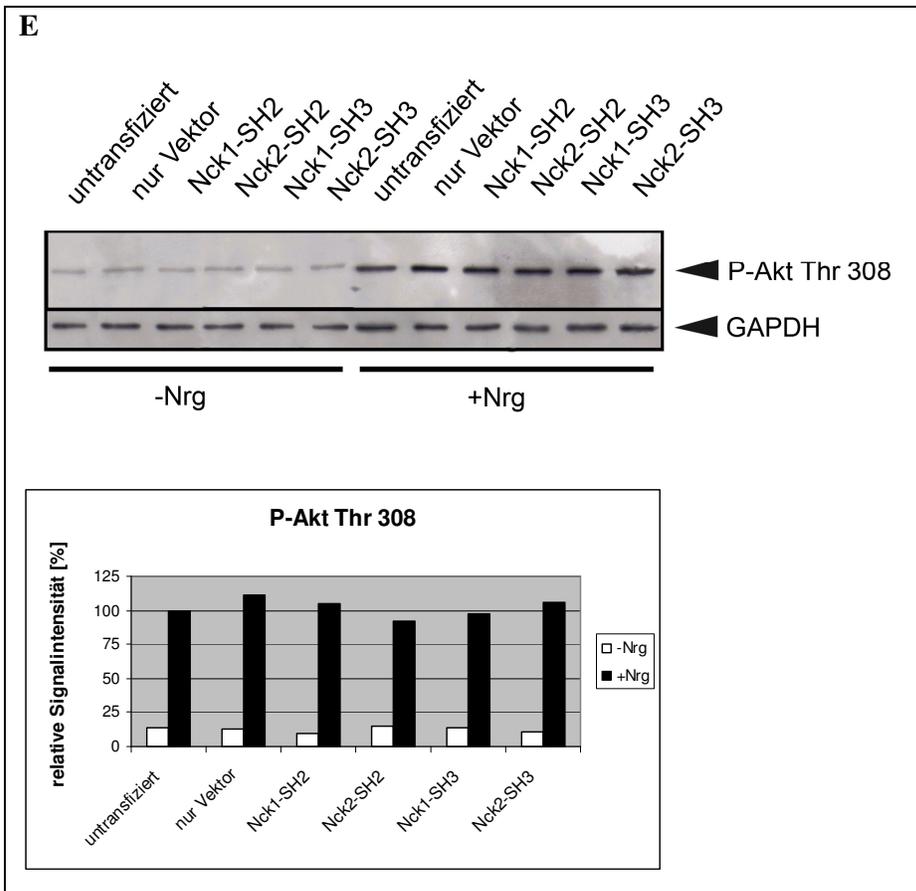
Im Folgenden wurde die Aktivierung der MAPK und Akt-Signalwege nach Transfektion mit den dominant-negativen Nck-Mutanten untersucht. Wie in Abbildung 16 gezeigt, resultierte der Einsatz der Mutanten in keiner merklichen Veränderung der Aktivierung der MAPK Signalwege. Dasselbe galt für die Akt-Signalkaskade (Abbildung 16). Beide Signalwege schienen durch die Transfektion der Nck-Mutanten weitgehend unbeeinflusst; wahrscheinlich sind weder Nck1 noch Nck2 bedeutende Regulatoren beider Kaskaden in der Übertragung des Nrg1 β -Signals.

Abbildung 16: (A-E) Aktivierung der MAPK- und Akt-Signalwege in transfizierten und untransfizierten T47D Zellen

T47D Zellen wurden mit den Nck1- bzw. Nck2-Mutanten transfiziert; ein Teil der Zellen blieb untransfiziert. Anschließend wurde die Aktivierung der p42/44-MAPK (A), p38-MAPK (B), SAP/JNK (C), Akt Thr308 (D) und Akt Ser473 (E) Signalwege nach 15-minütiger Stimulation mit Nrg1 β gegenüber unstimulierten Kontrollen untersucht. Es konnte kein merklicher Unterschied im Phosphorylierungsniveau der transfizierten gegenüber der untransfizierten Zellen festgestellt werden. Als Ladekontrolle wurde ein GAPDH-Antikörper verwendet. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Western-Blot Analyse; im unteren Teil sind die entsprechenden Semi-Quantifizierungen der Signalintensitäten mittels Image-J dargestellt.







3.2.3 Brustkrebszellmigration: vermindert in Nck-Mutantenzellen

Nrg1 β f"uhrt in verschiedenen Zelllinien, unter anderem auch in Brustkrebszellen, zu einem Anstieg der Zellmigration (Rio et al., 1997; Marone et al., 2004), wobei diese chemotaktische Zellantwort von der Aktivit"at des ErbB2-Rezeptors abh"angig ist (Spencer et al., 2000). ErbB2 ist somit ein substantieller Akteur in der durch Nrg1 β -induzierten Zellmigration. Studien deuten darauf hin, dass eine Hauptfunktion von Nck-Adaptorproteinen in der Verkn"upfung von Membranrezeptoren mit intrazellul"aren Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts besteht (Li et al., 2001). Letzteres ist Kernst"uck in einer Vielzahl von zellul"aren Reaktionen wie z.B. der Zellmigration und Chemotaxis. Es scheint also essentiell, die Rolle von Nck2 in der ErbB2-vermittelten Chemotaxis zu untersuchen.

Um diese Rolle von Nck2 in dem komplexen Zusammenspiel zu beleuchten, wurden T47D-Zellen in einem modifizierten Boyden-Chamber Assay untersucht. In diesem Experiment wurde die Migration der Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten der chemotaktischen Substanz

Nrg1 β quantifiziert (zum Versuchsaufbau siehe auch Abbildung 5). Für die statistische Auswertung wurde die Migrationsrate der mit dem leeren gfp-Vektor transfizierten, stimulierten Zellen als Referenzwert 100% gesetzt.

Migration bei Stimulation durch Nrg1 β und nach Koinkubation mit AG825

Der Einsatz von Nrg1 β im Boyden-Chamber Assay führte zu einem etwa im Mittel 6-fachen Anstieg der Migration von untransfizierten T47D Zellen gegenüber unstimulierten, untransfizierten Zellen (Abbildung 17). Wurden die Zellen mit dem Erbb2-Inhibitor AG825 koinkubiert, führte dies zu einer zirka 50-prozentigen Reduktion der migratorischen Zellantwort von 105.5% \pm 10.1% (n=3) auf 45.6% \pm 7% (n=3, p=<0.001) im Vergleich zu unbehandelten T47D Zellen (Abbildung 17). Es ist also anzunehmen, dass ErbB2 wesentlich an dem durch Nrg1 β induzierten Migrationssignal in T47D Brustkrebszellen beteiligt ist. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen einer weiteren Studie überein, in der das Migrationsverhalten von T47D Zellen untersucht wurde (Marone et al., 2004).

Einfluss der dominant-negativen Nck-Mutanten auf die Zellmigration

In einem weiteren Schritt wurde nun die Migration von mit dominant-negativen Nck1- und Nck2-Mutanten transfizierten Zellen im Vergleich zur einer Kontrolle, die nur mit dem gfp-Vektor transfiziert war, untersucht. Auch in diesen Zellen war die chemotaktische Antwort von T47D-Zellen reduziert (Abbildung 17): für die Nck1SH2-Mutante lag sie bei 34.6% \pm 18.8% (n=4, p=0.01), für die Nck2SH2-Mutante bei 30.0% \pm 13.7% (n=4, p=0.1), für die Nck1SH3-Mutante bei 39.4% \pm 9.4% (n=3, p=<0.001) und für die Nck2SH3-Mutante bei 50.4% \pm 8.0% (n=3 p=<0.001). Alle transfizierten Mutanten führten somit zu einer signifikanten Reduktion der durch Nrg1 β -induzierten und durch ErbB2-vermittelten Zellmigration, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Nck1 und Nck2-Mutanten bestand.

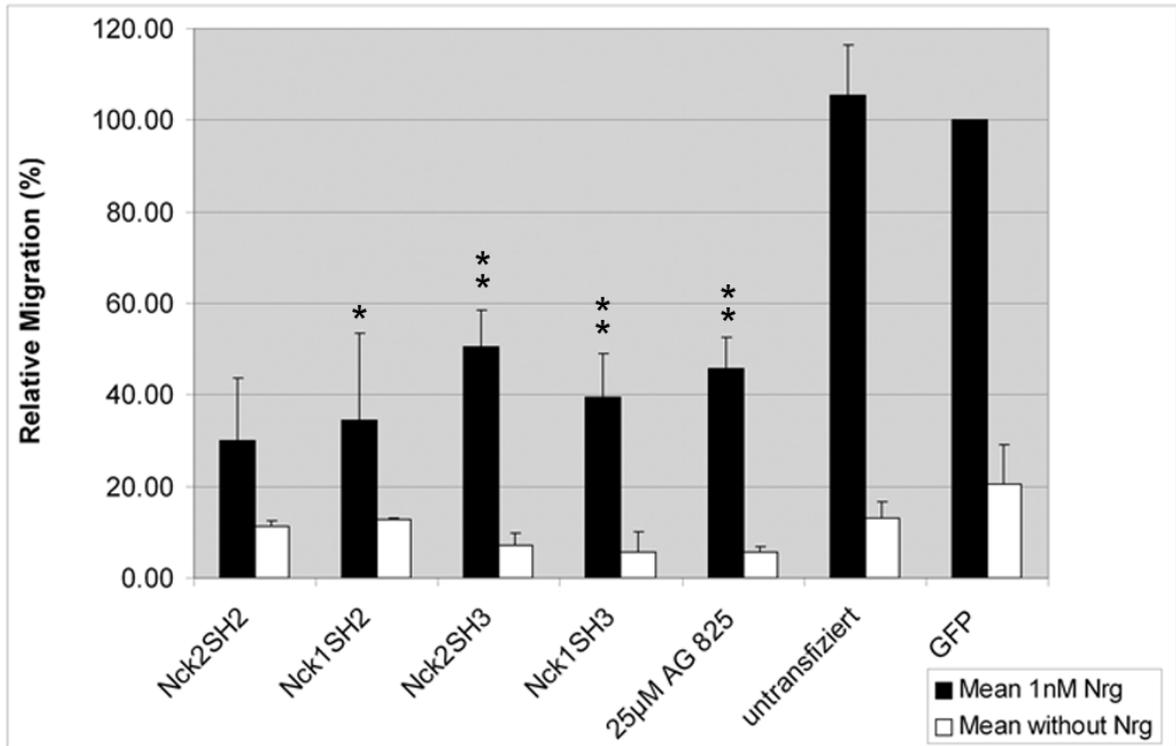


Abbildung 17: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Migrationsversuche mit T47D Brustkrebszellen

Die Grafik zeigt die Mittelwerte (\pm Standardfehler des Mittelwerts) von mindestens drei unabhängigen Versuchen dar. Die Ergebnisse sind als relative Werte zu mit gfp-transfizierten, stimulierten Zellen dargestellt (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$).

Aufgrund der Strukturanalogie von Nck1 und Nck2 und der hohen intrazellulären Konzentration der eingesetzten dominant-negativen Mutanten, wäre es theoretisch möglich, dass diese unspezifisch wirken: Nck1-Mutanten könnten unspezifisch Nck2-Bindungsstellen besetzen und vice versa, somit also fremde Signalwege blocken. Um einen solchen Effekt auszuschließen, wurden die Migrationsversuche von Mitgliedern der Arbeitsgruppe unter dem Einsatz von *siRNA* wiederholt, die jeweils zu einem spezifischen *silencing* von Nck1 bzw. Nck2 führten (Keitel et al., 2008). Auch diese Zellen zeigten eine drastische Verminderung der Nrg1 β -induzierten Migration (Abbildung 18). Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein spezifisches *silencing* von Nck1 bzw. Nck2 alleine bereits zu einer signifikanten Reduktion der migratorischen Antwort von T47D im Vergleich zu Wildtyp-Zellen führt (Abbildung 17, 18).

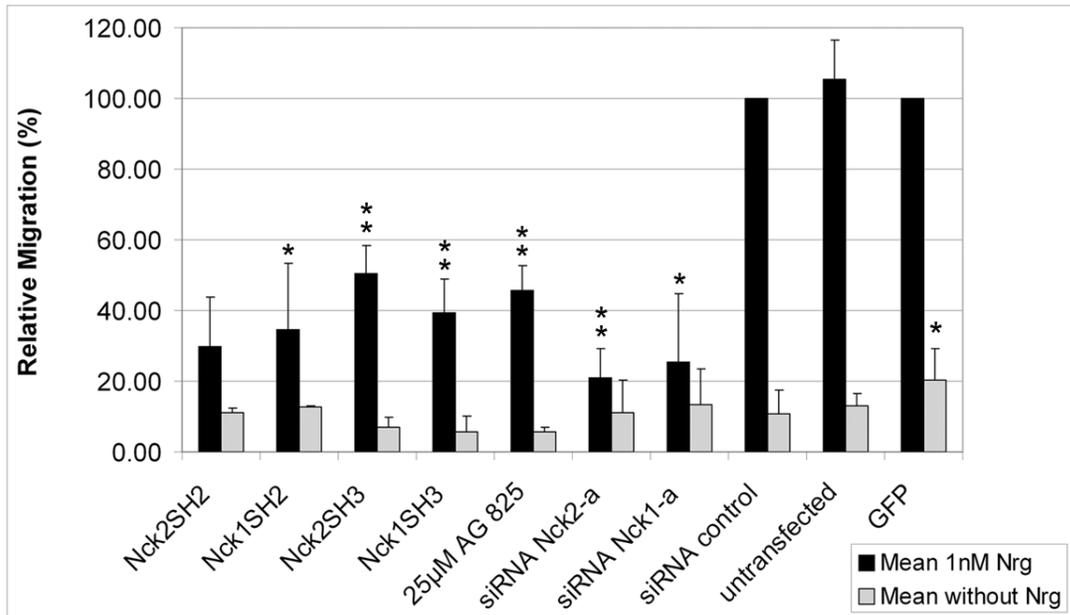


Abbildung 18: Grafische Zusammenfassung der Migrationsversuche mit T47D-Zellen, (Keitel et al., 2008).

Die Grafik zeigt die Mittelwerte (\pm Standardfehler des Mittelwerts) von mindestens drei unabhängigen Versuchen dar. Die Ergebnisse sind als relative Werte zu mit gfp-transfizierten, stimulierten Zellen dargestellt bzw mit der Kontroll-siRNA transfizierten, stimulierten Zellen dargestellt dargestellt (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$).

3.2.4 Veränderte Zellmorphologie der Nck2-Mutanten

Zellmotilität drückt sich durch eine Serie morphologischer Veränderungen aus, die auf der Umgestaltung des Zytoskeletts beruhen. Um ein mögliches morphologisches Korrelat der verminderten Migrationsrate der mit Nck2-Mutanten transfizierten T47D Zellen zu identifizieren, wurden Aktinfärbungen der Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die T47D Zellen entweder mit einem leeren gfp-Vektor oder mit den dominant-negativen Nck2-Mutanten transfiziert. Anschließend wurden diese 30min mit Nrg1 β stimuliert. Schließlich wurden die Zellen mit fluoreszenz-markiertem Phalloidin angefärbt, um deren Aktinstruktur sichtbar zu machen. Da die per FACS gemessene Transfektionseffizienz der dominant-negativen Mutanten bei etwa 75% lag, wurde ein gfp-Vektor eingesetzt, um die tatsächlich transfizierten Zellen im Mikroskop durch die GÜnfärbung sichtbar zu machen. In den eigentlichen Färbungen zeigten etwa 50% der Zellen ein grünes Signal.

Vorhergegangene Untersuchungen belegen, dass T47D Zellen, die mit Ng1 β behandelt werden, sich rasch ausdehnen und *membrane ruffles* sowie Lamellipodien formen. Initial bilden sie hierbei typischerweise Lamellipodien in alle Richtungen, bevor sie nach etwa 30 min eine stärker polarisierte Organisationsform aufzeigen, die mit der Bildung von *stress fibers* einhergeht

(Marone et al., 2004). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Wildtyp-T47D Zellen, das heißt diejenigen, die untransfiziert blieben oder nur mit einem leeren gfp-Vektor transfiziert waren, wiesen nach vorangegangener Stimulation mit Nrg1 β solche zytoskelettalen Veränderungen auf. Insgesamt zeigte sich ein stark heterogenes Gemisch konkordanter Aktinstrukturen. Diese weitspannenden morphologischen Veränderungen in Kombination mit dem recht geringen Anteil transfizierter Zellen ließen eine quantitativ-morphologische Auswertung nicht zu. Es zeigten sich jedoch gewisse qualitativ-morphologische Unterschiede zwischen den Wildtypzellen und den Mutantenzellen.

Die Wildtypzellen spreizten sich nach Stimulation mit Nrg1 β aus; sie formten Lamellipodien, die radiale Filamentbündel enthielten (Filopodien), die über den vorangehenden Zellteil hinausragen (Abbildung 19). Es konnte darüber hinaus auch die Ausbildung von *membrane ruffles* und *stress fibers* beobachtet werden, die allesamt morphologische Korrelate der Zellbewegung verkörpern. Die mit den dominant-negativen Nck2-Mutanten transfizierten Zellen formten diese Strukturen kaum (Abbildung 19-22).

Die Mutantenzellen zeigten eine kompaktere Form und schienen nicht in der Lage im gleichen Ausmaß wie Wildtyp-Zellen Membranvorstülpungen hervorzubringen. Dabei fiel auf, dass die Mutanten-T47D-Zellen vor allem weniger Lamellipodien und *membrane ruffles* entwickelten (Abbildung 19-22). Dagegen schien die Filopodienbildung weniger beeinflusst. Diese erfolgte aber ungleich der Beobachtung bei den Wildtypzellen nicht innerhalb der vorangehenden Lamellipodien, sondern vielmehr aus dichten Aktinpunkten. Diese Verknüpfungspunkte entsprechen wahrscheinlich Adhäsionsfoki, die aufgrund ihrer vergleichsweise großen Ausdehnung und ihrem hohen Aktinanteil *focal adhesions* gleichen könnten. Die Tendenz der Mutantenzellen zur Ausbildung von *focal adhesions* ist mit der verminderten Migration in Übereinstimmung zu bringen, da schneller migrierende Zellen einen höheren Anteil an *focal complexes* gegenüber *focal adhesions* enthalten (Hall, 1998).

Von Mitgliedern der Arbeitsgruppe wurde darüber hinaus die morphologische Antwort der Nck1-Mutanten auf eine Nrg1 β -Stimulation untersucht. Diese entsprach weitgehend der der Nck2-Mutanten. Auch wenn diese heterogenen und rein qualitativen Daten keine genaue Aussage über das morphologische Korrelat zu der verminderten Migrationsrate der Mutantenzellen zulassen, scheint das morphologische Korrelat der geringeren Migration der mit dominant-negativen Nck-Mutanten transfizierten Zellen zumindest anteilig in ihrer

eingeschränkten Fähigkeit zur Bildung von Membranausläufern wie Lamellipodien und *membrane ruffles* begründet zu sein. Darüber hinaus ist die beobachtete Ausbildung starker Aktinadhäsionsfoki eine weitere mögliche Erklärung für die eingeschränkte Beweglichkeit der Mutantenzellen. Diese Adhäsionsfoki könnten stationäreren Substratadhäsionsstellen wie z.B. *focal adhesions* gleichkommen, die eine feste Adhäsion der Zellen am Substrat ausrichten und somit die Fortbewegung der Zellen hemmen.

Abbildung 19-22: Aktinfärbung transfizierter T47D-Zellen nach Stimulation mit Nrg1 β

T47D Zellen wurden mit einem leeren gfp-Vektor (Abbildung 19), gfp-Nck2-SH2 (Abbildung 20), gfp-Nck2-SH3 (Abbildung 21) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf 8-Well Objektträgern ausplattiert und über Nacht in serumfreiem Medium gehalten, bevor sie 30 min lang mit 1nM Nrg1 β stimuliert wurden. Anschließend wurde das Aktin-Zytoskelett mittels fluoreszenz-markierten Phalloidin sichtbar gemacht und die Kerne mit DAPI angefärbt. Die rechte Säule (B, D, F, H) zeigt jeweils das Fusionsbild aller drei Farbkanäle. Im linken Bild ist zur besseren Übersicht nur das Phalloidin-Signal dargestellt (A, C, E, G). Abbildung 22 zeigt die unstimulierten Kontrollen.

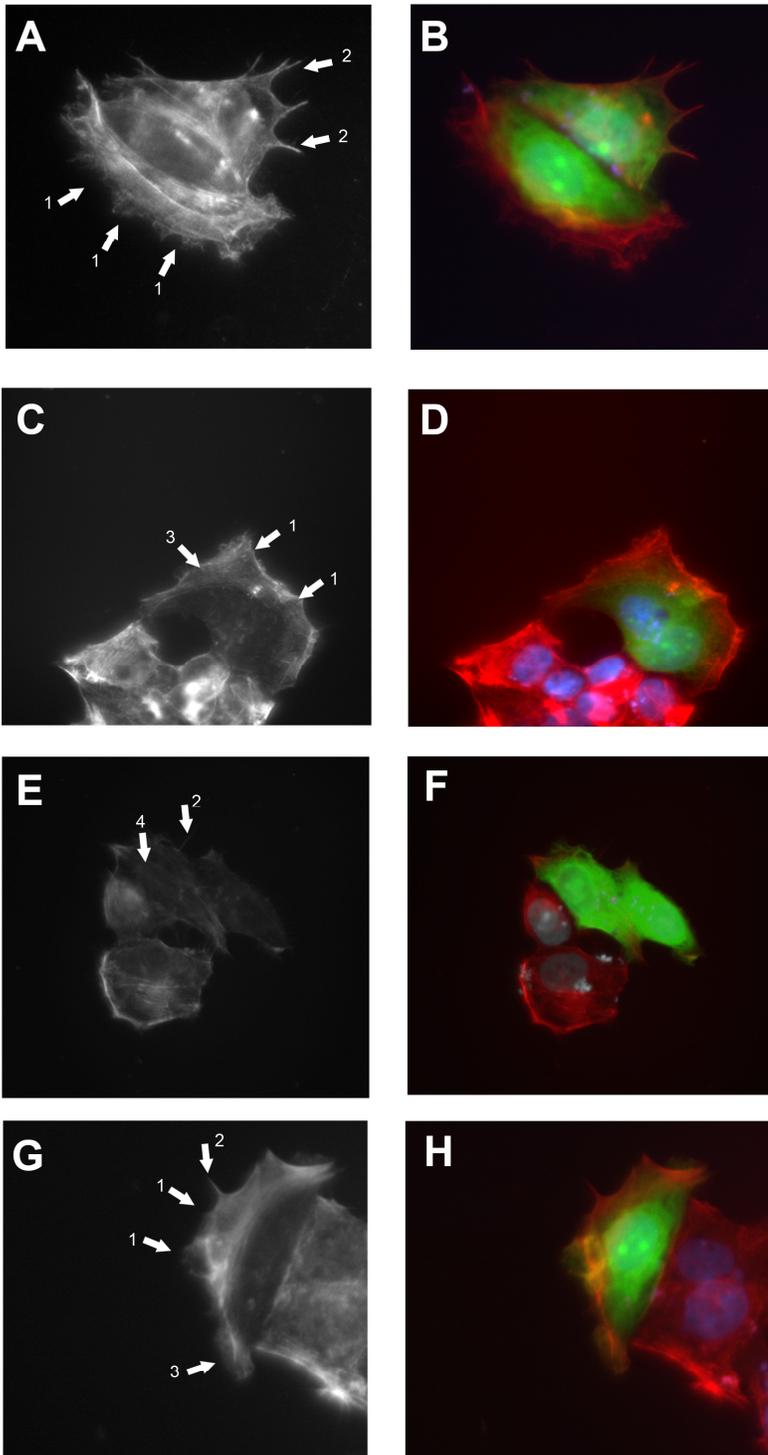


Abbildung 19: T47D (gfp only), Aktinfärbung nach Stimulation mit Nrg1β

Wildtyp Zellen, d.h. Zellen, die mit einem leeren gfp-Vektor oder untransfiziert blieben, zeigten eine für migrierende Zellen charakteristische Konformation des Aktinzytoskeletts. Die Zellkörper spreizten sich gerichtet aus und bildeten Lamellipodien (1), Filopodien (2), *membrane ruffles* (3), sowie *stress fibers* (4) aus. Wildtyp Zellen waren außerdem kleinere Adhäsionsfoki sichtbar, die am ehesten *focal complexes* entsprechen, wie sie für wandernde Zellen typisch sind.

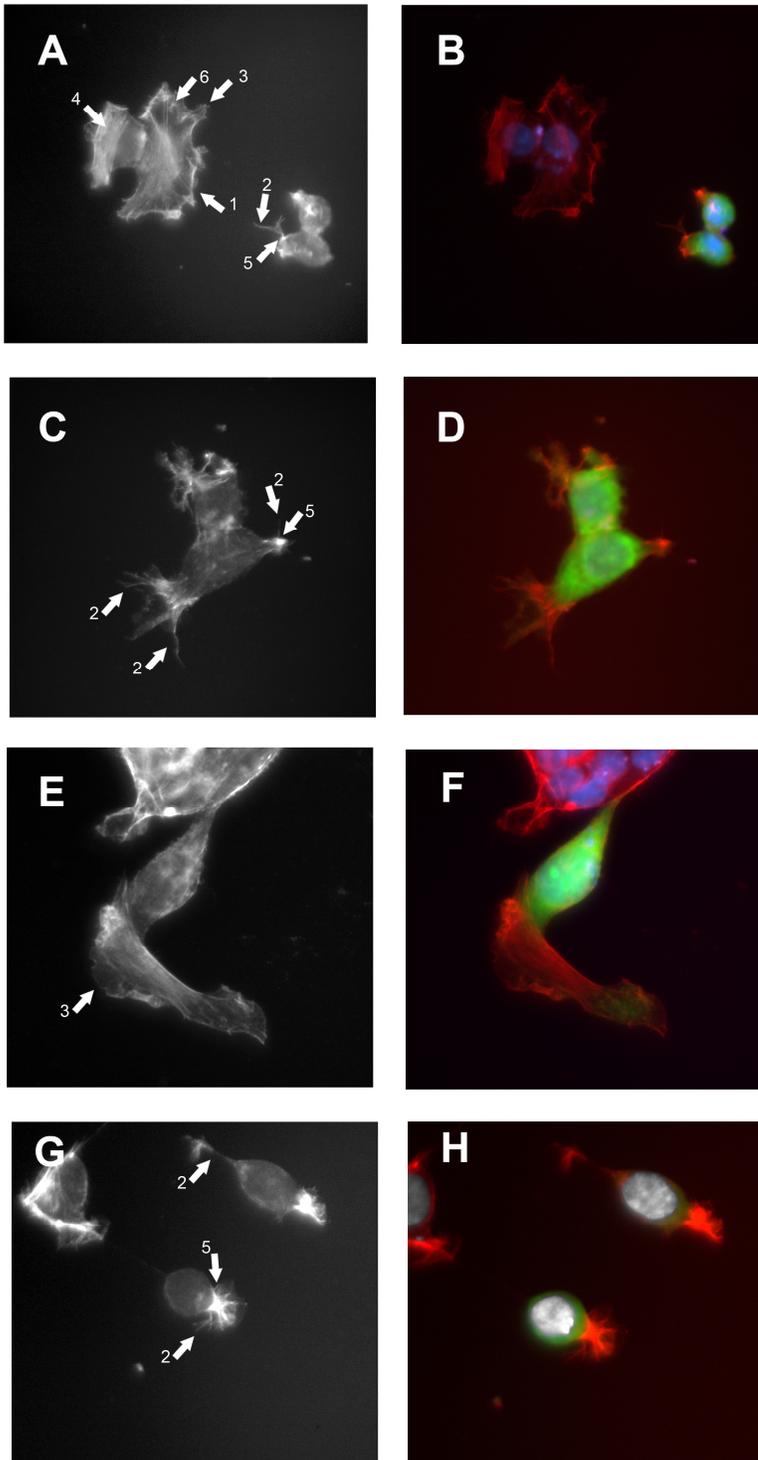


Abbildung 20: T47D (Nck2-SH2), Aktinfärbung nach Stimulation mit Nrg1 β

Die mit den dominant-negativen Nck2-SH2 Mutanten transfizierten Zellen waren gegenüber untransfizierten Zellen in der Fähigkeit zur Bildung von Lamellipodien (1) und *membrane ruffles* (3) beeinträchtigt. Sie bildeten jedoch weiterhin Aktin stress fibers (4) und Filopodien aus (2). Die Filopodien schienen aber im Gegensatz zu den Wildtypzellen, die *focal complexes* (6) aus dichten Aktinadhäsionsfoki hervorzustoßen, die aufgrund ihrer Morphologie am ehesten *focal adhesions* (5) entsprechen.

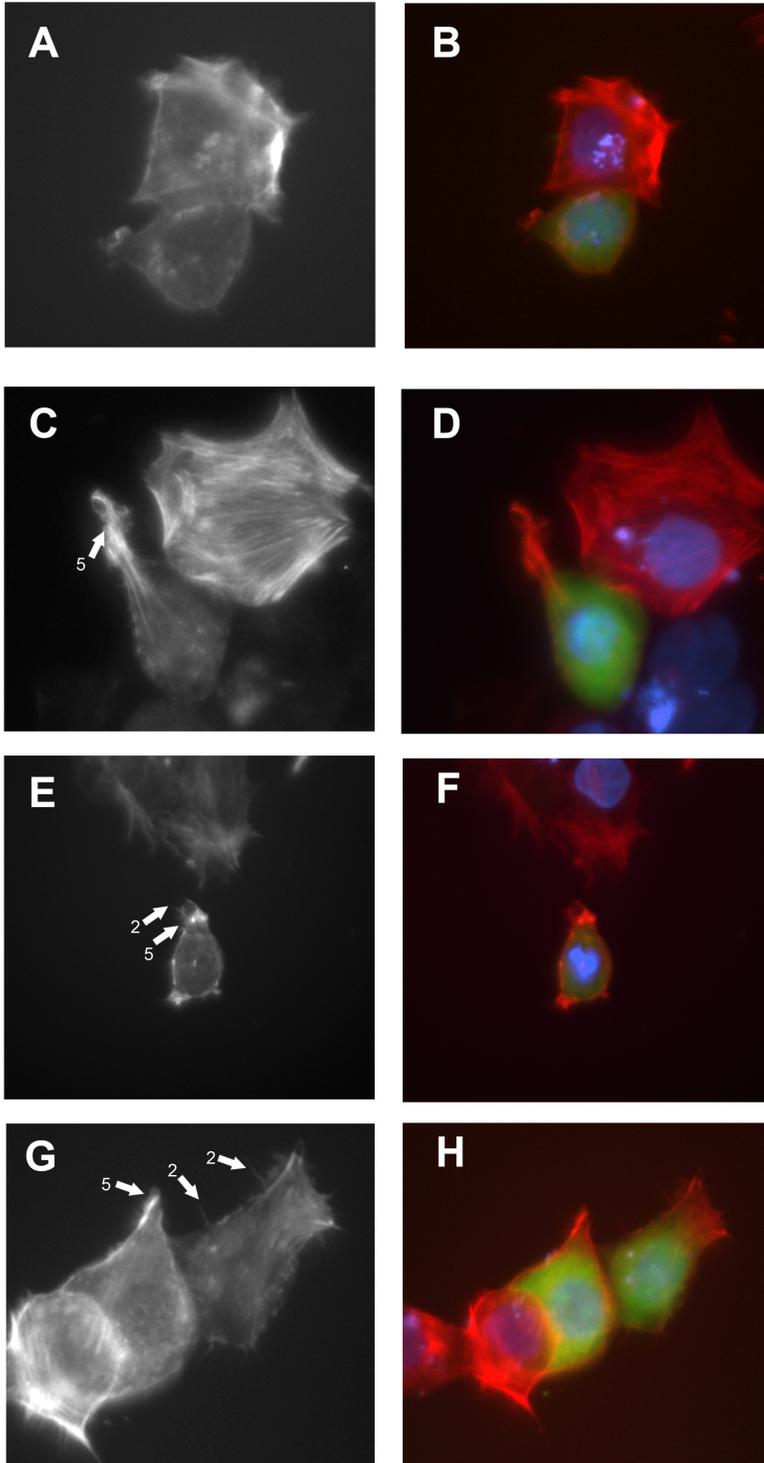


Abbildung 21: T47D (Nck2-SH3), Aktinfärbung nach Stimulation mit Nrg1 β

Auch die mit den dominant-negativen Nck2-SH3 Mutanten transfizierten Zellen waren in der Fähigkeit zur Bildung von Lamellipodien und *membrane ruffles* behindert. Auch diese Mutanten formten weiterhin Filopodien aus (2), die im Gegensatz zu den Wildtypzellen aus dichten Aktinadhäsionsfoki (5) hervorzustoßen schienen.

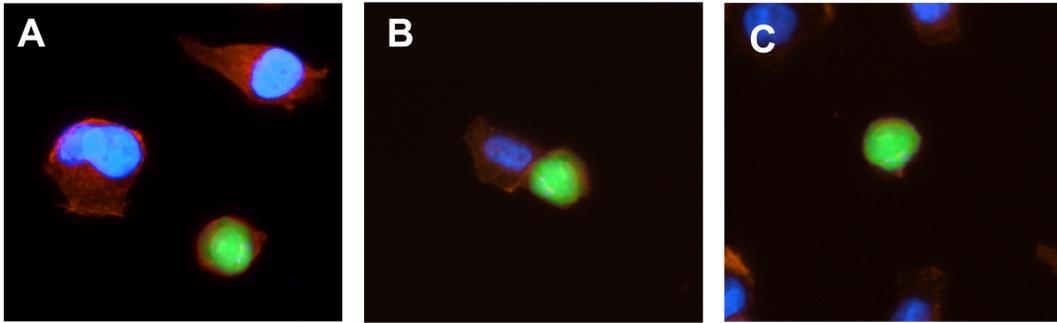
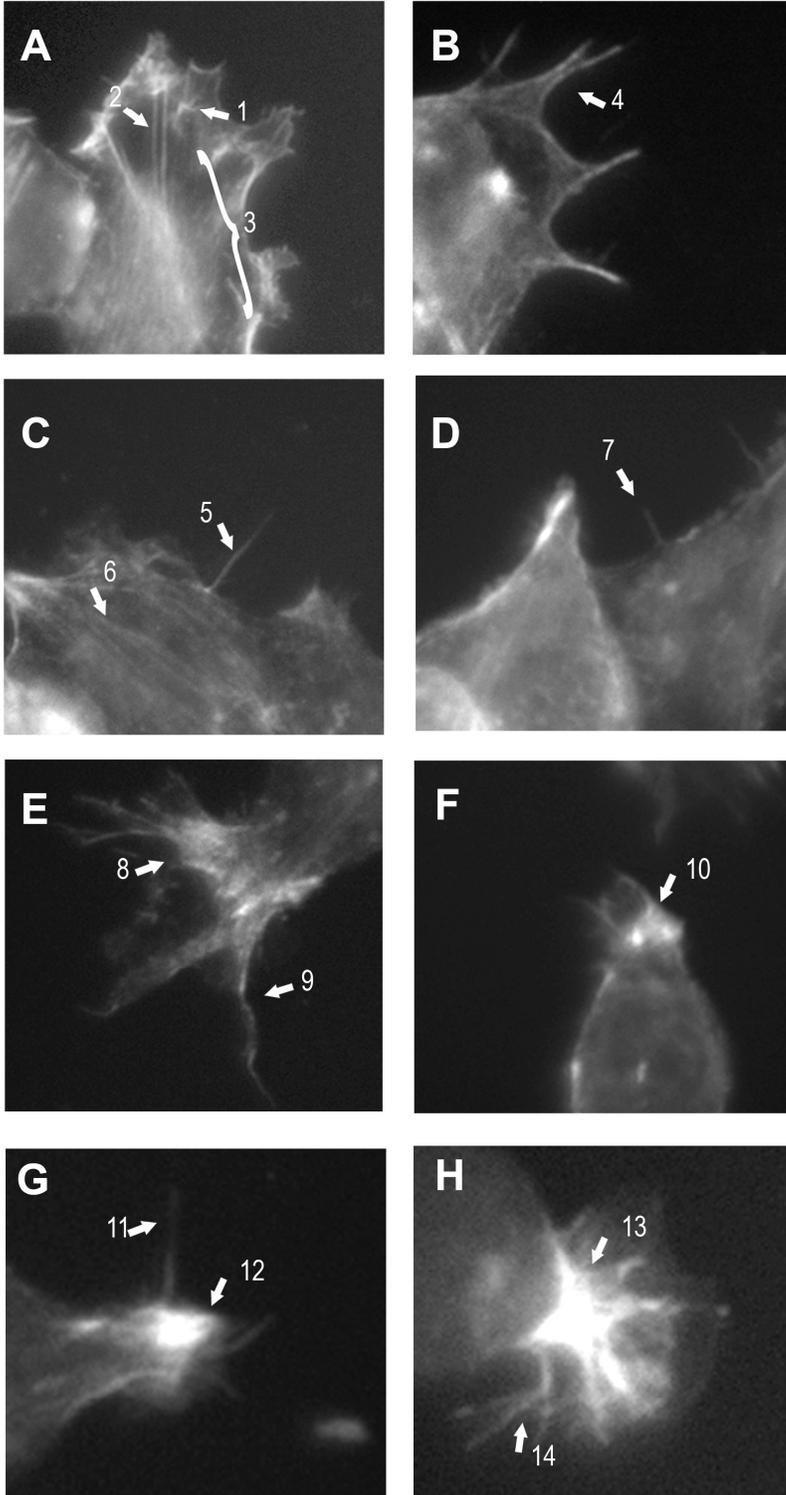


Abbildung 22: unstimulierte Kontrollen

Als Kontrollen wurden unstimulierte Zellen der drei Versuchsansätze aufgenommen: **A:** Mit gfp transfizierte Zellen, **B:** Mit Nck2-SH2-Mutanten transfizierte Zellen und **C:** Mit Nck2-SH3-Mutanten transfizierte Zellen.

Abbildung 23: Detailansicht aus den Abbildungen 19-21

A: Wildtypzellen bildeten nach Stimulation mit Nrg1 β Lamellipodien (3) aus. Innerhalb dieser Lamellipodien waren radiale Aktinausläufer (Filopodien) (2) und fokale Adhäsionspunkte zu erkennen (1). **B:** Filopodien ragten als Ausläufer in Richtung der Zellbewegung hervor (4). **C:** Einige dieser Filopodien zeigten sich auch als seitliche Ausläufer (5). Wildtypzellen bildeten außerdem Aktin *stress fibers* (6). **D:** Letztere waren auch in den Mutantenzellen aufzufinden. Die Mutantenzellen zeigten weiterhin eine Filopodienbildung, entweder als seitlich Ausläufer entsprechend dem Wildtyp (7), oder wie in **E-H** zu erkennen als längliche Ausläufer aus dichten Aktinadhäsionsfoki (8, 9, 11, 14). Diese Adhäsionsfoki waren durch dichte Aktinbündel gekennzeichnet (10, 12, 13) und entsprechen aufgrund dieses hohen Aktinanteils am ehesten *focal adhesions*. Diese Aktinadhäsionsfoki waren meist nur auf einer Seite der Mutantenzellen zu finden.



3.2.5 Unveränderte Proliferation der Nck-Mutantenzellen

Vor dem Hintergrund der potenten Rolle von ErbB2 in der Pathogenese von malignen Tumoren liegt es nahe, auch Nrg hinsichtlich dessen pro-mitogener und proliferationsfördernder Wirkung zu beleuchten. Eine Reihe von Studien mit Hilfe von verschiedenen Methoden und unter Verwendung von Zelllinien mit unterschiedlichem ErbB2-Expressionsniveau haben dies untersucht (Aguilar et al., 1999; Neve et al., 2002; Stove and Bracke, 2004). Demnach wurde— mit einigen Ausnahmen—Nrg in humanen Brustkrebszelllinien als potenter pro-mitogener und proliferationsfördernder Faktor identifiziert. Dies trifft besonders zu, wenn jene Zellen ErbB2 überexprimieren (Aguilar et al., 1999).

Um die Wirkung von Nrg1 β in T47D-Zellen zu testen, wurde ein XTT-Proliferationsassay durchgeführt. Der Versuchsaufbau beruht auf dem Prinzip, dass lebende Zellen XTT zu einem Farbstoff umsetzen können, der wiederum mit einem ELISA-Messgerät detektiert werden kann. Die exogene Stimulation von T47D-Zellen mit Nrg führte nach 24 h zu einer verstärkten Proliferation der Zellen (Abbildung 24); dieser Effekt war jedoch relativ schwach.

Im Folgenden wurde getestet, ob die mit Nck-Mutanten transfizierten Zellen eine veränderte Proliferationsantwort auf eine Stimulation mit Nrg1 β aufweisen. Wie Abbildung 24 darstellt war dies nicht der Fall und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Mutanten transfizierten und den mit gfp-transfizierten Zellen festgestellt werden. Ein Hauptziel dieses Versuches bestand außerdem darin, den Einfluss der Nck-Signalblockade auf die Lebensfähigkeit und Proliferation zu testen, denn dies könnte einen Einfluss auf die chemotaktische Antwort der Zellen haben. Hierbei veränderte die Transfektion der Zellen mit dominant-negativen Mutanten die Proliferationsrate der unstimulierten Zellen gegenüber den Kontrollen nicht wesentlich. Dies weist auf eine unveränderte Lebensfähigkeit der Mutanten hin.

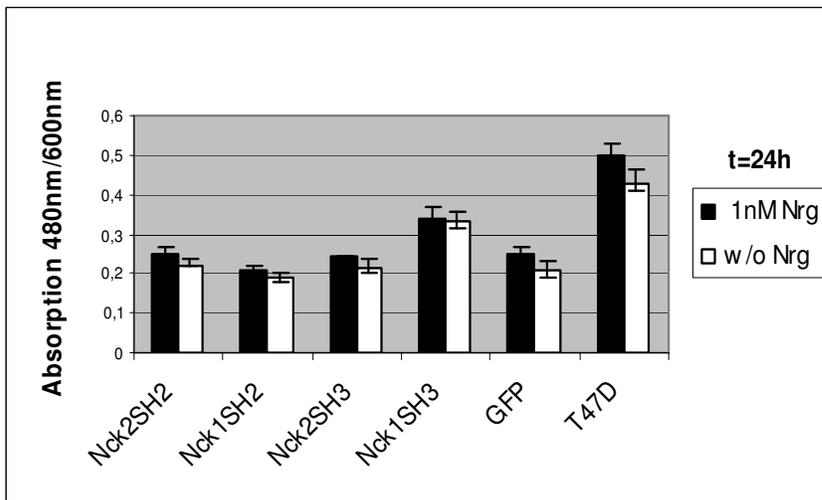


Abbildung 24: Proliferation von T47D Zellen nach 24h

T47D Zellen wurden mit den verschiedenen Nck-Mutanten oder mit gfp transfiziert oder unberührt gelassen; anschließend wurde ein Teil der Zellen mit 1nM Nrg stimuliert. Die Proliferationsrate wurde nach 24h in einem XTT-Proliferationsassay gemessen. Die Transfektion der Zellen mit den Nck-Mutanten beeinflusste die Proliferation der Zellen nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte die im Hefe-2-Hybrid Screen neu identifizierte, phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen der SH2-Domäne von Nck2 und ErbB2 in humanen Zellen durch Überexpressionsstudien und endogene Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Anhand von Mutationsanalysen wurde gezeigt, dass sowohl Nck1 als auch Nck2 eine essentielle Rolle in durch Nrg-induzierten und von ErbB2-vermittelten Migrationsprozessen in Brustkrebszellen spielen. Morphologische Studien legten dabei nahe, dass dies auf der Funktion von Nck-Proteinen in der Regulation des Zytoskeletts während der Zellmigration beruht. Die Expression von dominant-negativen Mutanten hatte hierbei weder einen Effekt auf die Nrg-induzierte Proliferation der verwendeten T47D-Brustkrebszellen, noch auf die Aktivierung von MAPK- und Akt-Signalwegen.

4.2 Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2

4.2.1 Hefe-2-Hybrid Screen und Microarray-Studien

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde von der Arbeitsgruppe Nck2 in einem modifizierten Hefe-2-Hybrid Screen als ein Interaktionspartner von ErbB2 identifiziert. Anhand des in diesem Screen eingesetzten Köder-Konstrukts konnten phosphorylierungsabhängige Interaktionspartner des ErbB2-Rezeptors aufgefunden gemacht werden. Darüber hinaus wurde mittels einer Mutationsanalyse die direkte Bindungsstelle, nämlich der Y3-Tyrosinrest von Nck2 am ErbB2R demaskiert (Keitel et al., 2008). In dieser Arbeit konnte daraufhin diese phosphorylierungsabhängige Proteininteraktion in menschlichen Zellen in Überexpressionsstudien und unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden.

Nck2 als ein Adaptorprotein ohne katalytische Aktivität birgt eine SH2-Domäne und drei SH3-Domänen. Die SH2- und SH3-Domänen sind Interaktionsmodule, die in einer Mannigfaltigkeit von strukturell und funktionell verschiedenen Signalmolekülen vorkommen (Pawson, 1995). Abgesehen von der Terminologie haben SH2- und SH3-Domänen jedoch keine gemeinsamen Eigenschaften was ihre Struktur, ihre Bindungseigenschaften und ihre Interaktionspartner betrifft (Li et al., 2001). SH2-Domänen ermöglichen Komplexe mit Proteinen wie ErbB2 einzugehen, die Phosphotyrosinreste (pY) enthalten.

Während diese Arbeit durchgeführt wurde, identifizierte eine weitere Studie in einem Protein-Microarray Screening ebenso Nck2 als einen Interaktionspartner von ErbB2 (Jones et al., 2006). Dort wurde die Affinität der Interaktion von Nck2 mit einem Phosphopeptid, das den Y3-Rest von ErbB2 enthielt, mit einer Kd zwischen 500nM und 1000nM bestimmt (siehe Abbildung 2). Diese Studie wie auch vorangegangene Hefe-2-Hybrid Screens unserer Arbeitsgruppe fanden darüber hinaus auch eine Interaktion von Nck1 mit ErbB2 sowie eine Bindung von Nck2 an ErbB3 (DiCesare, 2001; Jones et al., 2006; Keitel et al., 2008). Die Affinität von Nck1 an ErbB2 lag jedoch nur bei einer Kd größer $2\mu\text{M}$ (Jones et al., 2006). Durch die Arbeitsgruppe wurde in Hefe-2-Hybrid Screens als auch in der Microarray-Studie wurde darüber hinaus sowohl eine Interaktion von Nck2 mit ErbB4 wie auch eine schwache Bindung an ErbB3 gefunden, deren Assoziationskonstanten jedoch niedriger waren als die der Interaktion zwischen Nck2 und ErbB2 (Jones et al., 2006; Keitel et al., 2008). Wie bereits angedeutet, handelt es sich bei dem ErbB-Signaltransduktionssystem also keinesfalls um lineare Signaltransduktionswege, sondern vielmehr um ein komplexes, verzweigtes Interaktionsnetzwerk, das neben der mechanischen Interaktion an sich durch andere Dimensionen wie Zeit, Signalkonkordanz und die intrazellulären Konzentrationen der Interaktionspartner geleitet wird. Da letzteres wie auch die mechanische Interaktion an sich wesentliche Größen in diesem System sind, lässt sich durch die Hefe-2-Hybrid und Microarray-Studien das Bild des Interaktionssystems in großen Teilen verschärfen: es ist anzunehmen, dass bei etwa gleichen Konzentrationen von Nck1 und Nck2 bevorzugt Nck2 an den ErbB2R bindet. Bei gleicher Rezeptorkonzentration scheint Nck2 den ErbB2R gegenüber ErbB3R und ErbB4R als Bindungspartner zu bevorzugen.

Ob es sich bei der Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 um eine direkte oder indirekte handelt, ist durch die bisher durchgeführten Untersuchungen nicht festzulegen. Nck2 könnte z.B. zusammen mit anderen Bindungspartnern des Y3-Rests wie Vav2 und Src (DiCesare, 2001) eine Hierarchie verschiedener Multiproteinkomplexe bilden; jeder solcher supramolekularen Komplexe könnte theoretisch zu einem anderen Effektorsignal führen. Auch wenn die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen eine indirekte Interaktion zwischen Nck2 und ErbB2 nicht ausschließen, geben sie einen starken Hinweis darauf, dass Nck2 direkt an den ErbB2R binden kann.

Alle diese vorausgegangenen Studien untersuchten die Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 unter vereinfachten Bedingungen. Auch wenn quantitative Interaktionsprofile und screening Methoden wie zum Beispiel der Hefe-2-Hybrid Screen und die Proteinmicroarraytechnik

wichtige Basisinformation über Proteininteraktionen bereitstellen, kann jedoch kein Modell die Komplexität einer humanen Zelle imitieren; die Bestätigung der SH2-pY Interaktion unter physiologischen Bedingungen ist daher unerlässlich. So weist das intrazelluläre Milieu in Säugetierzellen und Hefezellen wesentliche Unterschiede auf. Darüber hinaus unterliegen Proteine in Säugetierzellen anderen posttranslationalen Modifikationen als in der Hefe (Alberts et al., 2002). Die Stabilität und Spezifität von Interaktionskomplexen wird obendrein neben den eigentlichen Interaktionsstellen auch von benachbarten Proteinen der eigentlichen Interaktionsstelle beeinflusst (Li et al., 2001). Umso wichtiger war es also, die identifizierte Interaktion in einem menschlichen Zellsystem und unter endogenen Bedingungen zu beleuchten.

4.2.2 Überexpressionsstudien

Die Überexpressionsstudien in HEK293-Zellen eigneten sich für den nächsten Schritt der Charakterisierung der neu identifizierten Interaktion: zum einen handelt es sich um menschliche Zellen, wodurch Bedingungen hergestellt werden konnten, die dem physiologischen Milieu näher kommen. Zum anderen konnte anhand der eingesetzten TrkA-Konstrukte die phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 in einem Säugetiermodell verifiziert werden: Eine Interaktion der beiden Proteine fand nur dann statt, wenn der Rezeptor über eine intakte Kinasedomäne verfügte. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bekräftigen die Annahme, dass ErbB2 mit Nck2 auch in menschlichen Zellen interagiert.

4.2.3 Koimmunpräzipitation in untransfizierten T47D Zellen

Nach Bestätigung der in Hefezellen identifizierten Interaktion durch Überexpressionsstudien wurde diese dann im Folgenden in untransfizierten in dem in dieser Arbeit verwendeten Modellsystem, den T47D Brustkrebszellen, mittels Koimmunpräzipitation untersucht. T47D Zellen sind eine für diese Fragestellung geeignetes Zellsystem, da sie alle vier Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie exprimieren. Das ErbB2-Expressionsniveau der Zellen ist jedoch nicht so hoch, dass der Rezeptor konstitutionell aktiv ist und er lässt sich somit mit Nrg1 β stimulieren (Abbildung 9). Ein weiteres Argument für die Verwendung einer Brustkrebszelllinie mit mittlerem Rezeptorexpressionsniveau besteht darin, dass ErbB2R bei hoher Konzentration eine zunehmende Promiskuität besitzen und somit andere Bindungspartner anziehen (Jones et al., 2006). Bei hohen ErbB2R Konzentrationen werden deshalb alternative Sekundärsignalwege angeregt, anstatt dass eine reine Verstärkung der Primärsignalwege stattfindet. Diese sekundären Signalproteine könnten zudem in einem *cross-talk* mit den primären Signalproteinen eintreten,

was den Zustand der Zelle weiterhin veränderte. Vor diesem Hintergrund offerierten T47D Zellen mit ihrem mittleren ErbB2-Expressionniveau ein geeignetes Modellsystem für die Interaktionsuntersuchungen in untransfizierten Zellen.

Auch hier konnte in diesen Zellen die Interaktion zwischen ErbB2 und Nrg bestätigt werden, die nach einer Stimulation der Zellen mit Nrg1 β erheblich verstärkt wurde (Abbildung 10). Wie bereits beschrieben, induziert Nrg1 β als extrazellulärer Bindungspartner der ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren bevorzugt eine Heterodimerisierung mit ErbB2 (Jones et al., 1999) und leitet somit eine ErbB2-Phosphorylierung ein. Dies unterstreicht auch unter untransfizierten Konditionen die Phosphorylierungsabhängigkeit der Assoziation. Unter unstimulierten Bedingungen konnte ebenso eine schwächere Interaktion zwischen ErbB2 und Nck2 detektiert werden (Abbildung 10). Dies ist am ehesten auf die Basalaktivität des Rezeptors auch unter unstimulierten Konditionen zurückzuführen, die wahrscheinlich auf auto- und parakrinen Loopsignalen beruht (Hynes and Lane, 2005). Sie könnte aber auch gleichzeitig auf eine relativ hohe Bindungsaffinität der beiden Proteine auch unter endogenen Bedingungen hinweisen.

In immunhistologischen Untersuchungen konnte hierbei kein Kolokalisationssignal zwischen ErbB2 und Nck2 ausgemacht werden. ErbB2 und Nck2 sind jedoch in den gleichen Zellkompartimenten lokalisiert und eine Interaktion der beiden Proteine kann somit theoretisch stattfinden. Die Analysen mittels Koimmunpräzipitation bieten hierbei jedoch ein exakteres Bild, da sie die Assoziation der beiden Proteine genauer zu detektieren vermögen (Maier and Deinzer, 2005).

Zusammenfassend konnte die durch die Arbeitsgruppe im Hefesystem ausgemachte phosphorylierungsabhängige Interaktion von Nck2 und ErbB2 sowohl durch Überexpressionsstudien als auch unter endogenen Bedingungen bestätigt werden. Diese ist somit höchstwahrscheinlich von physiologischer Bedeutung in humanen Brustkrebszellen.

4.3 Interaktion zwischen ErbB2 Nck2: biologische Rolle

Nrg1 β als Aktivator von ErbB2 spielt eine wichtige pathophysiologische Rolle bei Mammakarzinomen und induziert die Entwicklung eines aggressiveren Phänotyps in Brustkrebszellen, was durch Hormonunabhängigkeit, Antiöstrogentherapie-Resistenz,

verstärktes Tumorstadium, Invasion und Metastasierung zum Ausdruck kommt (Tang et al., 1996; Mazumdar et al., 2001; Atlas et al., 2003; Tsai et al., 2003). Diese Effekte kann Nrg indirekt durch die Regulation von Genen bewirken, die maligne Progression kontrollieren, oder auch auf non-genomischem Wege wie zum Beispiel durch die Förderung von Zellmotilität (Stove and Bracke, 2004). In Brustkrebszellen kann Nrg1 β neben der Aktivierung von intrazellulären Signalwegen eine Fülle von biologischen Antworten auslösen, wie Zellproliferation und -differenzierung sowie Apoptose, Migration und Chemotaxis.

SH2/SH3-Adaptorproteine wie die Nck-Proteine vermögen als Mediatoren zwischen Rezeptorsignalen und solchen intrazellulären Effektorsignalwegen zu wirken. Ncks sind einzigartig unter den SH2/SH3 Adaptorproteinen, da sie drei SH3 Domänen enthalten: SH3 Domänen binden PxxP-Motive mit einer nur geringen Affinität und Selektivität; letztere können potentiell durch mehrfache separate Interaktionen von verschiedenen SH3-Domänen mit dem gleichen Bindungspartner verbessert werden (Mayer, 2001). Über die SH3 Domänen sind Ncks mit Proteinen assoziiert, die PxxP-Motive enthalten wie zum Beispiel Paks, PRK2, NAP-1, NAP4, WASPs, WIP, NIK, und PINCH (Li et al., 2001). SH3-Verbindungen sind oft—anders als SH2-vermittelte Interaktionen—konstitutiv aktiv (Li et al., 2001). Dabei ist die Anzahl der Nck-Moleküle in der Zelle wahrscheinlich hoch genug, dass verschiedene Reservoirs von Molekülen mit unterschiedlichen *Downstream*-Bindungspartnern wechselwirken und auch gleiche Rezeptorklassen an verschiedene Nck-Effektorkomplexe binden. Die Mehrzahl dieser Effektorkomplexe besitzen das Potential, *upstream* Aktivatoren mit dem Zytoskelett zu verkoppeln (Li et al., 2001).

Die folgenden Versuchsschritte dieser Arbeit hatten zum Ziel zu untersuchen, ob diese Effektorsignale von Nrg1 β in Brustkrebszellen der Interaktion von ErbB2 mit Nck2 zugeordnet werden können. Hierzu wurden dominant-negative Nck2-Mutanten eingesetzt. Sollte diese Interferenz mit Nck2 als auch die Blockierung des ErbB2-Signalweges Nrg1 β -induzierte Signalwege in den untersuchten Zellen auf ähnliche Weise beeinflussen, ließe dies darauf schließen, dass sowohl das Adaptorprotein als auch der Rezeptor für die Weiterleitung des Signals unerlässlich sind und dass dies somit eine Funktion ihrer Interaktion wäre.

4.3.1 Expression von dominant-negativen Mutanten

Durch die simultane Untersuchung der Nck1-Mutanten neben den Nck2-Mutanten sollte ein kompletteres Bild der Rolle der Nck-Proteine im ErbB-Signaltransduktionssystem erstellt werden. Gleichzeitig konnte hiermit auch getestet werden, ob der beobachtete Mutationseffekt spezifisch für Nck2 ist: so haben Experimente mit Knock-out Mäusen gezeigt, dass Nck1 und Nck2 eine redundante biologische Funktion haben, denn das Ausschalten von einem der beiden Gene führte zu keinem manifesten Ausfall. Die gleichzeitige Ausschaltung beider Gene bewirkte hingegen eine frühe embryonale Letalität und gravierende Defekte in Strukturen mesodermaler Abstammung (Bladt et al., 2003). Die verwendeten Nck-Mutanten vermögen entweder die SH2- oder die SH3-Bindungsstelle zu besetzen. Dies gestattete die Untersuchung beider Bindungsdomänen der Nck-Proteine. Aufgrund der hohen Strukturanalogie der Nck-Proteine musste eine unspezifische Blockierung von Nck1 und Nck2 Bindungsstellen durch die verwendeten Mutanten befürchtet werden. Dies begründete die anschließende Verifikation der in den Mutantenganalysen extrahierten Ergebnisse durch Untersuchungen mittels siRNA durch die Arbeitsgruppe; hierbei konnte kein Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Methodik und den dominant-negativen Mutanten festgestellt werden (Keitel et al., 2008). Dies unterstreicht die Angemessenheit der verwendeten dominant-negativen Mutanten zur intrazellulären Blockierung der Nck-Signalwege.

4.3.2 Migrationsversuche

Die Transformation von Epithelzellen zu invasiven Karzinomzellen umfasst Veränderungen in deren Zusammenspiel mit der extrazellulären Matrix wie dem Verlust normaler epithelialer Polarisation und Differenzierung sowie deren Umwandlung in einen beweglichen, invasiven Phänotyp (Menard et al., 2004). ErbB2 spielt eine fundamentale Rolle in der Nrg1 β -induzierten Migration von Brustkrebszellen: der Einsatz des ErbB2-Inhibitors resultierte in einer etwa 50-prozentigen Reduktion der migratorischen Antwort der T47D Brustkrebszellen (Abbildung 17); eine andere Studie zeigte, dass T47D Zellen, in denen ErbB2 durch einen single-chain Antikörper im endoplasmatischen Retikulum abgefangen wurden, nach einer Stimulation mit Nrg1 β unfähig über ein basales Niveau hinaus zu migrieren sind (Marone et al., 2004). Interessanterweise deuten Untersuchungen darauf hin, dass Tyr 1201 (Y3) und Tyr 1227 (Y4), also unter anderem die identifizierten Bindungsstelle von Nck2, für die Migration dieser Zellen unerlässlich sind (Marone et al., 2004). Dies weist darauf hin, dass Tyr 1227 und 1201 Kopplungspunkte für Adaptormoleküle darstellen, die an der Regulation des Zytoskeletts

beteiligt sind; Tyr 1227 und Tyr 1201 scheinen jedoch unterschiedliche Signalkomplexe als intrazelluläre Vollstrecker zu rekrutieren (Marone et al., 2004). Es gibt eine Reihe von Indizien dafür, dass Nck-Proteine grundlegende Rollen in der Reorganisation des Zytoskeletts und in Migrationsprozessen spielen. So wurde gezeigt, dass alleine die Anreicherung von Nck an der Membran ausreicht, um eine Neuordnung des Zytoskeletts zu veranlassen (Rivera et al., 2004). Der erste Hinweis für die Verknüpfungsrolle von Nck ergab die Entdeckung, dass Nck/Dock in *Drosophila* den Wachstumskonus mit dem intrazellulären Aktinnetzwerk verkoppelt (Garrity et al., 1996); die Interaktionen von Ncks mit mannigfaltigen Regulatoren des Aktinzytoskeletts und ihre molekulare Struktur machen sie zu idealen Kandidaten für die Feinabstimmung von zytoskelletalen Veränderung und deren Verknüpfung mit Wachstumsrezeptorsignalen. Für diese Arbeit erschien es somit attraktiv, die Rolle der Nck-Proteine in durch ErbB2-vermittelten und Nrg1 β -induzierten Zellmigrationsprozesse zu durchleuchten.

Transwell-Migrationsassay

Zur Untersuchung von Migrationsvorgängen in kultivierten Zellen stehen mehrere standardisierte Methoden zur Verfügung. Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode besteht in einem experimentellen Zwei-Kammer-System, wie es S. Boyden zuerst beschrieben hat (Boyden, 1962). Diese Versuchsanordnung hat zur Untersuchung der Chemotaxis gegenüber anderen Methoden wie dem *scratch wound closure assay* und den dreidimensionalen Matrixgelen den Vorteil, dass in diesem System ein definierter Konzentrationsgradient des Botenstoffs aufgebaut werden kann. Der störende Einfluss der Zellproliferation ist hier nahezu ausgeschlossen, da nur die durch die Membran gewanderten Zellen ausgezählt werden (Meyer et al., 2005). Deshalb war für diese Arbeit der Boyden Chamber Assay die am besten geeignete Methode zur Messung der Chemotaxis und Migrationsrate.

Veränderte Migration der Mutantenzellen

Die Blockade der Weiterleitung des durch Nrg1 β -induzierten Signals durch die Überexpression von dominant-negativen Nck1- und Nck2-Mutanten führte zu einer erheblichen Reduktion der chemotaktischen Antwort der Brustkrebszellen (Abbildung 17). Diese Ergebnisse sind konsistent mit einer Reihe anderer Arbeiten, die die Rolle von Nck1 und Nck2 in der Chemotaxis im Hinblick auf andere Stimuli in verschiedenen Zelltypen untersuchten: in embryonalen Mausfibroblasten (MEF) führte die Ablation von Nck1 und Nck2 zu einer verminderten Migration nach Stimulation mit PDGFB (Rivera et al., 2006). PDGF ist wie Nrg1 β ein stark

chemotaktischer Botenstoff; Nck1 und Nck2 können an verschiedenen pTyr an den PDGFR- β binden. Nck1 und Nck2 spielen in diesem Signalnetzwerk über eine SH3-Interaktion mit α PIX, einem GEF von Rac und Stimulator von Pak1, eine fundamentale Rolle in der Übermittlung von PDGF-eingeleiteten Signalen an das Zytoskelett (Chen et al., 2000a; Rivera et al., 2006); durch das Binden von Nck an den PDGFR wird Pak1 an die Membran rekrutiert und stimuliert (Galisteo et al., 1996).

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass Nck unerlässlich für die Migration von Gefäßendothelzellen (ECs) ist (Master et al., 2001), wobei es auch hier eine durch eine konstitutive Assoziation über die SH3-Domäne mit Pak als Bindeglied zwischen Rezeptoren und Effektoren von Regulatoren der Zellmigration fungiert. Auch in Zellen aus Ovarien chinesischer Hamster (CHO) war Nck eine Voraussetzung für die durch Ephrin-induzierte Zellmigration, wobei es hier Teil eines Komplexes aus EphB1, Paxillin und FAK bildete (Vindis et al., 2004). Zusammenfassend scheint also eine positive Korrelation zwischen der Konzentration an funktionellem Nck1 und Nck2 und der Zellmigration zu bestehen.

Dennoch kann die Ablation von Nck1 auch einen positiven Effekt auf die Zellmigration haben: so ist die EndothelinA-Rezeptor vermittelte Inhibition der Zellmigration reduziert wenn die Expression von Nck1 reduziert wird (Miyamoto et al., 2004). Diese inhibitorische Wirkung von Nck1 in EndothelinA-Signalprozessen wird durch einen Mechanismus ausgelöst, der die Suppression der JNK-Aktivität umfasst (Miyamoto et al., 2004).

In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass dominante Nck2-SH2-Mutanten die Migrationsrate von CHO-Zellen erhöhen können (Goicoechea et al., 2002). Dies lässt annehmen, dass die Rolle von Nck1 und Nck2 in der Zellmigration in verschiedenen Zellsystemen und unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen variieren kann. Aufgrund der hohen Strukturanalogie von Nck1 und Nck2 sowie der partiellen funktionellen Redundanz der Nck-Proteine ist es umso wichtiger, die spezifische Rolle von Nck1 und Nck2 in der Nrg1 β -vermittelten Zellmotilität in Brustkrebszellen zu untersuchen (Bladt et al., 2003). Beide Proteine erscheinen hierbei für eine optimale Nrg1 β -induzierte Migration von menschlichen T47D-Brustkrebszellen notwendig, die ein Schlüsselprozess in der Krebsmetastasierung ist. Anders als in der Mausembryogenese haben Nck1 und Nck2 in diesem Prozess keine redundante Funktion (Bladt et al., 2003), sondern scheinen vielmehr beide für eine maximale Migrationsantwort essentiell (Abbildung 17). Dies steht im Einklang mit anderen Studien in denen sich

beträchtliche Einschränkungen nach der Depletion von nur einem der Nck-Proteine manifestierte: Die verringerte Expression von Nck2 alleine vermindert die Zellausdehnung als wichtigen Schritt der Migration in HELA und Rattenmelanomzellen (Vaynberg et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005). Nck1 ist dahingehend essentiell für die EGF-induzierte Ausbildung von Invadopodien in Rattenmelanomzellen, wobei die Ausdehnungsfähigkeit der Zellen unverändert blieb (Yamaguchi et al., 2005). Auch in der bereits oben beschriebenen Studie, die die Rolle von Nck1 und Nck2 in PDGF-Signalwegen erfasste, führte der Versuch, die Migration der Nck1(-/-)-Nck2(-/-)-Mutanten durch retrovirale Expression von Nck1 wiederherzustellen, nur zu einer Wiederherstellung einer Migrationsrate von 60% gegenüber den Wildtypzellen (Rivera et al., 2006). Eine akute Alteration dieser Signalwege scheint in adulten Zellen eine schädlichere Wirkung zu haben als die chronische Unterdrückung der Signalwege zu einem frühen embryonalen Zeitpunkt. Hierbei muss natürlich auch berücksichtigt werden, dass Organismen über ein weiter reichendes kompensatorisches Potential verfügen als isolierte Zelllinien.

4.3.3 Veränderte Morphologie der Mutantenzellen

Zellmigration ist ein Geschehen, das morphologisch in vier grundlegende Phasen eingeteilt werden kann: erstens das Vorstoßen des führenden Zellanteils (Protusion), zweitens die Adhäsion an das Substrat, drittens das Nachziehen des hinteren Zellanteils (Retraktion), und schließlich viertens die Deadhäsion (Pollard and Borisy, 2003). Morphologisch können diesem Prozess, wie bereits in der Einleitung beschrieben, verschiedene Veränderungen im Zytoskelett zugeteilt werden wie sie in Abbildung 3 dargestellt sind. Auf molekularer Ebene ist jeder dieser Schritte in sich feinabgestimmt und untereinander genau koordiniert, wie es durch das An- und Ausschalten verschiedener Signalwege zum Ausdruck kommt (Alberts et al., 2002). Angesichts der verminderten Migrationsrate der Nck2-Mutantenzellen nach 24 h erscheint es schlüssig, diese auf mögliche Alterationen im Aktinzytoskelett zu untersuchen.

Tatsächlich zeigten die Nck-Mutantenzellen eine veränderte Aktinstrukturierung als Antwort auf eine Stimulation mit Nrg1 β . Nrg1 β als chemotaktischer Botenstoff induziert die Bildung für migrierende Zellen typischer zytoskelettaler Strukturen wie Lamellipodia, Filopodia, *membrane ruffles*, Aktin *stress fibers*, *focal complexes*, sowie *focal adhesions* (Pollard and Borisy, 2003). Auch in den in dieser Arbeit untersuchten T47D-Wildtypzellen waren solche Strukturen zu beobachten (Abbildung 19), wobei das entsprechende Bild recht heterogen erschien und eine Reihe von Strukturen konkordant zu identifizieren waren.

Lamellipodien, membrane ruffles

Die in dieser Arbeit untersuchten Nck2-Mutanten schienen hierbei eine verminderte Ausbildung von Lamellipodien und *membrane ruffles* aufzuweisen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen von Studien zur Rolle von Ncks in der embryonalen Mausentwicklung: Fibroblasten von Nck-Knockoutzellen zeigten ein reduziertes Migrationsverhalten und auch eine verminderte Organisation sowie Länge und Dichte von Lamellipodien (Bladt et al., 2003). Auch in embryonalen Mausfibroblasten, in denen Nck1 oder Nck2 inaktiviert war, wurde eine verminderte Formation von *membrane ruffles* nach PDGF-Stimulation festgestellt (Rivera et al., 2006). Frühere Studien zeigten jedoch auch eine hemmende Wirkung von Nck2 auf die Lamellipodienbildung nach Stimulation mit PDGF (Chen et al., 2000a). Auch hier ist die Nck-Funktion offensichtlich wiederum von der Zellart sowie den Stimulationsbedingungen abhängig.

Filopodien

Interessanterweise erschien die Ausbildung von Filopodien in den Nck2-Mutantenzellen unverändert vorhanden (Abbildung 20, 21). Nck2 könnte also in T47D Brustkrebszellen vor allem an der Ausbildung von Lamellipodien und weniger an der von Filopodien beteiligt sein. Filopodien und Lamellipodien sind prominente protusive Organellen, die durch Aktinpolymersisierung ausgestaltet werden. Die Koexistenz von Lamellipodien und Filopodien in der Zellperipherie wurde in einer Reihe von Arbeiten dokumentiert, auf deren Basis das *convergent elongation-Modell* entstand (Svitkina et al., 2003). In diesem Modell wurde postuliert, dass Filopodien aus dem Gitternetzwerk der Lamellipodien aus spezifischen Vorläuferstellen hervorgehen, die sich durch eine laterale Translokation und Umwandlung von Aktinfilamenten bilden. Somit ist eine Kaskade der Filopodienentstehung vorherbestimmt, da Lamellipodien *upstream* von Filopodienausläufern entstehen und deshalb eine Filopodienformation von der Ausbildung von Lamellipodien abhängig ist (Biyasheva et al., 2004). Der in den Mutanten-Zellen beobachtete Phänotyp scheint mit diesem Modell zunächst nicht überein zu stimmen.

Mögliche molekulare Regulation

Betrachtet man jedoch die molekulare Regulation der Prozesse genauer, weisen neuere Studien darauf hin, dass die Regulation der Lamellipodien- und Filopodienausbildung verschieden sein könnten (Steffen et al., 2006). Ncks nehmen hierbei einen zentralen Platz in den regulierenden

Signalwegen ein. Auf der Ebene der Rho-GTPasen, die wiederum *downstream* wichtige Regulatoren des Zytoskeletts regulieren, ist bekannt, dass die Rac-Unterfamilie der GTPasen vor allem für das Vorstoßen von Lamellipodien verantwortlich ist. Mitglieder der Cdc42-Unterfamilie sowie Rif (*Rho in filopodia*) triggern die Ausbildung von Filopodien (Bokoch, 2000; Li et al., 2003; Pellegrin and Mellor, 2005). Die eigentliche Filamentnukleation und -elongation werden—wie bereits beschriebene—durch molekulare Maschinen wie den Arp2/3-Komplex katalysiert, die wiederum über Regulatoren wie die WASP/WAVE Proteine angeregt werden, indem diese mit ihrem C-terminalen Ende an den Arp2/3-Komplex andocken. Dieses Zusammenspiel wird hingegen durch eine Reihe von Regulatoren gesteuert wie zum Beispiel von Rac/Cdc42/Rho GTPasen, Phosphoinositiden und auch Nck (Fawcett and Pawson, 2000; Pollard and Borisy, 2003).

WAVE

Der WAVE-Komplex ist hierbei für die Lamellipodienbildung von großer Bedeutung. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass WAVE besonders durch Rac aktiviert werden kann (Eden et al., 2002). Aber auch Ncks spielen ebenso in der WAVE-Aktivierung eine fundamentale Rolle: WAVE ist intrinsisch aktiv und wird von einem Komplex aus fünf Proteinen trans-inhibiert (Eden et al., 2002). Nck1 bindet mit seiner dritten SH3-Domäne an diesen Komplex und hebt die Hemmung von WAVE auf (Eden et al., 2002), wodurch die VCA-Bindungsdomäne für den Arp2/3-Komplex freigelegt wird. Da gezeigt werden konnte, dass ein funktioneller WAVE-Komplex zwar unerlässlich für die Induktion und Stabilität von Lamellipodien und die Zellmigration ist, nicht jedoch für die Bildung von Filopodien, wäre die fundamentale Rolle von Nck in der Aktivierung des Komplexes eine überzeugende Erklärung für den beobachteten Phänotyp der T47D-Zellen.

WASP

An dieser Stelle muss dennoch auch die wichtige Funktion von Nck in der Aktivierung der WASP-Proteine berücksichtigt werden, denen eine zentrale Rolle in der Stimulation zur Filopodienbildung zugesprochen wird. WASP inhibiert sich selbst durch die intramolekulare Interaktion der GDB-Domäne mit dem C-Motiv von VCA (Abbildung 25(Kim et al., 2000)). Diese Autoinhibition kann durch eine Reihe von Aktivatoren wie GTPasen der Rho-Familie, Phosphoinositiden und SH3-Proteinen wie Ncks aufgehoben werden (Higgs, 2001; Mayer, 2001; Yin and Janmey, 2003). Membranassoziiertes PIP₂ und GTP-Cdc42 binden an die Cdc42/Rac1

Interaktionsdomäne (CRIB) und befreien somit die VCA-Domäne, die den Arp2/3-Komplex aktiviert (Pollard and Borisy, 2003). Die SH3-Domänen von Nck docken an die Prolin-reiche Domäne von N-WASP an und helfen zusätzlich die Autoinhibition von N-WASP aufzuheben, wobei Nck ein starker Aktivator von N-WASP ist (Carlier and Pantaloni, 1997; Rohatgi et al., 2001).

Nck und Cdc42 sind funktional redundant, was nahe legt, dass der Nck-Signalweg ein unabhängiger Signalweg in der Kontrolle des N-WASP-Arp2/3-Moduls ist (Rohatgi et al., 2001). Für die Aktivierung von N-WASP durch Nck werden alle 3 SH3-Domänen des Adaptorproteins benötigt; einige von den Nck-Domänen scheinen an der Bindung von N-WASP, andere an dessen Aktivierung beteiligt zu sein (Rohatgi et al., 2001; Rivera et al., 2004).

Es gibt mehrere Indizien, dass die Nck/WASP-Interaktion eine Brücke zwischen Tyrosinkinasen und Aktindynamik schlagen kann. Erstens vermittelt Nck in T-Lymphozyten den phosphotyrosin vermittelten Zusammentritt eines Komplexes, der WASP, Nck und SLAP enthält. In Aktin-basierten Motilitätsprozessen des Vaccinia Virus koordiniert Nck die Aufstellung eines Aktinnukleationskomplexes an der viralen Oberfläche, indem es mit der SH2-Domäne an ein Phosphotyrosinrest eines viralen Proteins bindet und mithilfe seiner SH3-Domäne N-WASP rekrutiert (Frischknecht et al., 1999).

Morphologisch scheint, wie bereits angedeutet, N-WASP vor allem für die Ausbildung von spezialisierten vorwölbenden Strukturen wie Filopodien und Invadopodien und eher nicht für die breite vorwölbende Aktivität der Zellokomotion verantwortlich zu sein (Snapper et al., 2001; Yamaguchi et al., 2005). Auch wenn die Rolle von Nck in der N-WASP-Aktivierung zunächst schwer mit dem beobachteten Phänotyp übereinander gebracht werden kann, gibt es doch auch auf molekularer Ebene plausible alternative Theorien. Andere Studien haben zum Beispiel gezeigt, dass N-WASP für die Filopodienbildung entbehrlich ist und dass somit andere Signalwege als WASP eine Filopodienbildung induzieren können (Lommel et al., 2001). Darüber hinaus könnten alternative Signalwege wie zum Beispiel über Grb2 einem Interaktionspartner von ErbB2 und Aktivator von WASP, den Nck-Verlust hinreichend kompensieren.

WASP

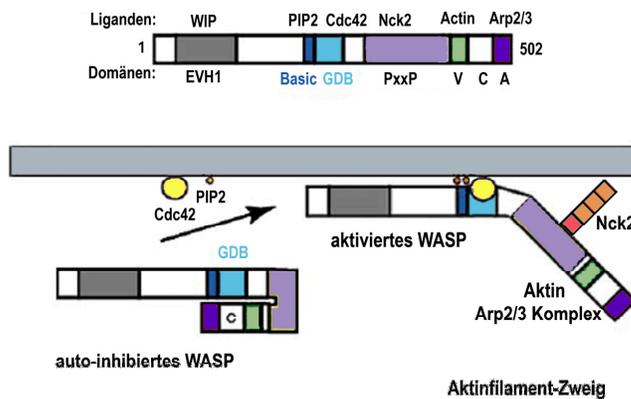


Abbildung 25: Schematische Darstellung der WASP-Aktivierung

WASP ist intrinsisch durch die Interaktion der GTPase binding domain (GDB) mit der C-Region autoinhibiert. Interaktion der Basic-Region, GDB und Prolinreichen-Domäne (PxxP) mit SH3-Proteinen (Nck), PIP2 und Cdc42 befreien die VCA-Domäne. Diese interagiert mit Aktinmonomeren und dem Arp2/3-Komplex zum Anknüpfen von neuen Zweigen.

Pak

Für die veränderte Migrationsrate der Nck2-Mutanten könnte außerdem das Zusammenspiel von Nck mit Pak1 von Bedeutung sein, das auch eine wichtige Rolle in der Regulation von fokalen Adhäsionspunkten spielt, die eine Alteration in den Mutantenzellen aufweisen (Bokoch et al., 1996; Galisteo et al., 1996). Pak ist als Regulator des Aktinzytoskeletts essentiell für die Zellpolarität und Richtungsangabe während der Zellmigration (Li et al., 2003). Die PAK-Proteinfamilie, ein Mitglied der Ste20-Kinasen, besteht aus drei fast homologen Untertypen. Pak liegt in inaktiver Form als Homodimer vor; das Binden von GTP-geladenen Rho-GTPasen wie Cdc42 und Rac löst dieses Dimer auf und führt zur Aktivierung des Proteins (Abbildung 26). Zur vollen Aktivierung muss PAK jedoch an die Zellmembran umgelagert werden, was durch Nck vermittelt wird (Lu and Mayer, 1999). Eine tragende Rolle von Nck in der Aktivierung von Pak wird dadurch untermauert, dass die Pak-induzierte Anordnung des Zytoskeletts und die gerichtete Zellbewegung von dessen N-terminalen Prolin-reichen Sequenz, also der Bindungsstelle von Nck, abhängt (Sells et al., 1997; Kiosses et al., 1999).

Der Nck-Pak-PIX-Komplex kann darüber hinaus Zellbewegung dadurch fördern, dass in dem er Dynamiken von focal complexes steuert. Hierzu bindet PIX das G-Protein gekoppelte *kinase-interaction protein*, GIT1, das mit FAK zusammenwirkt (Zhao et al., 2000). Zusätzlich kann Paxillin, ein FAK-assoziiertes Protein, einen Komplex von Pak, Nck und PIX über eine Leucinreiche Sequenz (Paxillin LD Motiv) binden (Turner et al., 1999). Letzteres ist notwendig, um ILK, eine Ser/Thr-Kinase, die fundamental an Zelladhäsionsprozessen beteiligt ist (Wu, 1999), an Integrine in Fokalen Adhäsionen zu rekrutieren (Nikolopoulos and Turner, 2001). Eine mögliche Bedeutung von Nck-Pak in der Steuerung von fokalen Adhäsionspunkten wird auch

dadurch untermauert, dass die Interaktion von Pak mit Nck ein dynamisch durch Zelladhäsion reguliert wird; dies bedeutet, dass der Pak/Nck-Komplex sich rasch nach dem Ablösen der Zelle von der Matrix dissoziiert, und nach einer Readhäsion wiederhergestellt wird (Howe, 2001).

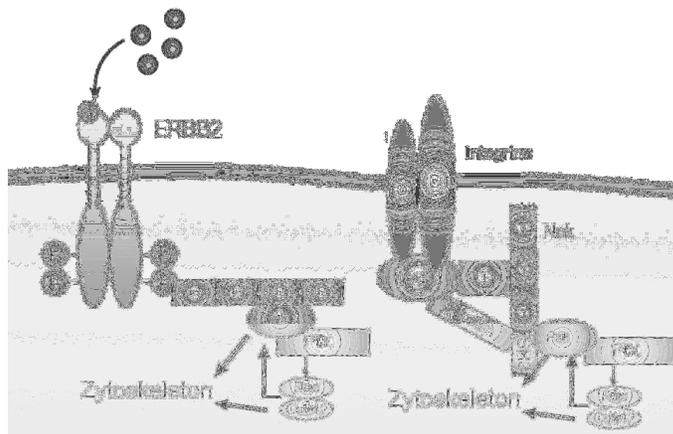


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Rolle von Nck in Pak-Signalwegen

Die Aktivierung von RTK wie ErbB2 führt zur Rekrutierung von Pak an die Zellmembran über Nck-Proteine. Zusätzlich bindet PIX an Pak und rekrutiert Rho-GTPasen (Rac und Cdc42). Letztere aktivieren Pak und die Regulation des Zytoskeletts. FAK bindet an Integrine in Adhäsionspunkten. FAK kann über GT1 oder Paxillin den Nck/Pak/PIX-Komplex rekrutieren.

Nck-Proteine und Adhäsionsfoki

Diese Rolle von Ncks in der molekularen Regulation von Adhäsionsfoki ist besonders bemerkenswert vor dem Hintergrund der beobachteten morphologischen Veränderungen der T47D Zellmutanten. Die Nck2-Mutanten zeigten neben der verminderten Lamellipodienbildung Stellen starker Aktkonzentration, aus denen zumeist Filopodien hervorgingen (Abbildung 19-22). Auch wenn die exaktere Bestimmung dieser Aktfoki weitergreifende Untersuchungen verlangt, könnte aufgrund der Morphologie und der Größe der Aktinpunkte postuliert werden, dass es sich hierbei um *focal adhesions* handelt. *Focal adhesions*, die größere und stabilere Adhäsionspunkte umfassen, sind gegenüber den kleineren und dynamischen *focal complexes* vor allem in stationären Zellen zu finden (Pollard and Borisy, 2003). Dies würde auch mit dem verringerten Migrationsverhalten der Nck-Mutantenzellen übereinstimmen. Für eine bedeutende Rolle von Ncks in der Regulation von Adhäsionsfoki gibt es noch zusätzliche überzeugende Argumente: der Phänotyp der Nck-Knockout-Mäuse stimmte weitgehend mit dem von Fibronectin und FAK-Knockout-Mäusen überein, die Hauptbestandteile solcher Komplexe ausmachen (Bladt et al., 2003). Nck2 kann außerdem direkt an phosphoryliertes FAK binden (Goicoechea et al., 2002) und Nck2 interagiert mit der LIM4-Domäne von PINCH, einem weit exprimiertem Protein, das wiederum an ILK bindet. PINCH spielt dabei wie Paxillin eine fundamentale Rolle in der Steuerung der subzellulären Kompartimentierung von ILK; so ist es unerlässlich für die Rekrutierung von ILK an fokale Adhäsionspunkte. Nck2 kann somit als

Konvergenzpunkt zwischen fokalen Adhäsionspunkten und Wachstumsfaktor-Signalwegen dienen (Tu et al., 1999). Paxillin selber kann unter anderem auch durch Nrg1 β über ErbB2 aktiviert werden, wobei es hierzu an Tyr-31 und Tyr-118 phosphoryliert wird (Schaller, 2001; Vindis et al., 2004; Kuramochi et al., 2006). Paxillin Mutanten dieser beiden Phosphorylierungsstellen zeigen ein reduziertes Migrationsverhalten.

Zusammenfassend existieren also eine Reihe von Indizien dafür, dass Ncks eine wichtige Rolle in der Steuerung von Aktinadhäsionspunkten spielen (Abbildung 27); dies ist mit dem beobachteten morphologischen Veränderungen der T47D-Zellen in Einklang zu bringen. Das molekulare Korrelat der in den Nck2-Mutanten beobachteten Adhäsionsfoki ist nicht abzulesen und müsste durch weitergehende Untersuchungen genauer bestimmt werden.

Insgesamt besteht für die durch Nrg1 β induzierte und ErbB2 vermittelte veränderte Migration der Nck-mutierten Brustkrebszellen auf molekularer Ebene eine Reihe von möglichen Erklärungsmodellen. Hierbei muss jedoch festgehalten werden, dass solche Erklärungen rein hypothetisch bleiben, da Ergebnisse von unterschiedlichen Versuchsbedingungen und Modellsystemen stammen. Darüber hinaus sind die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen aufgrund des rein qualitativen Charakters und der starken Heterogenität als preliminär anzusehen. Trotzdem können sie als Hypothese für weitergehende morphologische Untersuchungen dienen und bei der Identifizierung des molekularen Korrelats der verminderten Migrationsrate der Zellen hilfreich sein. Welches der oben beschriebenen Modelle in den von uns untersuchten T47D Zellen eine Rolle spielt, verlangt auch hier nach weiteren Studien wie zum Beispiel der Bestimmung des Aktivierungsniveaus der Schlüsselregulatoren wie WASP, WAVE und Pak. Interessant wäre hierbei außerdem zu untersuchen, ob die Aktivierung der Aktinpolymerisation durch Ncks unabhängig oder abhängig von kleinen Rho GTPasen stattfindet.

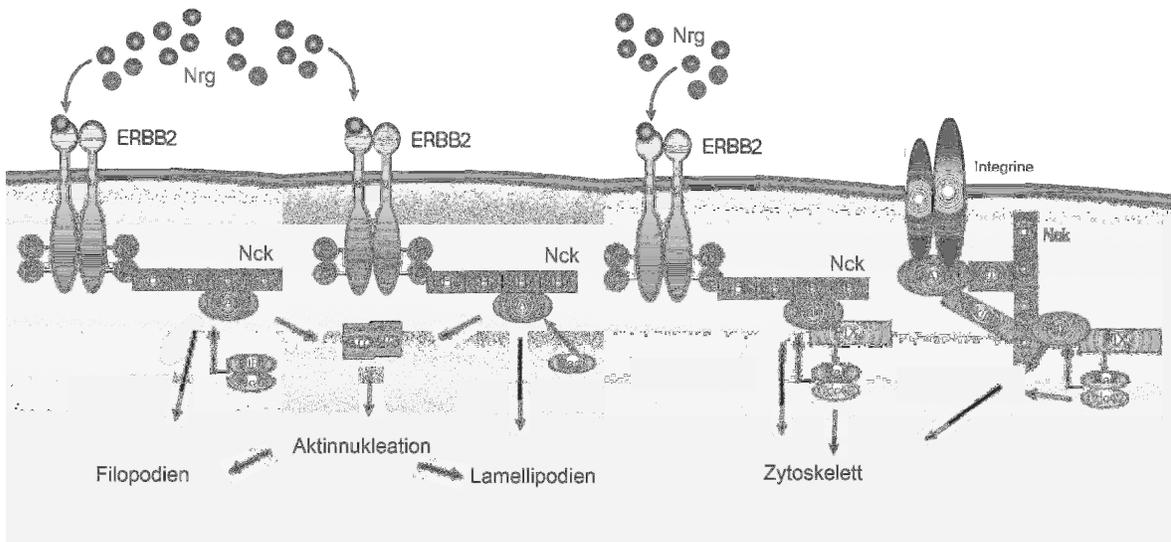


Abbildung 27: Schematische Zusammenfassung möglicher molekularer Mechanismen der veränderten Migrationsrate der T47D-Zellen

4.3.4 Intrazelluläre MAPK- und AKT/PKB-Signalwege

Um den molekularen Mechanismus der inhibitorischen Wirkung der Nck-Mutanten auf die Migration der T47D-Brustkrebszellen näher zu beleuchten, wurde die Aktivierungsrate einiger Nrg-Haupteffektorsignalwege in den Mutantenzellen untersucht. Nrg1 β vermag, vermittelt durch ErbB2, eine Reihe von Signalkaskaden zu aktivieren, wobei in dieser Arbeit die MAPK und PKB/Akt-Signalgruppen untersucht wurden (Warren and Landgraf, 2006). Sowohl MAPK- als auch Akt-Signalwege spielen eine zentrale Rolle in der durch ErbB2- und Nrg-induzierten Onkogenese von Brustkrebszellen: Akt dient als Schaltstelle von ErbB2-vermittelter Tumorentstehung und Metastasierung; MAPK dient als Agent für die durch Nrg1-induzierten aggressiven Brustkrebsphänotypen (Ju et al., 2007).

Nrg1 β aktiviert Mitglieder der MAPK-Signalproteinfamilie, die aufgrund unterschiedlicher Motive innerhalb ihrer Aktivierungsloops in drei Gruppen eingeteilt wird: p42/44MAPK (Erk), p38MAPK und JNK. MAPK haben wohlbekannte Funktionen in der Zellproliferation, Onkogenese und Zelldifferenzierung; es gibt jedoch zunehmende Evidenz dafür, dass diese Gruppe essentiell für die Zellmigration ist. Eine Blockierung dieser Signalwege führt zu einer verminderten Zellmigration in Brustkrebszellen (Huang et al., 2004; Marone et al., 2004).

Die p42/44 MAPK sind die am ausführlichsten untersuchte Unterklasse der MAPK. Mehrere Studien haben auch auf ihre Rolle in der Zellmigration hingewiesen: p42/44 MAPK Mutanten zeigen, dass konstitutiv aktive MAPK die Zellmigration fördern (Klemke et al., 1997; Marone et al., 2004) In T47D Zellen sind sie dabei essentiell für die Weiterleitung von ErbB2-induzierten promigratorischen Signalen (Marone et al., 2004). Nach Stimulation mit Nrg1 β kommt es in T47D-Brustkrebszellen zu einem starken Anstieg von MAPK-Aktivität (Abbildung 14), wodurch sie angeregt werden, *downstream-Ziele* wie z.B. die *myosin light chain kinase* (MLCK) und FAK zu phosphorylieren, (Klemke et al., 1997; Liu et al., 2002)

Auch die p38MAPK spielt eine wichtige Rolle in der Zellmigration und ist unerlässlich für die Weiterleitung von promigratorischen ErbB2-Signalen in T47D Brustkrebszellen (Adam et al., 1998; Marone et al., 2004). Ihre spezifische Rolle im Nrg-Signalsystem scheint dabei die Vermittlung der Nrg-induzierten Phosphorylierung von Paxillin zu sein (Vadlamudi et al., 1999).

Auch JNK wird nach Stimulierung mit Nrg in Brustkrebszellen aktiviert (Abbildung 14) und es wurde in mehreren Zelltypen eine promigratorische Wirkung festgestellt (Huang et al., 2004); interessant ist hierbei auch, dass viele Signalwege, die die Zellmigration kontrollieren wie zum Beispiel Rac, FAK und Src, bei JNK zusammenlaufen und JNK durch Proteine wie Pak aktiviert wird (Almeida et al., 2000). JNK phosphoryliert wiederum mehrere zytoskelett-assoziierte Proteine wie *microtubule associated proteins* (MAP) und auch Paxillin (Huang et al., 2004).

Die Akt/PKB Proteinkinasefamilie wurde mit einer Fülle von zellulären Signalprozessen und mit Schlüsselfunktionen in der Kontrolle des zellulären Metabolismus sowie von Proliferation und Apoptose in Verbindung gebracht. Als eines der Hauptziele der PI(3)K hat Akt auch eine zentrale Steuerfunktion in einer Vielfalt von menschlichen Krebsarten mit Einflüssen auf Tumorinitiation, -progression und –metastasierung. Im Hinblick auf letzteres dokumentieren Studien die verschiedensten Rollen von Mitgliedern der Akt-Familie in der Regulation von Zellbewegung durch Einflussnahme auf verschiedene Regulatoren des Aktinzytoskeletts, auf die Zellinteraktion mit der extrazellulären Matrix, auf die Expression von Motilitätsgenen und auf die Zellpolarität (Stambolic and Woodgett, 2006). Akt/PKB ist hierbei ebenso wie MAPK essentiell für die Migration von T47D-Brustkrebszellen (Marone et al., 2004). Zusammenfassend schien die Bestimmung des Aktivierungsniveaus dieser Signalwege ein wichtiger Schritt in der Aufdröselung der Rolle von Nck in ErbB2-vermittelten Signalwegen (Bai and Luoh, 2008; Kim et al., 2008).

Das Phosphorylierungsniveau der MAPK und der Akt/PKB-Signalwege wurde durch die dominant-negativen Nck-Mutanten nicht beeinflusst; Ncks scheinen somit keine unentbehrliche Rolle in der Aktivierung dieser Signalwege in T47D Brustkrebszellen zu spielen. Ncks vermitteln ihre promigratorische Wirkung somit wahrscheinlich über andere Signalkaskaden, die nicht essentiell für eine MAPK/Akt sind. Dies steht im Einklang mit Indizien anderer Arbeiten: dominant-negative Nck-Konstrukte beeinflussten—im Gegensatz zu Grb2 und Crk—die MAPK Aktivierung als Antwort auf eine EGF-Stimulation nicht (Tanaka et al., 1995). Im Falle der Zellmigration und als auf Antwort von Ang1 wird diese über mindestens zwei unabhängige Signalwege gesteuert: der erste involviert die Aktivität von PI3K/Akt und der zweite den Aufbau eines ternären Dok-Nck-Pak Komplexes sowie eine anschließende Aktivierung der Pak-Kinase (Master et al., 2001). Auch die Überexpression von Dok als Nck-Bindungspartner kann Zellbewegung verstärken, ohne jedoch dabei die Aktivität der MAPK zu beeinflussen (Noguchi et al., 1999). Diese Analogien anderer Untersuchungen müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet

werden, da es sich um unterschiedlich Zellsysteme und Zellrezeptoren handelt. Die verminderte Migration von MAPK/Akt-depletierten Zellen kombiniert mit einer gleich bleibenden Phosphorylierung der Nck-Mutanten impliziert auch, dass eine MAPK/Akt Aktivierung zwar eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Bedingung für eine intakte Zellmigration in T47D Brustkrebszellen ist.

Diese Schlussfolgerung erscheint nur triftig vor dem Hintergrund der Komplexität der molekularen Regulation der Migrationsmaschinerie, die sicherlich eine Reihe unabhängiger Signalwege zur Steuerung verschiedener Komponenten verlangt. Außerdem verfügen Zellsysteme, und vor allem auch Organismen über Kompensationsmechanismen, die den Ausfall einzelner Signalwege ausgleichen. In vorklinischen Modellversuchen zum Beispiel zeigen Tumorzellen nach Behandlung mit ErbB-gerichteten Tyrosinkinase-Inhibitoren und Antikörpern eine schnelle Herunterregulierung der PI3K/AKT-, MAPK-, SRC- und STAT-Signalwege (Hynes and Lane, 2005). Trotz ihrer klinischen Wirksamkeit konnte dieser Befund in den eigentlichen Tumorgeweben nicht so stark beobachtet werden wie in den vorklinischen Studien. Die physiologische und auch therapeutische Bedeutung einzelner Regulationskomplexe sollte jedoch trotzdem nicht vernachlässigt werden. In der Krebsentstehung kann bereits die Abberation eines singulären Signalweges durch Überexpression zu einem motilen, invasiven Phänotyp führen. Auf der anderen Seite kann ein einziges Protein die Migrationsrate von Brustkrebszellen erheblich reduzieren. Vor diesem Hintergrund scheint die genaue Untersuchung der einzelnen Bausteine der Migrations- und Metastasierungssysteme von Krebszellen eine wichtige Voraussetzung neuer therapeutischer Ansätze.

4.3.5 Proliferation

Nrg1 übt in Brustkrebszellen *in vivo* eine duale Funktion aus, indem es sowohl Proliferation als auch Differenzierung induziert (Stove and Bracke, 2004). Ein Verlust dieser Balance durch eine Veränderung in der Expression von Liganden oder Rezeptoren wirkt somit an Transformation, Tumorprogression und Metastasierung mit. Diese duale Rolle von Nrg1 *in vivo* wird auch durch die verschiedenen Effekte auf Brustkrebszellen *in vitro* deutlich: in einigen Zellsystemen fördert es Proliferation (Graus-Porta et al., 1995; Aguilar et al., 1999), wohingegen es in anderen zu einer stärkeren Differenzierung führt (Marte et al., 1995; Aguilar et al., 1999). In den meisten Brustkrebszellen jedoch, die ErbBR exprimieren, ist Nrg1 ein potenter mitogener Faktor. Anhand einer Reihe von verschiedenen Assays verschiedenen von Brustkrebszelllinien mit

unterschiedlichen ErbB2-Expressionsniveaus konnte *in vitro* und *in vivo* eine klare wachstumsfördernde Rolle von Nrg1 nachgewiesen werden (Lewis et al., 1996; Aguilar et al., 1999).

Auch in unserer Studie war ein wachstumsfördernder Effekt von Nrg1 β auf T47D Zellen im XTT-Proliferationsassay auszumachen (Abbildung 24). Der XTT-Proliferationsassay misst die metabolische Zellaktivität und erlaubt neben der Proliferation auch die Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen. Diese Eigenschaft machte ihn zur geeigneten Methode für unsere Studie, da somit auch gleichzeitig die Lebensfähigkeit der transfizierten Zellen kontrolliert werden konnte. Der beobachtete proliferationsfördernde Effekt von Nrg1 β war relativ schwach und weitaus geringfügiger als die beobachtete promigratorische Wirkung. Worauf dieser trotz des relativ hohen ErbB2-Expressionsniveaus schwache Einfluss zurückzuführen ist, bleibt rein spekulativ; in anderen Studien blieb die mitogene Stimulation exogenen Nrg1 weniger prominent, wenn die Zellen selber schon Nrg1 auf autokrine Weise produzierten (Neve et al., 2002). Im Hinblick auf die Ergebnisse der Migrationsversuche war es jedoch von zentraler Bedeutung, dass die Lebensfähigkeit der Mutantenzellen gegenüber den Kontrollen (mit gfp-Konstrukten transfizierten Zellen) unverändert blieb, und dass die Transfektion der Nck-Mutanten keinen Einfluss auf die basale Proliferationsrate der Zellen hat. Letzteres könnte potentiell eine Verfälschung der im Migrationsversuch detektierten Resultate bewirken.

4.3.6 Das Nrg-ErbB2-Nck-Interaktom-neue therapeutische Ansätze?

Die verschiedenen Ebenen des in dieser Arbeit untersuchten Signalsystems—extrazellulärer Ligand (Nrg), Rezeptor (ErbB2) und intrazellulärer Effektor (Nck)—können unabhängig voneinander ein promigratorisches Potential in menschlichen Krebszellen ausüben. Die Rolle von Nrg und ErbB2 in Krebszellen und in der Krebszellmetastasierung wurde bereits in der Einführung erläutert (siehe Abschnitt 1.6). Auch für die intrazelluläre Effektorebene gibt es Indizien für dessen Rolle in der Metastasierung von Krebszellen. So ist Nck1 wie Cdc42 und WIP entscheidend für die EGF-induzierte Ausbildung von Invadopodien. Letztere sind von Krebszellen gebildete vertikale Membranausstülpungen, die extrazelluläre Matrix degradieren und notwendig sind für die Durchbrechung der Basalmembran von Blutgefäßen (Chen, 1989; Condeelis and Segall, 2003). Nck scheint hier ein Ankerprotein zu sein zwischen Wachstumsrezeptorsignalen und den Regulatoren des Aktinzytoskeletts, die für tumorassoziierte Metastasierungsprozesse verantwortlich sind. Intrazelluläre Partner von Nck in der Regulation

des Aktinzytoskeletts wie N-WASP, Cdc42, Arp2/3, LIM, Pak und Cofilin sind in kolorektalen Tumoren und invasiven Brustkrebszellen verstärkt exprimiert (Yanagawa et al., 2001; Wang et al., 2004; Kumar et al., 2006).

In dieser Arbeit konnte die unabhängige Rolle der Akteure auf verschiedenen Ebenen in Metastasierungsprozessen von Brustkrebszellen anteilig verknüpft werden, indem gezeigt wurde, dass Nck1 und Nck2 wichtig für die durch Nrg1 β -induzierte und von ErbB2-vermittelte Migration von menschlichen T47D Brustkrebszellen sind.

Direkte Krebstherapeutika wie Trastuzumab haben aufgrund ihrer hohen Spezifität und geringen Nebenwirkungen als ein fester Baustein in der modernen Krebstherapie etabliert. Jedoch sind sie in ihrer Wirksamkeit limitiert: zum Beispiel spricht nur etwa ein Drittel der Patienten mit ErbB2-überexprimierendem Brustkrebs auf eine Behandlung mit Trastuzumab an (Vogel et al., 2002). Auch vorklinische Studien zeigen, dass ErbB-Liganden die Fähigkeit zur Blockade von *downstream*-Signalwegen und Zellproliferation von Trastuzumab umgehen können. Dabei gibt es verschiedene wahrscheinliche Erklärungen für dieses Phänomen. Zum einen kann Trastuzumab auf der Rezeptorebene aufgrund seiner Bindung an die ErbB2-II-Domäne nicht daran hindern, Heterodimere einzugehen (Motoyama et al., 2002). Ein weiteres wichtiges Erklärungsmodell ist eine von ErbB2 unabhängige, konstitutive Aktivierung von *downstream*-Signalwegen. Es wird zum Beispiel angenommen, dass eine ständige Aktivierung des Akt-Signalweges durch Aberrationen *downstream* der ErbBR an der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Trastuzumab beteiligt ist. So sind die Aktivierung von Akt oder auch eine verminderte Funktion von PTEN, einem negativen Regulator von PI3K, Ursachen für die Therapieresistenz von Tumorzellen sind (She et al., 2003).

Es scheint also wichtig, zum einen Krebsarten neben dem ErbB2-Status auch auf die Aktivierung und Expression selektiver *downstream*-Aktivatoren zu untersuchen. Zum anderen, und gerade auch weil zunehmend deutlich wird, dass das ErbBR-System kein starres Signalsystem, sondern ein dynamisch-moduliertes Netzwerk ist, kann eine detaillierte Untersuchung von spezifischen *downstream*-Signalwegen wertvolle Ansätze für neue Therapeutika bieten. Im Falle der Rho-GTPasen sind solche Inhibitoren bereits identifiziert: ein spezifischer Inhibitor des RhoA-Effektormoleküls Rho-kinase (ROK) zeigte anti-metastasierende Aktivität in vivo (Fritz and Kaina, 2006).

Auch Nck-Proteine könnten wertvolle Ansätze in der Krebstherapie bieten. Über ihre vielzähligen Interaktionspartner arbeiten Nck-Proteine als Verknüpfungspunkte der Regulationsmaschinerie des Zytoskeletts, indem sie *upstream*-Signale von Rezeptoren wie RTKs mit *downstream*-Effektoren verknüpfen. Aufgrund der wichtigen Rolle solcher Adaptorproteine in Krebszellen ist anzunehmen, dass detaillierte strukturelle und funktionale Untersuchungen zur Interaktion zwischen den einzelnen Partnern wichtige Informationen zur Entwicklung neuer Therapeutika bereitstellen könnten. Ein wichtiger limitierender Faktor für Ncks als therapeutisches Target sind deren weit reichende Expression und Funktion, wodurch eine tumorspezifische Wirkung verhindert wird. Als ubiquitär exprimiertes Adaptormolekül arbeitet Nck auf kombinatorische Weise mit Proteinen zusammen, die selektiv in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, wodurch *in vivo* spezifische ausgetüftelte Aktin-basierte Regulationssysteme zellulärer Prozesse erreicht werden. Ein möglicher Ansatzpunkt Nck-basierter Therapeutika könnte somit auf der Blockade von Interaktionen von Ncks mit spezifischen Effektormolekülen bestehen. So konnte zum Beispiel ein Peptid entwickelt werden, das die Interaktionsstelle von Nck an Pak blockiert und sowohl Zellmigration als auch Angiogenese inhibiert (Kiosses et al., 2002).

Insgesamt sind Inhibitoren von Nck in der Krebstherapie noch weitgehend unerforscht und weiterreichende Untersuchungen der Funktion von Nck in Krebszellen bilden ein attraktives Feld zur Identifizierung von neuen Ansätzen für Krebstherapeutika.

5 Zusammenfassung

Die ErbB-Rezeptortyrosinkinasen (ErbBR) setzen sich aus einer Gruppe von vier strukturverwandten Mitgliedern zusammen: dem *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptor, ErbB2, ErbB3 und ErbB4. ErbBR spielen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Umstrukturierungsprozessen im Zytoskelett eine Rolle. Darüber hinaus sind sie in einer Reihe von epithelialen Tumoren überexprimiert. Insbesondere ErbB2 ist aufgrund dieser Eigenschaften zunehmende klinische Aufmerksamkeit in der Krebstherapie und -diagnostik gewidmet worden. Vor allem in der Behandlung von Brustkrebs haben ErbB2-basierte Therapeutika einen festen Platz eingenommen. ErbB2 wird durch Neuregulin-1 β (Nrg1 β) aktiviert, indem letzteres eine Heterodimerisierung des Rezeptors mit ErbB3 und ErbB4 auslöst. In Brustkrebszellen induziert Nrg1 β eine Reihe zellulärer Effekte, wie z.B. Proliferation und Migration. Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde das SH2-SH3-Adaptormolekül Nck2 als intrazellulärer Bindungspartner von ErbB2 ausgemacht. In dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen der SH2-Domäne von Nck2 und ErbB2 in humanen Zellen durch Überexpressionsstudien und endogene Koimmunpräzipitation in Brustkrebszellen bestätigt werden. Anhand von Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass sowohl Nck1 als auch Nck2 eine essentielle Rolle in durch Nrg-induzierten und der ErbB2-vermittelten Migrationsprozessen in T47D Brustkrebszellen spielen. Morphologische Studien legten dabei nahe, dass dies auf der Funktion von Nck-Proteinen in der Regulation des Zytoskeletts während der Zellmigration beruht. Die Expression von dominant-negativen Nck-Mutanten hatte hierbei weder einen Effekt auf die Nrg-induzierte Proliferation der verwendeten Brustkrebszellen, noch auf die Aktivierung von MAPK- und Akt-Signalwegen. Die verschiedenen Ebenen untersuchten Signalsystems, extrazellulärer Ligand (Nrg), Rezeptor (ErbB2) und intrazellulärer Effektor (Nck), könnten unabhängig voneinander ein promigratorisches Signal in menschlichen Brustkrebszellen auslösen. In dieser Arbeit konnten diese unabhängigen Akteure in Metastasierungsprozessen von Brustkrebszellen zum Teil verknüpft werden, indem gezeigt wurde, dass Nck1 und Nck2 essentiell für die durch Nrg1 β -induzierte und von ErbB2-vermittelte Migration von menschlichen T47D Brustkrebszellen ist.

6 Schriftenverzeichnis

- Adam, L., Vadlamudi, R., Kondapaka, S. B., Chernoff, J., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1998). Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J Biol Chem* 273, 28238-28246.
- Adamson, E. D. (1990). Developmental activities of the epidermal growth factor receptor. *Curr Top Dev Biol* 24, 1-29.
- Aguilar, Z., Akita, R. W., Finn, R. S., Ramos, B. L., Pegram, M. D., Kabbinavar, F. F., Pietras, R. J., Pisacane, P., Sliwkowski, M. X., and Slamon, D. J. (1999). Biologic effects of heregulin/neu differentiation factor on normal and malignant human breast and ovarian epithelial cells. *Oncogene* 18, 6050-6062.
- Akiyama, T., Matsuda, S., Namba, Y., Saito, T., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1991). The transforming potential of the c-erbB-2 protein is regulated by its autophosphorylation at the carboxyl-terminal domain. *Mol Cell Biol* 11, 833-842.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (New York and London: Garland Science).
- Almeida, E. A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C. R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D. D., and Damsky, C. H. (2000). Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol* 149, 741-754.
- Atlas, E., Cardillo, M., Mehmi, I., Zahedkargar, H., Tang, C., and Lupu, R. (2003). Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo. *Mol Cancer Res* 1, 165-175.
- Bai, T., and Luoh, S. W. (2008). GRB-7 facilitates HER-2/Neu-mediated signal transduction and tumor formation. *Carcinogenesis* 29, 473-479.
- Birge, R. B., Knudsen, B. S., Besser, D., and Hanafusa, H. (1996). SH2 and SH3-containing adaptor proteins: redundant or independent mediators of intracellular signal transduction. *Genes Cells* 1, 595-613.
- Biyasheva, A., Svitkina, T., Kunda, P., Baum, B., and Borisy, G. (2004). Cascade pathway of filopodia formation downstream of SCAR. *J Cell Sci* 117, 837-848.
- Bladt, F., Aippersbach, E., Gelkop, S., Strasser, G. A., Nash, P., Tafuri, A., Gertler, F. B., and Pawson, T. (2003). The murine Nck SH2/SH3 adaptors are important for the development of mesoderm-derived embryonic structures and for regulating the cellular actin network. *Mol Cell Biol* 23, 4586-4597.
- Bokoch, G. M. (2000). Regulation of cell function by Rho family GTPases. *Immunol Res* 21, 139-148.
- Bokoch, G. M., Wang, Y., Bohl, B. P., Sells, M. A., Quilliam, L. A., and Knaus, U. G. (1996). Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J Biol Chem* 271, 25746-25749.

- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* *115*, 453-466.
- Braverman, L. E., and Quilliam, L. A. (1999). Identification of Grb4/Nckbeta, a src homology 2 and 3 domain-containing adapter protein having similar binding and biological properties to Nck. *J Biol Chem* *274*, 5542-5549.
- Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., and Riethmacher, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* *12*, 1825-1836.
- Buday, L., Wunderlich, L., and Tamas, P. (2002). The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal* *14*, 723-731.
- Burden, S., and Yarden, Y. (1997). Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* *18*, 847-855.
- Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1997). Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* *269*, 459-467.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* *2*, 563-572.
- Chen, M., She, H., Kim, A., Woodley, D. T., and Li, W. (2000a). Nckbeta adapter regulates actin polymerization in NIH 3T3 fibroblasts in response to platelet-derived growth factor bb. *Mol Cell Biol* *20*, 7867-7880.
- Chen, W. T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool* *251*, 167-185.
- Chen, X., Yeung, T. K., and Wang, Z. (2000b). Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3. *Biochem Biophys Res Commun* *277*, 757-763.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* *421*, 756-760.
- Condeelis, J., and Segall, J. E. (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* *3*, 921-930.
- Dankort, D., Jeyabalan, N., Jones, N., Dumont, D. J., and Muller, W. J. (2001a). Multiple ErbB-2/Neu Phosphorylation Sites Mediate Transformation through Distinct Effector Proteins. *J Biol Chem* *276*, 38921-38928.
- Dankort, D., Maslikowski, B., Warner, N., Kanno, N., Kim, H., Wang, Z., Moran, M. F., Oshima, R. G., Cardiff, R. D., and Muller, W. J. (2001b). Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB-2)-induced mammary tumorigenesis: implications for human breast cancer. *Mol Cell Biol* *21*, 1540-1551.
- DiCesare, S. (2001) The Guanine Nucleotide Exchanger Vav2 Interacts with c-ErbB-2 and Induces Alveolar Morphogenesis of Mammary Epithelial Cells, Humboldt Universität, Berlin.

- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* *418*, 790-793.
- Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H., and Moore, M. W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* *124*, 4999-5011.
- Esparis-Ogando, A., Diaz-Rodriguez, E., Montero, J. C., Yuste, L., Crespo, P., and Pandiella, A. (2002). Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* *22*, 270-285.
- Falls, D. L. (2003). Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* *284*, 14-30.
- Fawcett, J., and Pawson, T. (2000). Signal transduction. N-WASP regulation--the sting in the tail. *Science* *290*, 725-726.
- Franklin, M. C., Carey, K. D., Vajdos, F. F., Leahy, D. J., de Vos, A. M., and Sliwkowski, M. X. (2004). Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* *5*, 317-328.
- Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G., and Way, M. (1999). Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* *401*, 926-929.
- Fritz, G., and Kaina, B. (2006). Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* *6*, 1-14.
- Galisteo, M. L., Chernoff, J., Su, Y. C., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. (1996). The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem* *271*, 20997-21000.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* *11*, 495-505.
- Garrity, P. A., Rao, Y., Salecker, I., McGlade, J., Pawson, T., and Zipursky, S. L. (1996). *Drosophila* photoreceptor axon guidance and targeting requires the dreadlocks SH2/SH3 adapter protein. *Cell* *85*, 639-650.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* *378*, 390-394.
- Goicoechea, S. M., Tu, Y., Hua, Y., Chen, K., Shen, T. L., Guan, J. L., and Wu, C. (2002). Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* *34*, 791-805.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., and Hynes, N. E. (1995). Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* *15*, 1182-1191.

- Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A., and Carraway, K. L., 3rd (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8132-8136.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509-514.
- Higgs, H. N. (2001). Actin nucleation: nucleation-promoting factors are not all equal. *Curr Biol* *11*, R1009-1012.
- Holbro, T., Beerli, R. R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C. F., 3rd, and Hynes, N. E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8933-8938.
- Howard, P. L., Chia, M. C., Del Rizzo, S., Liu, F. F., and Pawson, T. (2003). Redirecting tyrosine kinase signaling to an apoptotic caspase pathway through chimeric adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 11267-11272.
- Howe, A. K. (2001). Cell adhesion regulates the interaction between Nck and p21-activated kinase. *J Biol Chem* *276*, 14541-14544.
- Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M. D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* *117*, 4619-4628.
- Hubbard, S. R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* *273*, 11987-11990.
- Huebner, K., Kastury, K., Druck, T., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Pelicci, G., Lowenstein, E., Li, W., Park, S. H., Cannizzaro, L., and et al. (1994). Chromosome locations of genes encoding human signal transduction adapter proteins, Nck (NCK), Shc (SHC1), and Grb2 (GRB2). *Genomics* *22*, 281-287.
- Hynes, N. E., and Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* *5*, 341-354.
- Janes, P. W., Lackmann, M., Church, W. B., Sanderson, G. M., Sutherland, R. L., and Daly, R. J. (1997). Structural determinants of the interaction between the erbB2 receptor and the Src homology 2 domain of Grb7. *J Biol Chem* *272*, 8490-8497.
- Jones, J. T., Akita, R. W., and Sliwkowski, M. X. (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* *447*, 227-231.
- Jones, R. B., Gordus, A., Krall, J. A., and MacBeath, G. (2006). A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature* *439*, 168-174.
- Ju, X., Katiyar, S., Wang, C., Liu, M., Jiao, X., Li, S., Zhou, J., Turner, J., Lisanti, M. P., Russell, R. G., et al. (2007). Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 7438-7443.
- Keitel, K., DiCesare, S., Ruiz, P., and Effertz, K. (2008). Essential Role of Nck1 and Nck2 in Neuregulin-induced Breast Cancer Cell Migration. Submitted for publication.

- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., and Rosen, M. K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* *404*, 151-158.
- Kim, K. K., Lee, J. J., Yang, Y., You, K. H., and Lee, J. H. (2008). Macrophage inhibitory cytokine-1 activates AKT and ERK-1/2 via the transactivation of ErbB2 in human breast and gastric cancer cells. *Carcinogenesis* *29*, 704-712.
- Kiosses, W. B., Daniels, R. H., Otey, C., Bokoch, G. M., and Schwartz, M. A. (1999). A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol* *147*, 831-844.
- Kiosses, W. B., Hood, J., Yang, S., Gerritsen, M. E., Cheresch, D. A., Alderson, N., and Schwartz, M. A. (2002). A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. *Circ Res* *90*, 697-702.
- Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P., and Cheresch, D. A. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* *137*, 481-492.
- Kokai, Y., Cohen, J. A., Drebin, J. A., and Greene, M. I. (1987). Stage- and tissue-specific expression of the neu oncogene in rat development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 8498-8501.
- Kumar, R., Gururaj, A. E., and Barnes, C. J. (2006). p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* *6*, 459-471.
- Kuramochi, Y., Guo, X., and Sawyer, D. B. (2006). Neuregulin activates erbB2-dependent src/FAK signaling and cytoskeletal remodeling in isolated adult rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* *41*, 228-235.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* *84*, 359-369.
- Le, X. F., Marcelli, M., McWatters, A., Nan, B., Mills, G. B., O'Brian, C. A., and Bast, R. C., Jr. (2001). Heregulin-induced apoptosis is mediated by down-regulation of Bcl-2 and activation of caspase-7 and is potentiated by impairment of protein kinase C alpha activity. *Oncogene* *20*, 8258-8269.
- Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* *378*, 394-398.
- Lehmann, J. M., Riethmuller, G., and Johnson, J. P. (1990). Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3. *Nucleic Acids Res* *18*, 1048.
- Lewis, G. D., Lofgren, J. A., McMurtrey, A. E., Nuijens, A., Fendly, B. M., Bauer, K. D., and Sliwkowski, M. X. (1996). Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res* *56*, 1457-1465.
- Li, W., Fan, J., and Woodley, D. T. (2001). Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene* *20*, 6403-6417.

- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A. V., Wu, G., Li, L., Liu, M., *et al.* (2003). Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* 114, 215-227.
- Liu, Z. X., Yu, C. F., Nickel, C., Thomas, S., and Cantley, L. G. (2002). Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem* 277, 10452-10458.
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J., and Kuhn, R. (2001). Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep* 2, 850-857.
- Lu, W., and Mayer, B. J. (1999). Mechanism of activation of Pak1 kinase by membrane localization. *Oncogene* 18, 797-806.
- Machesky, L. M., and Insall, R. H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 8, 1347-1356.
- Maier, C. S., and Deinzer, M. L. (2005). Protein conformations, interactions, and H/D exchange. *Methods Enzymol* 402, 312-360.
- Marone, R., Hess, D., Dankort, D., Muller, W. J., Hynes, N. E., and Badache, A. (2004). Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *Nat Cell Biol* 6, 515-522.
- Marte, B. M., Jeschke, M., Graus-Porta, D., Taverna, D., Hofer, P., Groner, B., Yarden, Y., and Hynes, N. E. (1995). Neu differentiation factor/hereregulin modulates growth and differentiation of HC11 mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol* 9, 14-23.
- Master, Z., Jones, N., Tran, J., Jones, J., Kerbel, R. S., and Dumont, D. J. (2001). Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *Embo J* 20, 5919-5928.
- Mayer, B. J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 114, 1253-1263.
- Mazumdar, A., Adam, L., Boyd, D., and Kumar, R. (2001). Heregulin regulation of urokinase plasminogen activator and its receptor: human breast epithelial cell invasion. *Cancer Res* 61, 400-405.
- Menard, S., Casalini, P., Campiglio, M., Pupa, S. M., and Tagliabue, E. (2004). Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* 61, 2965-2978.
- Meyer, D., and Birchmeier, C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386-390.
- Meyer, S., Hafner, C., Guba, M., Flegel, S., Geissler, E. K., Becker, B., Koehl, G. E., Orso, E., Landthaler, M., and Vogt, T. (2005). Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells. *Int J Oncol* 27, 1197-1206.
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Mizuno, N., and Itoh, H. (2004). The adaptor protein Nck1 mediates endothelin A receptor-regulated cell migration through the Cdc42-dependent c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 279, 34336-34342.

- Motoyama, A. B., Hynes, N. E., and Lane, H. A. (2002). The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 62, 3151-3158.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6181-6186.
- Naidu, R., Yadav, M., Nair, S., and Kutty, M. K. (1998). Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 78, 1385-1390.
- Neve, R. M., Holbro, T., and Hynes, N. E. (2002). Distinct roles for phosphoinositide 3-kinase, mitogen-activated protein kinase and p38 MAPK in mediating cell cycle progression of breast cancer cells. *Oncogene* 21, 4567-4576.
- Nikolopoulos, S. N., and Turner, C. E. (2001). Integrin-linked kinase (ILK) binding to paxillin LD1 motif regulates ILK localization to focal adhesions. *J Biol Chem* 276, 23499-23505.
- Noguchi, T., Matozaki, T., Inagaki, K., Tsuda, M., Fukunaga, K., Kitamura, Y., Kitamura, T., Shii, K., Yamanashi, Y., and Kasuga, M. (1999). Tyrosine phosphorylation of p62(Dok) induced by cell adhesion and insulin: possible role in cell migration. *Embo J* 18, 1748-1760.
- Olayioye, M. A., Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Rohrer, J., Gay, B., and Hynes, N. E. (1998). ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18, 5042-5051.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* 19, 3159-3167.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M. F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292, 1502-1506.
- Park, D. (1997). Cloning, sequencing, and overexpression of SH2/SH3 adaptor protein Nck from mouse thymus. *Mol Cells* 7, 231-236.
- Partanen, A. M. (1990). Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in the development of epithelial-mesenchymal organs of the mouse. *Curr Top Dev Biol* 24, 31-55.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-580.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Pellegrin, S., and Mellor, H. (2005). The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol* 15, 129-133.
- Pinkas-Kramarski, R., Eilam, R., Alroy, I., Levkowitz, G., Lonai, P., and Yarden, Y. (1997). Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene* 15, 2803-2815.

- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B. J., Sela, M., and Yarden, Y. (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *Embo J* 15, 2452-2467.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Riese, D. J., 2nd, van Raaij, T. M., Plowman, G. D., Andrews, G. C., and Stern, D. F. (1995). The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* 15, 5770-5776.
- Rio, C., Rieff, H. I., Qi, P., Khurana, T. S., and Corfas, G. (1997). Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* 19, 39-50.
- Rivera, G. M., Antoku, S., Gelkop, S., Shin, N. Y., Hanks, S. K., Pawson, T., and Mayer, B. J. (2006). Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9536-9541.
- Rivera, G. M., Briceno, C. A., Takeshima, F., Snapper, S. B., and Mayer, B. J. (2004). Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Curr Biol* 14, 11-22.
- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J. (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* 276, 26448-26452.
- Rottner, K., Hall, A., and Small, J. V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol* 9, 640-648.
- Sachs, M., Weidner, K. M., Brinkmann, V., Walther, I., Obermeier, A., Ullrich, A., and Birchmeier, W. (1996). Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 133, 1095-1107.
- Sanchez-Madrid, F., and del Pozo, M. A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 18, 501-511.
- Schaller, M. D. (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20, 6459-6472.
- Segatto, O., Pelicci, G., Giuli, S., Digiesi, G., Di Fiore, P. P., McClade, J., Pawson, T., and Pelicci, P. G. (1993). Shc products are substrates of erbB-2 kinase. *Oncogene* 8, 2105-2112.
- Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 7, 202-210.
- She, Q. B., Solit, D., Basso, A., and Moasser, M. M. (2003). Resistance to gefitinib in PTEN-null HER-overexpressing tumor cells can be overcome through restoration of PTEN function or pharmacologic modulation of constitutive phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt pathway signaling. *Clin Cancer Res* 9, 4340-4346.

Siegel, P. M., Ryan, E. D., Cardiff, R. D., and Muller, W. J. (1999). Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *Embo J* 18, 2149-2164.

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.

Snapper, S. B., Takeshima, F., Anton, I., Liu, C. H., Thomas, S. M., Nguyen, D., Dudley, D., Fraser, H., Purich, D., Lopez-Ilasaca, M., *et al.* (2001). N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol* 3, 897-904.

Spencer, K. S., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N. E., and Klemke, R. L. (2000). ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 148, 385-397.

Stambolic, V., and Woodgett, J. R. (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* 16, 461-466.

Steffen, A., Faix, J., Resch, G. P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J. V., Rottner, K., and Stradal, T. E. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell* 17, 2581-2591.

Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., *et al.* (2004). Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431, 525-526.

Stove, C., and Bracke, M. (2004). Roles for neuregulins in human cancer. *Clin Exp Metastasis* 21, 665-684.

Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M., and Borisy, G. G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 160, 409-421.

Sweeney, C., and Carraway, K. L., 3rd (2000). Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene* 19, 5568-5573.

Tanaka, M., Gupta, R., and Mayer, B. J. (1995). Differential inhibition of signaling pathways by dominant-negative SH2/SH3 adapter proteins. *Mol Cell Biol* 15, 6829-6837.

Tang, C. K., Perez, C., Grunt, T., Waibel, C., Cho, C., and Lupu, R. (1996). Involvement of heregulin-beta2 in the acquisition of the hormone-independent phenotype of breast cancer cells. *Cancer Res* 56, 3350-3358.

Tsai, M. S., Shamon-Taylor, L. A., Mehmi, I., Tang, C. K., and Lupu, R. (2003). Blockage of heregulin expression inhibits tumorigenicity and metastasis of breast cancer. *Oncogene* 22, 761-768.

Tu, Y., Li, F., Goicoechea, S., and Wu, C. (1999). The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol* 19, 2425-2434.

- Tu, Y., Li, F., and Wu, C. (1998). Nck-2, a novel Src homology2/3-containing adaptor protein that interacts with the LIM-only protein PINCH and components of growth factor receptor kinase-signaling pathways. *Mol Biol Cell* *9*, 3367-3382.
- Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S., and Leventhal, P. S. (1999). Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol* *145*, 851-863.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., and Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* *16*, 5276-5287.
- Vadlamudi, R., Adam, L., Talukder, A., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1999). Serine phosphorylation of paxillin by heregulin-beta1: role of p38 mitogen activated protein kinase. *Oncogene* *18*, 7253-7264.
- Vaynberg, J., Fukuda, T., Chen, K., Vinogradova, O., Velyvis, A., Tu, Y., Ng, L., Wu, C., and Qin, J. (2005). Structure of an ultraweak protein-protein complex and its crucial role in regulation of cell morphology and motility. *Mol Cell* *17*, 513-523.
- Vermeer, P. D., Einwalter, L. A., Moninger, T. O., Rokhlina, T., Kern, J. A., Zabner, J., and Welsh, M. J. (2003). Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* *422*, 322-326.
- Vindis, C., Teli, T., Cerretti, D. P., Turner, C. E., and Huynh-Do, U. (2004). EphB1-mediated cell migration requires the phosphorylation of paxillin at Tyr-31/Tyr-118. *J Biol Chem* *279*, 27965-27970.
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., *et al.* (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* *20*, 719-726.
- Vorobieva, N., Protopopov, A., Protopopova, M., Kashuba, V., Allikmets, R. L., Modi, W., Zabarovsky, E. R., Klein, G., Kisselev, L., and Graphodatsky, A. (1995). Localization of human ARF2 and NCK genes and 13 other NotI-linking clones to chromosome 3 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* *68*, 91-94.
- Wang, W., Goswami, S., Lapidus, K., Wells, A. L., Wyckoff, J. B., Sahai, E., Singer, R. H., Segall, J. E., and Condeelis, J. S. (2004). Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* *64*, 8585-8594.
- Warren, C. M., Kani, K., and Landgraf, R. (2006). The N-terminal domains of neuregulin 1 confer signal attenuation. *J Biol Chem* *281*, 27306-27316.
- Warren, C. M., and Landgraf, R. (2006). Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* *18*, 923-933.

- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* *281*, 105-108.
- Wu, C. (1999). Integrin-linked kinase and PINCH: partners in regulation of cell-extracellular matrix interaction and signal transduction. *J Cell Sci* *112* (Pt 24), 4485-4489.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* *64*, 7022-7029.
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., and Condeelis, J. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* *168*, 441-452.
- Yanagawa, R., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kameyama, M., Murata, K., Ishikawa, O., and Nakamura, Y. (2001). Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray. *Neoplasia* *3*, 395-401.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 127-137.
- Yin, H. L., and Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* *65*, 761-789.
- Yuste, L., Montero, J. C., Esparis-Ogando, A., and Pandiella, A. (2005). Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to heregulin. *Cancer Res* *65*, 6801-6810.
- Zamir, E., and Geiger, B. (2001). Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* *114*, 3577-3579.
- Zhao, Z. S., Manser, E., Loo, T. H., and Lim, L. (2000). Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* *20*, 6354-6363.

7 Abkürzungsverzeichnis

Akt/PKB	Protein Kinase B
Alpha-PIX	PAK-interactive exchange factor
Arp2/3	Actin-related protein 2 and 3 complex
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BSA	Bovine serum albumin
Cbl	Protooncogen des murinen CasNS-1 retrovirus transforming protein
Cdc42	Cell division cycle protein
CHO	Chinese hamster ovarian cells
CRIB	Cdc42/ Rac interactive binding
C-terminus	Carboxyl Terminus
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleoid acid
Dok	Dok Protein
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EC	Endothelial cells
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EphB1	Eph receptor B1
ErbBR	ErbB Rezeptor
FACS	Fluorescent-activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GGF	Glial growth factor

Grb2	Growth factor receptor-binding protein 2
Grb4	Growth factor receptor-binding protein 4; mouse Nck β / Nck2
HELA	Henrietta Lacks cervical cancer cells
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure
Hrg	Heregulin
ILK	Integrin-Linked Kinase
JNK/SAP	c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase
kDa	kiloDalton
M	mol/l
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEF	Mouse embryonic fibroblast
Met	Hepatocyte growth factor receptor
NAP	Nucleosome assembly protein
Nck	Eine aus zwei Genfamilien bestehende SH2/SH3 Adaptoren, die Nck/Nck α /Nck1 und Nck β /Nck2 /Grb4 enthält
NGF	Nerve growth factor
NIK	Nck-interacting Ste20 Kinase
Nrg	Neuregulin
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
Pak	P21 Rac/Cdc42-activated kinases
PBS	Phosphate buffered saline
PDGFR- β	Platelet-derived growth factor- β
PFA	Paraformaldehyd
PH-Motiv	Pleckstrin homology Motiv
PI-3K	Phosphoinositide Kinase-3
PINCH	particularly interesting new cysteine – histidine – rich protein
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PIX	Pak-interacting exchange factor
PLC γ 1	phospholipase C gamma1
PMSF	phenylmethanesulphonylfluorid
PRK2	Protein kinase C-related kinase 2
PTEN	phosphatase and tensin homologue gene
PxxP	Prolin-reiches Motif

pY	Phosphotyrosinrest
RT	Raumtemperatur
Scar	Suppressor of cAR
SDS	Sodium dodecylsulphate
SH2	Src homolge 2
SH3	Scr homologe 3
Shc	Scr homologous and collagen protein
siRNA	Small interfering RNA
SLAP	Src-like adaptor protein
SMDF	Sensory and motor neuron derived factor
TGF α	Transforming growth factor alpha
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane hydrochloride
VCA	Verprolin homology motif (V), cofilin homology motif (C) acidic motif (A)
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE	WASP family Verprolin-homologous protein
WIP	WASP-associated protein
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

8 Danksagungen

Allen Mitgliedern der von Prof. Dr. Patricia Ruiz geleiteten Arbeitsgruppe für ihre Kollegialität und ihre technische Hilfestellung.

Frau Dr. Karin Effertz und Frau Prof. Dr. Patricia Ruiz danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Anna-Maria Frischauf und Frau Priv. Doz. Dr. Christine Sers möchte ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung, wie den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 754.

Ich bedanke mich ebenso bei meinen Freunden, insbesondere bei Pascal Hasler, Carlotta Pipolo, Sacha Meuter, Andrea Wilcken und Lene Nettelbeck.

Ein besonderer Dank für die moralische und tatkräftige Unterstützung gilt schliesslich meiner Familie.