

# Phosphoryliertes L-Plastin verstärkt die Tumorzellmetastasierung

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

der Naturwissenschaftlich- Technischen Fakultät III und der Medizinischen  
Fakultät

**Universität des Saarlandes**

angefertigt am

Institut für Immunologie

**Ruprecht-Karls Universität Heidelberg**

vorgelegt von

**Selina Margaretha Riplinger**

Saarbrücken, 2012

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Vorsitzender: Prof. Dr. Volkhard Helms

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Yvonne Samstag

Akademischer Beisitzer: Dr. Gert-Wieland Kohring

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2012

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

**Publikationen:**

**Riplinger, S.M.**, F. Lasitschka, H. Kirchgessner, B. Jahraus, B. Schulte, G.H. Wabnitz, G. van der Pluijm, G. van der Horst, G.H. Hämmerling, I. Nackchbandi and Y. Samstag  
„Phosphorylated L-plastin promotes tumor cell metastasis“ *Cancer Research* 2012, *in preparation*

**Tagungsbeiträge:**

- 10/2011**      Poster „Downregulation of L-plastin reduces the migration and invasion of human tumor cells“  
*FEBS Advanced Lecture Course on Translational Cancer Research*  
Albufeira, Portugal
- 03/2011**      Poster „Downregulation of L-plastin reduces the migration and invasion of human tumor cells“  
*Keystone Symposia: Stem Cells, Cancer and Metastasis*  
Keystone, Colorado, USA

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
II.1	TUMORERKRANKUNGEN .....	1
II.1.1	<i>Allgemeine Einführung in die Biologie von Tumorerkrankungen .....</i>	<i>1</i>
II.1.2	<i>Die metastatische Kaskade .....</i>	<i>3</i>
II.1.2.1	Deadhäsion aus dem Zellkollektiv .....	4
II.1.2.2	Invasion in die extrazelluläre Matrix .....	5
II.1.2.3	Intravasation .....	6
II.1.2.4	Transendotheliale Migration und Extravasation .....	7
II.1.2.5	Etablierung einer Kolonie .....	7
II.1.3	<i>Das Prostatakarzinom .....</i>	<i>8</i>
II.1.4	<i>Das maligne Melanom .....</i>	<i>9</i>
II.2	L-PLASTIN .....	10
II.2.1	<i>Plastin-Isoformen .....</i>	<i>10</i>
II.2.2	<i>Struktur von L-Plastin .....</i>	<i>11</i>
II.2.3	<i>Funktion und Bedeutung von L-Plastin .....</i>	<i>12</i>
II.2.3.1	L-Plastin als Aktin bündelndes Protein .....	12
II.2.3.1.1	Aufbau und Aufgaben des Aktin-Zytoskeletts .....	12
II.2.3.1.2	Bündelung von F-Aktin durch L-Plastin .....	14
II.2.3.2	Zelluläre Funktionen von L-Plastin in Leukozyten .....	15
II.2.3.3	Phosphorylierung von L-Plastin .....	17
II.2.3.4	Ektopische Expression von L-Plastin in Krebszellen .....	19
II.3	ZIEL DER ARBEIT .....	20
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
III.1	MATERIALIEN .....	22
III.1.1	<i>Herstellerverzeichnis .....</i>	<i>22</i>
III.1.2	<i>Laboraausstattung .....</i>	<i>24</i>
III.1.3	<i>Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>25</i>
III.1.4	<i>Chemikalien .....</i>	<i>26</i>
III.1.5	<i>Puffer, Medien und Reagenzien .....</i>	<i>28</i>
III.1.5.1	Puffer und Medien für die Zellkulturarbeit .....	28
III.1.5.2	Medium für die Bakterienkultur .....	28
III.1.5.3	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE .....	28
III.1.5.4	Puffer und Lösungen für Glyzin-Gele .....	29
III.1.5.5	Puffer und Lösungen für WB .....	30
III.1.5.6	Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese .....	31
III.1.5.7	Puffer und Lösungen für die durchflusszytometrischen Analysen .....	31

III.1.5.8 Puffer und Lösungen für die Transwelluntersuchungen .....	32
<b>III.1.6 Kits und Reagenzien .....</b>	<b>32</b>
III.1.6.1 Kits .....	32
III.1.6.2 Reagenzien .....	32
<b>III.1.7 Antikörper .....</b>	<b>33</b>
III.1.7.1 Primärantikörper .....	33
III.1.7.2 Sekundärantikörper .....	34
<b>III.1.8 Enzyme .....</b>	<b>34</b>
<b>III.1.9 Oligonukleotide .....</b>	<b>34</b>
<b>III.1.10 Plasmide .....</b>	<b>34</b>
<b>III.1.11 Organismen .....</b>	<b>35</b>
III.1.11.1 Bakterien .....	35
III.1.11.2 Zelllinien .....	36
III.1.11.2.1 humane Prostatakarzinomzelllinie PC-3M-pro4/luc .....	36
III.1.11.2.2 humane Melanomzelllinie MV3 .....	36
III.1.11.3 Primäre Zellen .....	36
III.1.11.3.1 humane periphere Blut T Lymphozyten (PBT).....	36
<b>III.2 METHODEN .....</b>	<b>37</b>
<b>III.2.1 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>37</b>
III.2.1.1 Kultivierung der Bakterien .....	37
III.2.1.2 Agarosegelelektrophorese .....	37
III.2.1.3 DNA-Reisolierung aus dem Agarosegel.....	38
III.2.1.4 Restriktion von Plasmid-DNA .....	38
III.2.1.5 Ligation.....	39
III.2.1.6 Transformation von E. coli mit rekombinanter Plasmid-DNA (Elektroporation).....	40
III.2.1.7 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen .....	40
III.2.1.8 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	40
III.2.1.9 Präparation von Gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen .....	41
III.2.1.10 RNA-Konzentrationsbestimmung .....	41
<b>III.2.2 Protein- und Immunchemische Methoden .....</b>	<b>41</b>
III.2.2.1 Auftrennung von Proteingemischen mittels SDS-PAGE .....	41
III.2.2.2 Auftrennung von Proteingemischen im Glyzin-Gelsystem .....	43
III.2.2.3 WB/Immunodetektion .....	44
III.2.2.3.1 „Semi-dry-Blotting“ .....	44
III.2.2.3.2 Immunodetektion mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper .....	44
III.2.2.3.3 Bestimmung der Proteinmenge .....	45
<b>III.2.3 Zellexperimentelle Methoden .....</b>	<b>45</b>
III.2.3.1 Kultivierung der Zellen und Passagierung.....	45
III.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl.....	46
III.2.3.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen.....	46
III.2.3.4 Zellstimulation .....	46
III.2.3.5 Lysatpräparation.....	47
III.2.3.6 Transfektionsmethoden.....	47
III.2.3.6.1 Lipofektion.....	47

III.2.3.6.2	lentivirale Infektion .....	48
III.2.3.6.3	Antibiotika-Titration .....	50
III.2.3.6.4	Selektion stabiler Klone .....	50
III.2.3.6.5	Isolierung von Einzelkolonien .....	50
III.2.3.7	Vorbereitung der Tumorzellen für die Injektion in die Maus .....	51
III.2.3.8	Immunfluoreszenzfärbung .....	51
III.2.3.9	indirekter ELISA .....	51
III.2.3.10	Durchflusszytometrie .....	52
III.2.3.10.1	Oberflächenfärbung .....	52
III.2.3.10.2	Intrazelluläre Färbung .....	53
III.2.3.11	Proliferationstest .....	53
III.2.3.12	In vitro Biolumineszenzbildgebung .....	53
III.2.3.13	Viabilitätstest mit Propidiumiodid .....	54
III.2.3.14	Wundheilungsexperiment .....	54
III.2.3.15	Transwellexperiment .....	55
III.2.3.16	Genexpressionsanalyse .....	56
<b>III.2.4</b>	<b>Tierexperimentelle Methoden .....</b>	<b>57</b>
III.2.4.1	Verwendeter Mausstamm .....	57
III.2.4.2	Versuchstierhaltung .....	57
III.2.4.3	intraperitoneal verabreichte Injektionen .....	57
III.2.4.3.1	Anästhesie von Versuchstieren .....	57
III.2.4.3.2	Luciferin Applikation .....	58
III.2.4.4	Xenotransplantat-Metastasierungsmodell .....	58
III.2.4.4.1	Intrakardiale Applikation der Tumorzellen .....	58
III.2.4.4.2	Subkutane Applikation der Tumorzellen .....	59
III.2.4.4.3	Biolumineszenzbildgebung .....	59
III.2.4.4.4	Tötung der Versuchstiere und Probenentnahme .....	60
III.2.4.4.5	Messung der Primärtumorgröße .....	60
<b>III.2.5</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>60</b>
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>61</b>
IV.1	DIE REDUKTION DER L-PLASTIN EXPRESSION FÜHRT ZUR VERMINDERTEN MIGRATION UND METASTASIERUNG IN EINEM EXPERIMENTELLEN PROSTATAKARZINOM- MODELL .....	61
IV.1.1	<i>Die humane Prostatakarzinomzelllinie PC3 weist eine Expression von L- Plastin auf .....</i>	61
IV.1.2	<i>Reduktion der L-Plastin Expression in PC3 durch shRNA .....</i>	62
IV.1.2.1	Etablierung einer lentiviralen Infektion von PC3 Zellen zur shRNA vermittelten Reduktion der L-Plastin Expression .....	62
IV.1.3	<i>Charakterisierung der lentiviral infizierten Zellen .....</i>	66
IV.1.3.1	Lentivirale Infektion und Reduktion der L-Plastin Expression haben keinen Einfluss auf die Luciferaseexpression, Morphologie, Proliferation und E-Cadherin Expression von PC3 Zellen ....	66
IV.1.3.2	Die Reduktion der L-Plastin Expression hat keinen Effekt auf die zweidimensionale Migration der Zellen im Wundheilungstest .....	69

<i>IV.1.4 L-Plastin Reduktion führt zu einer verminderten Migration in vitro</i> .....	70
IV.1.4.1 L-Plastin Reduktion verringert die Chemokin-vermittelte haptotaktische Migration.....	70
IV.1.4.1.1 Nachweis einer CXCR4 Expression der Zelllinie PC3.....	70
IV.1.4.1.2 L-Plastin Reduktion vermindert die SDF1 $\alpha$ -vermittelte haptotaktische Migration, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die reine haptotaktische Migration .....	71
<i>IV.1.5 L-Plastin Reduktion wirkt sich negativ auf die Etablierung und das Wachstum von Prostatatumoren und Metastasen in vivo aus</i> .....	73
IV.1.5.1 L-Plastin Reduktion beeinträchtigt die Etablierung und das Wachstum eines subkutan induzierten Prostatatumors .....	73
IV.1.5.2 L-Plastin Reduktion führt zu einer verminderten Metastasierung nach intrakardialer Injektion von Tumorzellen .....	74
IV.1.5.2.1 Verifizierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion.....	74
IV.1.5.2.2 L-Plastin Reduktion in PC3 Zellen reduziert die Metastasierung und verlängert das Überleben der Mäuse nach intrakardialer Tumorzellinjektion.....	75
<b>IV.2 EINE EKTOPE EXPRESSION VON L-PLASTIN FÜHRT ZUR VERSTÄRKTEN METASTASIERUNG EINER HUMANEN MELANOMZELLINIE</b> .....	78
<b><i>IV.2.1 Etablierung von L-Plastin exprimierenden MV3 Zellen</i></b> .....	78
IV.2.1.1 Generierung von L-Plastin und Luciferase exprimierenden MV3 Zellen.....	78
IV.2.1.2 Charakterisierung der transfizierten Melanomzellen MV3 .....	83
<b><i>IV.2.2 Die Phosphorylierbarkeit von L-Plastin ist entscheidend für eine verstärkte Migration und Invasion in vitro</i></b> .....	86
<b><i>IV.2.3 Die Expression von phosphorylierbarem L-Plastin führt nach intrakardialer Injektion von Tumorzellen zu einer verstärkten Metastasierung in vivo</i></b> .....	88
IV.2.3.1.1 Verifizierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion.....	89
IV.2.3.1.2 Expression von phosphorylierbarem L-Plastin in MV3 Zellen erhöht die Metastasierung nach intrakardialer Tumorzellinjektion in Mäuse .....	91
IV.2.3.2 Untersuchung des Mäuseserums auf von Tumorzellen abstammendes L-Plastin .....	93
<b>V DISKUSSION</b> .....	96
<b>V.1 DIE AUSWIRKUNGEN DER EXPRESSION VON L-PLASTIN AUF DAS VERHALTEN VON TUMORZELLEN IN VITRO UND IN VIVO</b> .....	97
<b><i>V.1.1 Die Expression von L-Plastin verstärkt die Migration und Invasion von Tumorzellen in vitro</i></b> .....	98
<b><i>V.1.2 Die Expression von L-Plastin verstärkt das Primärtumorwachstum und die Metastasierung von Tumorzellen in vivo</i></b> .....	98
V.1.2.1 Eine reduzierte L-Plastin Expression vermindert die Größe des Primärtumors.....	99
V.1.2.2 L-Plastin verstärkt die Metastasierung von Tumorzellen .....	100
<b>V.2 DIE PHOSPHORYLIERUNG VON L-PLASTIN IST ENTSCHEIDEND FÜR DIE FUNKTION DES PROTEINS BEI DER TUMORZELLMETASTASIERUNG</b> .....	102
<b><i>V.2.1 Phosphoryliertes L-Plastin verstärkt die Migration und Invasion von Tumorzellen in vitro</i></b> .....	103

V.2.2 <i>Phosphoryliertes L-Plastin verstärkt die Metastasierung von Tumorzellen in vivo</i> .....	104
V.3 ÜBER WELCHEN MECHANISMUS ÜBT L-PLASTIN SEINEN EINFLUSS AUF DAS METASTATISCHE VERHALTEN VON TUMORZELLEN AUS? .....	105
V.3.1 <i>Einfluss von L-Plastin auf E-Cadherin</i> .....	105
V.3.2 <i>Auswirkungen der Phosphorylierung von L-Plastin</i> .....	107
V.3.3 <i>Effekte der L-Plastin Expression auf die Gesamtgenexpression</i> .....	108
V.4 L-PLASTIN ALS DIAGNOSTISCHES UND THERAPEUTISCHES MITTEL .....	110
<b>VI ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>112</b>
<b>VII SUMMARY</b> .....	<b>113</b>
<b>VIII LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>114</b>
<b>IX ANHANG</b> .....	<b>126</b>
<b>X DANKSAGUNGEN</b> .....	<b>128</b>
<b>XI VERSICHERUNG</b> .....	<b>129</b>

# I Abkürzungsverzeichnis

ABD	Aktin-Bindedomäne
AF	Alexa Fluor
BLI	Biolumineszenz Imaging
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CFSE	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester
CH	Calponin homologe Domäne
CMV	Cytomegalievirus
CXCR	CX-Chemokin Rezeptor
Cy2	Cyanin 2
dest.	destilliert
DNA	engl.: „ <i>deoxyribonucleic acid</i> “
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ELISA	engl.: „ <i>enzyme-linked immunosorbend assay</i> “
EMT	epithelialen-mesenchymalen Transition
engl.	englisch
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	engl.: „ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “
FCS	engl.: „ <i>fetal calf serum</i> “
FITC	Fluoreszeinisothiocyanath
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
<i>g</i>	engl.: „ <i>gravity</i> “
G418	Genticin 418
HRP	engl.: „ <i>horseradish peroxidase</i> “; Meerrettichperoxidase
IF	Immunofluoreszenz
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton

kb	Kilobasen
LCP1	engl.: „ <i>lymphocyte cytosolic protein 1</i> “
LFA1	engl.: „ <i>lymphocyte function-associated antigen1</i> “
LPL	L-Plastin
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOI	engl.: „ <i>multiplicity of infection</i> “
MZ	Marginalzone
n.d.	nicht detektierbar
OPD	O-Phenylenediamindihydrochlorid
ORF	engl.: „ <i>open reading frame</i> “; offener Leserahmen
PBMC	engl.: „ <i>peripheral blood mononuclear cells</i> “; Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol 12 Myristat 13 Acetat
PMN	polymorphnukleäre Neutrophile
RNA	engl.: „ <i>ribonucleic acid</i> “
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SEM	engl.: „ <i>standard error of the mean</i> “
SDF 1 $\alpha$	Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	„ <i>short hairpin</i> “ RNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TNF $\alpha$	Tumor Nekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VEGF	engl.: " <i>vascular endothelial growth factor</i> "
vs.	<i>versus</i>
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

## **II Einleitung**

### **II.1 Tumorerkrankungen**

Alle 180 Sekunden stirbt in Deutschland ein Mensch an Krebs (Bahnsen, 2006). Im Jahr 2004 belief sich die Zahl der Krebstoten weltweit auf 7.424.000. Damit fordern Tumorerkrankungen jährlich weltweit die zweitmeisten Todesopfer. Nach einer Statistik der „*American Cancer Society*“ wird diese Zahl nur noch von Todesfällen übertroffen, die durch Herz-Kreislaufkrankungen verursacht werden (Society, 2011).

Bei Tumorerkrankungen handelt es sich um eine Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder, die durch bösartige, unkontrollierte Gewebewucherungen und Streuung abnormaler Zellen charakterisiert sind. Der Name stammt vom lateinischen „*tumor*“ = Schwellung, Geschwulst. Darunter werden allerdings jegliche Arten von Schwellungen wie auch Vergrößerungen des Gewebevolumens durch eine örtliche Neubildung von Gewebe (Neoplasie) oder Anschwellen von Gewebe verstanden. Diese Bezeichnung trifft noch keine Aussage über die Dignität der Neoplasie. Man unterscheidet in gut- und bösartige Tumore. Gutartige Tumore (benigne Tumore) können meist chirurgisch entfernt werden und stellen nur selten eine lebensbedrohliche Gefahr dar (Nguyen, 2004). Im Unterschied dazu führen bösartige Tumore (maligne Tumore) oft zum Tod des Patienten (Hanahan and Weinberg, 2000). 90 % aller durch Tumore verursachte Todesfälle sind auf maligne Tumore zurückzuführen (Christofori, 2006). Die Malignität von Tumorzellen wird durch deren Eigenschaft zum invasiven Wachstum und zur Ausbildung von Metastasen in sekundären Organen beschrieben, die meist zum Tod des Organismus führen. Als Metastasierung bezeichnet man den Prozess der Streuung von Tumorzellen vom Primärtumor in sekundäre Organe und die dortige Neuansiedlung eines Tumorherdes (Fidler, 2003).

#### **II.1.1 Allgemeine Einführung in die Biologie von Tumorerkrankungen**

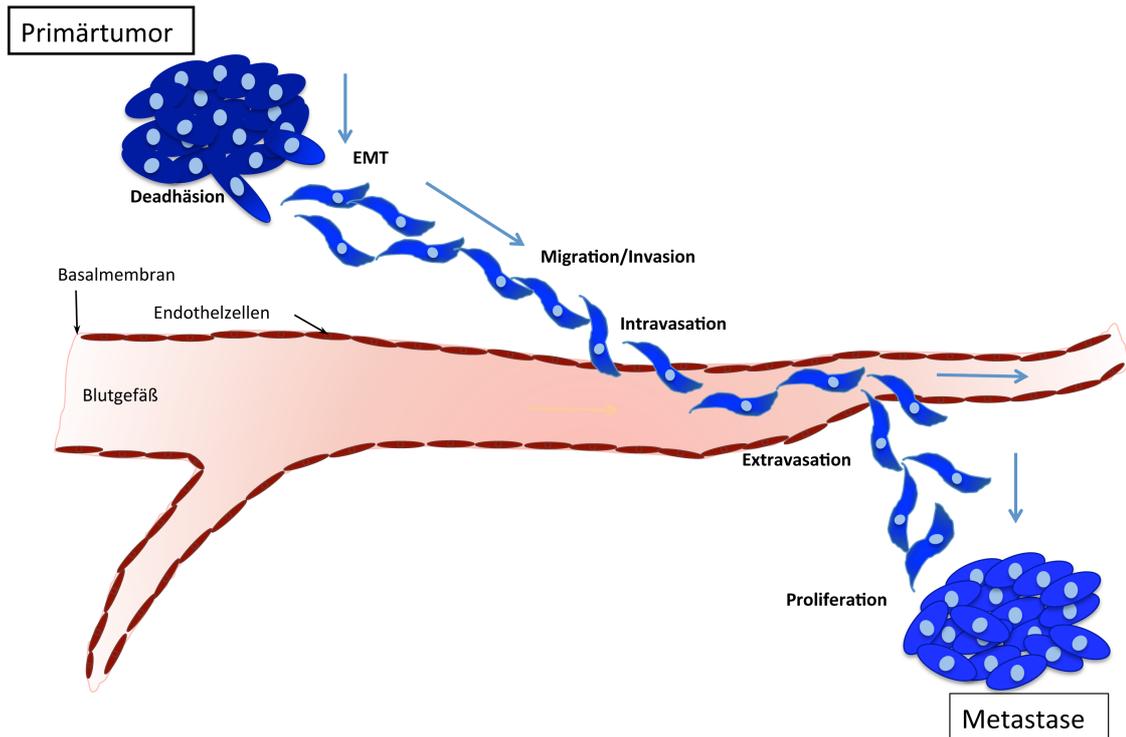
Über 200 verschiedene Krebsarten sind mittlerweile bekannt. Sie variieren in ihrer Epidemiologie, Pathogenese, zellulären Differenzierung, Progression, ihrem Metastasierungspotential, sowie ihrer Therapierbarkeit und werden anhand ihres

Ursprungorgans klassifiziert. Des Weiteren unterscheidet man zwischen soliden Tumoren oder, als zweiter Klasse, den Leukämien und Lymphomen. Solide Tumore können entweder epithelialen (Karzinome) oder mesenchymalen (Sarkome) Zellen entstammen. Auftreten und Verteilung von Krebserkrankungen sind abhängig vom Alter und Geschlecht der Patienten sowie von geographischen und sozioökonomischen Faktoren. Krebs ist eine genetische Erkrankung, die meist sporadisch durch eine spontane Mutationen in einer somatischen Zelle und deren klonaler Evolution entsteht (Nowell, 1976). Der klonale Ursprung geht mit einer Anhäufung von genetischen und epigenetischen Veränderungen in Tumor-Suppressorgenen oder Onkogenen einher, die den entstehenden Krebsphänotyp bestimmen (Weinberg, 1996). Die Krebsentwicklung wird in einem mehrstufigen Modell, der Karzinogenese, beschrieben. Nach der sogenannten Initiation der Karzinogenese durch spontane Mutation folgen die Phasen der Promotion, in der für die Mutation tragende Zelle ein Wachstumsvorteil entsteht und es zu einer klonalen Expansion kommt. Das Stadium der Progression ist beschrieben durch einen zusätzlichen Wachstumsvorteil durch weitere Mutationen die eine unkontrollierte Proliferation der Tumorzellen und ein Umgehen der Apoptose fördern. Während dieser mehrstufigen Entwicklung von Tumoren erwerben normale Zellen die Merkmale einer Krebszelle. Diese wurden von Hanahan und Weinberg beschrieben als Fähigkeit der Proliferation unabhängig von exogenen Mitogenen, Resistenz gegenüber Wachstumsinhibierenden Signalen, Resistenz gegenüber Apoptose, Immortalität, Induzierung der Angiogenese und als Fähigkeit, in umliegendes Gewebe einzuwandern und eventuell zu metastasieren (Hanahan and Weinberg, 2000). Zusätzliche Charakteristika von Tumorzellen sind die Reprogrammierung des Energiemetabolismus und die Fähigkeit, der immunologischen Erkennung und Eliminierung zu entkommen (Hanahan and Weinberg, 2011). Durch Selektionsdruck diese Eigenschaften aufweisen zu müssen entsteht eine hohe genetische Diversität innerhalb des Tumors, die durch die Generierung des sogenannten Tumormikromilieus zusätzlich komplexiert wird. An oberster Spitze dieser hierarchisch aufgebauten Diversität stehen die Krebsstammzellen, die als Ursprungszellen einer Krebserkrankung diskutiert werden (Bonnet and Dick, 1997). Krebsstammzellen zeichnen sich durch ihre Merkmale der Selbsterneuerung sowie ihres Differenzierungspotentials aus. Die ruhenden, sich nicht teilenden Tumorstammzellen machen nur einen kleinen Teil der Tumormasse aus, sind allerdings die Zellen, die fähig sind entfernt vom Primärtumor Metastasen auszubilden. Während der Primärtumor lokal meist chirurgisch entfernt werden kann stellt die Quantität an metastatischen Kolonien, die oft in kurzen zeitlichen Abständen entstehen, ein unüberwindbares Problem für die lokale Therapie dar. Diese hohe

Komplexität von Merkmalen, sowie die Problematik der Metastasierung der Primärtumore erschweren und verhindern zuweilen eine effektive und langfristige Behandlung der Krankheit. Die Vielzahl an befallenen Organen führt dann in der Regel auch zum Tod des Patienten.

### **II.1.2 Die metastatische Kaskade**

Invasion und Metastasierung werden als „*hallmarks of cancer*“ (Hanahan and Weinberg, 2000) bezeichnet und sind die lebensbedrohlichsten Aspekte von Krebs (Duffy, 1992; Kohn and Liotta, 1995; Liotta and Stetler-Stevenson, 1991). Die Mortalitätsrate bei Tumorerkrankungen wird vorwiegend durch Metastasen bedingt (Chambers et al., 2002; Cunnick et al., 2002). Dabei sind bis zu 90 % aller durch Krebs bedingten Todesfälle auf die Ausbildung von Metastasen zurückzuführen (Fidler, 2002; Sporn, 1996). Die Streuung von Tumorzellen im Körper wird durch die „*seed and soil*“ Theorie beschrieben (Paget, 1889). Danach sind zusätzlich zu den intrinsischen Eigenschaften einer metastasierenden Krebszelle wie der migratorische und invasive Phänotyp auch die Parameter des Mikromilieus in den Zielorganen kritisch für den Erfolg der Streuung des Tumors. Dies bedingt unter anderem das unterschiedliche Metastasierungsmuster verschiedener Krebsarten (Weiss, 1985). Die Tumormetastasierung resultiert aus einer Kaskade von Einzelschritten (Abbildung II-1) (Chambers et al., 2002; Chiang and Massague, 2008; Steeg, 2006). Nach der Adhäsion einer Tumorzelle vom Zellverbund des Primärtumors migriert und invadiert sie Gewebe. Durch die Intravasation von Blut/Lymphgefäßen erfolgt eine schnelle Verteilung im Körper. Nach der Extravasation, dem Verlassen des Gefäßsystems, invadiert die Tumorzelle in, vom Primärtumor entfernt liegende, Gewebe und kann dort zur Etablierung einer neuen Tumorkolonie (Metastase) führen.



**Abbildung II-1:** Schematische Darstellung der Teilschritte der metastatischen Kaskade.

### II.1.2.1 Deadhäsion aus dem Zellkollektiv

Initiiert wird der Prozess der Metastasierung durch das Lösen einzelner Tumorzellen vom Primärtumor. Bevor eine epitheliale Tumorzelle sich vom Primärkollektiv ablösen und in umliegendes Gewebe invadieren kann, muss sie den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) durchlaufen. Dieser Prozess findet auch im Rahmen mehrerer, nicht-pathologischer, Vorgänge statt, wie zum Beispiel der embryonalen Entwicklung. Vermittelt wird dieser Prozess durch Moleküle wie den „*transforming growth factor beta*“ (TGF $\beta$ ), die „*mitogen-activated protein*“ (MAP)-Kinase, die Transkriptionsregulatoren Twist und Snail, Wnt, Notch und Hedgehog. Zudem sind die Veränderungen in der Expression von Cadherinen und Integrinen verantwortlich (Tse and Kalluri, 2007). Dabei verliert die Zelle ihren epithelialen Charakter und nimmt mesenchymale Eigenschaften an, die es ihr ermöglichen lokal zu invadieren und eine Basalmembran zu durchdringen (Perl et al., 1998; Thiery, 2002). Nicht mobile, polarisierte epitheliale Zellen, die in ein Zellkollektiv eingebunden sind, lösen ihre Zell-Zell-Kontakte und konvertieren in individuelle, nicht polarisierte, mobile und invasive mesenchymale Zellen (Yilmaz and Christofori, 2009). Es verändert sich die Morphologie der Zellen sowie das Genexpressionsprofil. Mesenchymale Zellen zeichnen sich durch einen langgestreckten Phänotyp sowie eine hohe migratorische Aktivität aus (Nguyen, 2004), zudem sind sie als resistenter gegen Apoptose

beschrieben (Robson et al., 2006). Molekularbiologische Ursache für diese Veränderungen ist ein modifiziertes Expressionsprofil von Adhäsionsproteinen (Christofori, 2006) und Proteasen (Huber et al., 2005). Die Veränderung der Adhäsionseigenschaften verursacht den Verlust der interzellulären Adhäsion und der Interaktion mit der extrazellulären Matrix. Eine wichtige Molekülgruppe stellen dabei die „*cell adhesion molecules*“ (CAM) dar (Bogenrieder and Herlyn, 2003). Diese Gruppe aus Integrinen, Selektinen, Ig-Superfamilien-Mitgliedern und Cadherinen regulieren die interzellulären Kontakte und Verbindungen zur nichtzellulären Umgebung (Cavallaro and Christofori, 2001; Johnson, 1999). So verursacht eine Integrin-Substratbindung eine Kaskade intrazellulärer Signale, die zu einer gerichteten Migration und einer Apoptoseresistenz führt und eine verstärkte Proliferation aktiviert (Aplin et al., 1998; Giancotti and Ruoslahti, 1999). Große Bedeutung kommt ebenfalls dem Molekül E-Cadherin zu. In invasiven Tumorzellen kann häufig eine Reduktion oder ein Verlust der E-Cadherin Expression beobachtet werden (Gumbiner, 2000; Thiery, 2002). Gleichzeitig wird die Expression des mesenchymalen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls N-Cadherin initiiert, ein Prozess, der auch als der „*Cadherin Switch*“ bekannt ist (Yilmaz and Christofori, 2009). All diese molekularen Veränderungen ziehen eine enorme Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts mit sich, die für ein invasives Wachstum notwendig ist und von Aktin bindenden Proteinen, wie L-Plastin, reguliert wird.

### *II.1.2.2 Invasion in die extrazelluläre Matrix*

Dissoziierte Tumorzellen infiltrieren aktiv das umliegende Stroma. Diese Invasion setzt eine räumlich und zeitlich regulierte Interaktion mit dem umliegenden Gewebe, eine aktive Lokomotion und eine Proteolyse voraus (Engers and Gabbert, 2000). Die aktive Lokomotion ist ein zyklischer Prozess aus Aktinpolymerisation und -depolymerisation. Krebszellen können im Kollektiv oder als einzelne Zellen wandern (Friedl and Wolf, 2003; Sahai, 2005; Sahai, 2007), entweder indem sie eine mesenchymale Morphologie kurzzeitig annehmen (EMT) oder in einer passiven, rollenden Art. Die Migration erfolgt zumeist entlang von Blutgefäßen, stimuliert durch lokale Gradienten von Chemoattraktanten oder Matrixgerüsten (Condeelis and Segall, 2003; Li et al., 2000). Der Ausbildung eines Pseudopods und eines Lamellipodiums folgt die Adhäsion an das umliegende Substrat und das Schieben des Zellkörpers nach vorne. Gleichzeitig begünstigt das Lösen der Interaktion am Hinterende der Zelle deren Lokomotion. Die Formierung von Pseudopod und Lamellipodium resultiert aus einer Rac1 vermittelten Aktinpolymerisierung (Michiels et al., 1995; Nobes and Hall, 1999). Die kurzzeitigen Zellkontakte werden durch Substrat-spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren, vor allem

Integrinen, vermittelt. Neben ihrer Linker-Funktion sind Integrine ebenfalls in die Signalprozesse einer Zelle eingebunden und können dadurch zellbiologische Funktionen wie Migration, Differenzierung, Proliferation, Angiogenese und Apoptose beeinflussen (Brooks et al., 1994; Giancotti and Ruoslahti, 1999; Keely et al., 1997; Mainiero et al., 1997; Shaw et al., 1997; Uings and Farrow, 2000). Während der Infiltration müssen Tumorzellen die extrazelluläre Matrix (EZM) durchqueren. Voraussetzung dafür ist die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix. Viele Tumorzellen zeigen gesteigerte proteolytische Aktivität durch eine vermehrte Proteasen-Expression (Crawford and Matrisian, 1994; Stetler-Stevenson et al., 1993), wobei vor allem die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) an dem Prozess der Tumordinvasion beteiligt sind. Friedel und Wolf haben gezeigt, dass MMPs Kollagenfasern schneiden und in parallelen Bündeln organisieren um Gerüstschiene zu formen, entlang derer dann Kollektive von Krebszellen wandern können (Friedel and Wolf, 2008).

### *II.1.2.3 Intravasation*

Nachdem die Tumorzellen die EZM durchquert haben, kommen sie in die Kontaktzone der tumorassoziierten Mikrovaskulatur. Einer Integrin-vermittelten Interaktion zwischen Tumorzellen und endothelialen Zellen der Basalmembran folgt eine Auflösung der Basalmembran durch proteolytische Enzyme (Brooks et al., 2010). Wenn die Tumorzellen die Basalmembran durchquert und die vaskulären Endothelzellen erreicht haben adherieren sie an diese. Das Adhären von Tumorzellen an das Endothelium der Mikrogefäße induziert bei den Endothelzellen ein Auseinanderweichen, wodurch die Tumorzellen zwischen diesen hindurchtreten (Tsuji et al., 2006) und so in das Innere der Vaskulatur eindringen können (Blood and Zetter, 1990). Die sogenannte Intravasation ist ebenfalls eine koordinierte Abfolge von proteolytischer und migratorischer Aktivität. Nachdem die Zellen in das Vaskularsystem eingedrungen sind werden sie mit dem Blut- oder Lymphstrom im Körper verteilt. Mit dem Moment des Eintritts verändert sich das Umgebungsmilieu für die Tumorzelle maßgeblich, was eine weitere hohe Anpassungsfähigkeit der Tumorzellen voraussetzt. Zum Beispiel wirken starke Scherkräfte auf die Zellen ein. Dies alles führt zu einer nur geringen Überlebensrate der intravasierten Zellen.

#### II.1.2.4 Transendotheliale Migration und Extravasation

Zur Kolonisierung in entfernt gelegenen Organen müssen die Tumorzellen im Blutstrom überleben, an das Endothel der Mikrozirkulation des Zielorgans adhären und sich Eintritt zu dessen Parenchym verschaffen (Makrilia et al., 2009). Tumorzellen sind dabei Prozessen ausgesetzt, die ihr Überleben gefährden. Dazu zählen die Scherkräfte, die durch den Blutstrom verursacht werden, und Attacken des Immunsystems (Molloy and van 't Veer, 2008). Die Expression von Integrinen in zirkulierenden Tumorzellen stellt einen Schutz gegen Scherkräfte innerhalb des vaskulären Systems dar, indem die Interaktion von Tumorzellen zu Leukozyten und Plattenzellen ermöglicht wird (Blood and Zetter, 1990). Dadurch wird auch ein Arrest von Tumorzellen unter dynamischen Flussbedingungen ermöglicht (Felding-Habermann et al., 2001). Ein weiterer entscheidender Faktor für den Arrest von Tumorzellen im Gefäßsystem ist deren Größe, die den Gefäßdurchschnitt deutlich übersteigt. Dadurch kommt es zu einer passiven Arrestierung. Um jedoch Eintritt in das umliegende Gewebe zu erlangen, muss die Basalmembran sowie die EZM wiederholt abgebaut werden (Gupta and Massague, 2006). Die Extravasation und Einwanderung in neues Gewebe basieren dabei auf den gleichen Prozessen wie die Intravasation.

#### II.1.2.5 Etablierung einer Kolonie

Das Eindringen der Tumorzelle in das Zielorgan stellt nur den initialen Schritt des Auswachsens einer sekundären Tumorkolonie dar. Eine sofortige Ausbildung einer Metastase kommt nicht zwingend vor. Auch diese gestreuten Zellen können noch durch Apoptose absterben (Chambers et al., 2002) oder bleiben zunächst „*dormant*“. Jahre später kann es durch verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel Effekte der Wirts-Immunsuppression zur Induktion der Proliferation dieser ruhenden Zellen kommen (Naumov et al., 2001). Nach dem Eindringen der Tumorzelle in ein sekundäres Organ stehen noch weitere Schritte an, um eine erfolgreiche Etablierung einer Metastase abzuschließen. Dabei ist eine weitere Adaption der Tumorzelle an die Mikroumgebung im befallenen Organ notwendig. Es kommt nicht nur zu einer Anpassung der Tumorzelle, sondern vor allem auch zu einer Änderung der Mikroumgebung im Zielorgan (Gupta and Massague, 2006). Diese Bedingung findet sich in der „*soil*“ Komponente der von Paget formulierten Theorie wieder. Die Ausbildung einer metastatischen Nische ist Voraussetzung für die Etablierung eines Sekundärtumors. Dabei spielen vor allem Immunzellen eine entscheidende Rolle (Kaplan et al., 2005). In diesem Zusammenhang wird auch die Pre-Konditionierung des

Zielorgans durch hämatopoetische Stammzellen diskutiert, die zunächst in das Gewebe migrieren und die EZM und das Wachstumsfaktormilieu so modulieren, dass ein Mikromilieu geschaffen wird, welches Tumorzellen anzieht und deren Proliferation unterstützt (Kaplan et al., 2006). Bis zur klinischen Manifestation einer Metastase sind jedoch noch weitere Faktoren notwendig. So ist das Tumorstadium ohne eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen auf einen Durchmesser von 1-2 mm beschränkt. Eine Neoangiogenese ist daher notwendig, um ein signifikantes Wachstum des Tumors sicherzustellen. Das Einleiten der Angiogenese wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren ausgelöst und ermöglicht die Ausbildung einer Makrometastase (Nyberg et al., 2005).

### **II.1.3 Das Prostatakarzinom**

Das Prostatakarzinom ist derzeit die am zweithäufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern. In den westlichen Industrienationen bedingt es 15 % aller männlichen Krebsfälle, wohingegen es in den Entwicklungsländern nur 4 % der Fälle ausmacht (Heidenreich et al., 2011). Die durch Prostatakrebs bedingte Mortalität lag in Deutschland im Jahr 2000 bei 27 Personen pro 100.000 Einwohnern (Robert-Koch-Institut, 2003) und ist weltweit die sechsthäufigste Todesursache unter krebserkrankten Männern (Ferlay et al., 2010). Dabei ist eine steigende Inzidenz in den letzten Jahren zu beobachten (von 16.000 Neuerkrankungen im Jahr 1991 auf mittlerweile 58.000 Primärdiagnosen pro Jahr). Dies ist neben dem steigenden Alter der Bevölkerung auch durch eine bessere Diagnostik zu erklären (Rifkin, 1998; Robert-Koch-Institut, 2003).

Zu den Risikofaktoren einer Erkrankung zählen neben dem steigenden Alter die ethnische Abstammung, eine genetische Prädisposition, hormonelle Faktoren wie ein erhöhter Östrogenspiegel (Böcker, 2001) und, wie klinische Daten belegen, exogene Faktoren wie Ernährung, Sexualverhalten, Alkoholkonsum und UV-Strahlung.

Eine Metastasierung des Prostatakarzinoms läuft sowohl lymphogen als auch hämatogen ab. Die Lymphknoten der Fossa obturatoria bilden die ersten Stationen in der lymphogenen Streuung und gelten als Indikatoren für eine positive oder negative Lymphknotenausbreitung (Hautmann et al., 1997). Lymphknotenmetastasen erhöhen das Risiko zur Entwicklung von Fernmetastasen (Gervasi, 1989) und sind mit einer schlechten Prognose verbunden (Datta et al., 2010). Der Befall regionaler Lymphknoten kann bei 5 – 12 % der Prostatakarzinompatienten mit klinisch organbegrenztem Krankheitsbild beobachtet werden und senkt signifikant ein krankheits-

spezifisches, rückfallfreies Überleben (Cai et al., 2009). Hämatogene Metastasen findet man überwiegend im Skelettsystem, wobei vorwiegend Becken und Wirbelsäule betroffen sind (Helpap, 1998). In 80 % der fortgeschrittenen Prostatakarzinomerkrankungen treten Knochenmetastasen auf (Bubendorf et al., 2000), die in 10 – 15 % der Patienten bereits bei Diagnosestellung vorliegen (Sturge et al., 2011). Neben den regionalen Lymphknoten und den Knochen sind entfernt liegende Lymphknoten, Lunge, Leber und Gehirn häufige Orte der Metastasierung (Bubendorf et al., 2000). Bei metastatischen Krankheitsbildern haben die üblichen Therapien wie radikale Prostatektomie und Bestrahlung eine niedrige Wahrscheinlichkeit auf Erfolg (Briganti et al., 2009; Burkhard and Studer, 2009; Cai et al., 2009; Da Pozzo et al., 2009). Aus diesem Grund werden dringend neue Therapeutika zur Verhinderung oder Verlangsamung der Metastasierung benötigt.

#### **II.1.4 Das maligne Melanom**

Das maligne Melanom ist eine Neoplasie, die vom melanozytären System ausgeht und manifestiert sich überwiegend in der Haut. Diese hochmaligne Tumorart ist für 80 % aller Todesfälle durch Hautkrebs verantwortlich, macht jedoch nur 4 % aller dermatologischer Tumorerkrankungen aus (Miller and Mihm, 2006). Die Erkrankung tritt in der Regel in einem Alter zwischen 50 und 55 Jahren auf (Katalinic et al., 2003). Jedoch ist ein Trend zu erkennen, wonach immer mehr jüngere Menschen an dieser Krankheit erkranken. Die weltweite Zunahme der Inzidenz ist klar am Beispiel der USA zu erkennen. Hier konnte eine jährliche Steigerung der Inzidenz um 4,1 % beobachtet werden (Altmeyer, 2010; Rager et al., 2005). Deutliche geographische Unterschiede in der Häufigkeit des Vorkommens der Erkrankungen sind durch eine unterschiedliche Pigmentierung der Bevölkerungsgruppen bedingt, die dabei ein schützender Faktor ist (Garbe and Schadendorf, 2003; Grin-Jorgensen et al., 1992; Tan et al., 2001). Danach tritt das maligne Melanom vor allem in der hellhäutigen Bevölkerung auf, die in besonders sonnenexponierten Regionen leben.

Die Ursachen, die zur Entwicklung eines malignen Melanoms führen, können in endogene und exogene Ursachen eingeteilt werden. Zu den endogenen Ursachen zählt man das Vorhandensein von über 50 gewöhnlichen Nävi, sogenannten Leberflecken und eine genetische Veranlagerung. Die bedeutendste exogene Ursache ist eine übermäßige UV-Exposition.

Die im Verhältnis zur Primärtumorgröße bestehende frühe Tendenz der lymphogenen und hämatogenen Metastasierung des malignen Melanoms betont die Wichtigkeit der

Aufklärung der metastasierenden Mechanismen, im Besonderen auch für diese Tumorart (Soon, 1998). Auch Melanomzellen zeigen eine ortsspezifische Metastasierung. 70 % der Metastasen manifestieren sich primär regional im Lymphabflußgebiet, in 30 % der Fälle kommt es zu Fernmetastasen in Lunge, Leber, Gehirn und Knochen (Garbe and Schadendorf, 2003). Das Auftreten von Lymphknotenmetastasen gilt als wichtigster Einflussfaktor für die Ausbildung von Rezidiven und die Überlebenschancen der Patienten (Fink et al., 2004; Retsas et al., 1994). Weiterhin sind Fernmetastasen und das Muster des Organbefalls bei Fernmetastasen Faktoren, die das Überleben der Patienten negativ beeinflussen (Buzaid and Anderson, 2000; Hauschild, 2003). Als Endstadium gelten Knochen- und Hirnmetastasen, die meist lediglich palliativ behandelt werden können.

## **II.2 L-Plastin**

L-Plastin, die Leukozyten-spezifische Isoform der Plastin-Familie, ist ein Aktin bündelndes Protein, das zunächst in transformierten humanen Fibroblasten gefunden wurde. Später erst wurde erkannt, dass die natürliche Expression des Proteins bei untransformierten Zellen auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs beschränkt ist. Dieses, auch „*lymphocyte cytosolic protein 1*“ (LCP1) genannt, ist als kritischer Regulator der Aktindynamik in Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems bekannt. Zusätzlich konnte seine Expression später auch in einer Vielzahl menschlicher transformierter Zellen nachgewiesen werden (s. unten).

### **II.2.1 Plastin-Isoformen**

Die Mitglieder der Plastin-Familie, auch Fimbrine genannt, sind eukaryotische Aktin bündelnde Proteine. Erstmals von Bretscher und Weber aus intestinalen Epithelzellen des Huhns isoliert, wurden sie bis heute in zahlreichen Eukaryoten nachgewiesen (Bretscher and Weber, 1980). Die Komplementierung des Hefe-Homologs SAC6 weist auf ihre hohe evolutionäre Konservierung hin (Adams et al., 1995). Die Familie der Plastin/Fimbrin-Moleküle bei Vertebraten untergliedert sich in drei Isoformen, die jeweils von einem eigenen Gen kodiert werden (Lin et al., 1993). Sie weisen eine gewebespezifische Expression auf und wurden entsprechend nominiert. Eine I-Plastin („*intestin-specific plastin*“) Expression zeigt sich im Mikrovilli von Dünndarm und

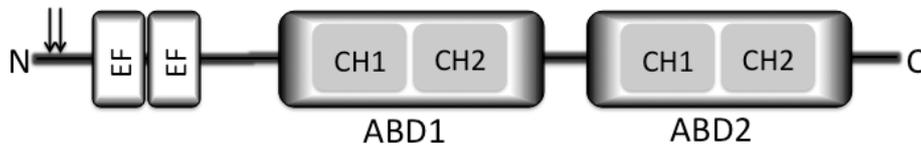
Dickdarm sowie im Nierenepithel (Lin et al., 1994). Das Vorkommen von T-Plastin („*tissue-specific plastin*“) ist auf die übrigen soliden Gewebezellen mit replikativem Potential restringiert. Dazu zählen Fibroblasten, endotheliale Zellen, Melanozyten und weitere (Klein et al., 2004). Die Leukozyten-spezifische Variante L-Plastin wird dagegen von Zellen hämatopoetischen Ursprungs sowie auch von einer Reihe humaner nicht hämatopoetischer Tumoren exprimiert (Goldstein et al., 1985; Lin et al., 1988; Park et al., 1994). Ein weiterer wichtiger Unterschied findet sich in der N-terminalen Region der Plastin-Isoformen. L-Plastin weist zwei potentielle Phosphorylierungsstellen auf (Jones et al., 1998; Wang and Brown, 1999). Diese befinden sich an den Serinresten 5 und 7 der Aminosäurekette. T- und I-Plastin fehlt die Aminosäure Serin an Position 5 (Lin et al., 1998). Für T-Lymphozyten aus peripherem Blut (PBT) konnte dabei gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung ausschließlich an dem Aminosäurerest Serin 5 möglich ist (Wabnitz et al., 2007).

## II.2.2 Struktur von L-Plastin

Kodiert wird das Protein L-Plastin durch das LCP1 Gen auf dem Chromosom 13 und verteilt sich im Falle von humanem L-Plastin auf 16 Exons (Lin et al., 1993). Die Proteine der Plastin-Familie weisen ein Molekulargewicht von 65-68 kDa auf und bestehen aus 610-630 Aminosäuren. Diese definieren in der Tertiärstruktur eine Kopf- sowie eine Kerndomäne. Strukturell charakterisierend sind die EF-Hand Kalzium-bindenden Domänen in der Kopfreion des Proteins sowie die zwei sich am C-Terminus befindlichen Aktin-bindenden Domänen (ABD). Eine ABD setzt sich aus jeweils 250 Aminosäuren zusammen und enthält zwei aufeinander folgende Calponin-homologe (CH) Domänen aus je 125 Aminosäurereste (Bañuelos S, 1998; Matsudaira, 1991). Plastine unterscheiden sich von anderen Aktin bündelnden Proteinen durch die Reihung von zwei ABD innerhalb einer einzelnen Polypeptidkette, welche die Aktinbündel, durch die simultane Bindung zweier Aktinfilamente, hochgeordnet zusammenfassen und stabilisieren (de Arruda MV, 1990). Die N-terminal gelegenen Kalzium-Bindestellen sind ebenfalls für die Bindung von Aktin wichtig, da die Bündelung durch Kalzium reguliert wird (Namba et al., 1992). Zusätzlich befinden sich dort die potentiellen Serin Phosphorylierungsstellen.

Die Gesamtstruktur wurde anhand röntgenkristallographischer Untersuchungen als kompakt globulär bis Hantel-ähnlich beschrieben, wobei die beiden ABD in einer antiparallelen Weise so angeordnet sind, dass es zu einem direkten Kontakt der N- und C-terminalen CH-Domänen kommt (Klein et al., 2004; Shinomiya et al., 2007). Die

Anwesenheit von Kalzium führt zu einem signifikanten Konformationswechsel der Tertiärstruktur, was bereits einen ersten Hinweis auf den molekularen Wirkmechanismus von L-Plastin auf die Aktinbindung liefert.



**Abbildung II-2: Schematische Struktur von L-Plastin.** In der N-terminalen Kopfdomäne des Proteins befinden sich zwei Phosphorylierungsstellen an den Serin-Resten 5 bzw. 7 (siehe Pfeile) sowie zwei EF-Hand-Loops, die als Kalziumbindestellen fungieren. Im C-terminalen Bereich befinden sich die beiden Aktinbindedomänen, die jeweils aus zwei Calponin homologen Domänen bestehen. (N = N-Terminus, EF = EF-Hand Kalzium Bindestellen, ABD = Aktin-bindende Domäne, CH = Calponin homologe Domäne).

## II.2.3 Funktion und Bedeutung von L-Plastin

### II.2.3.1 L-Plastin als Aktin bündelndes Protein

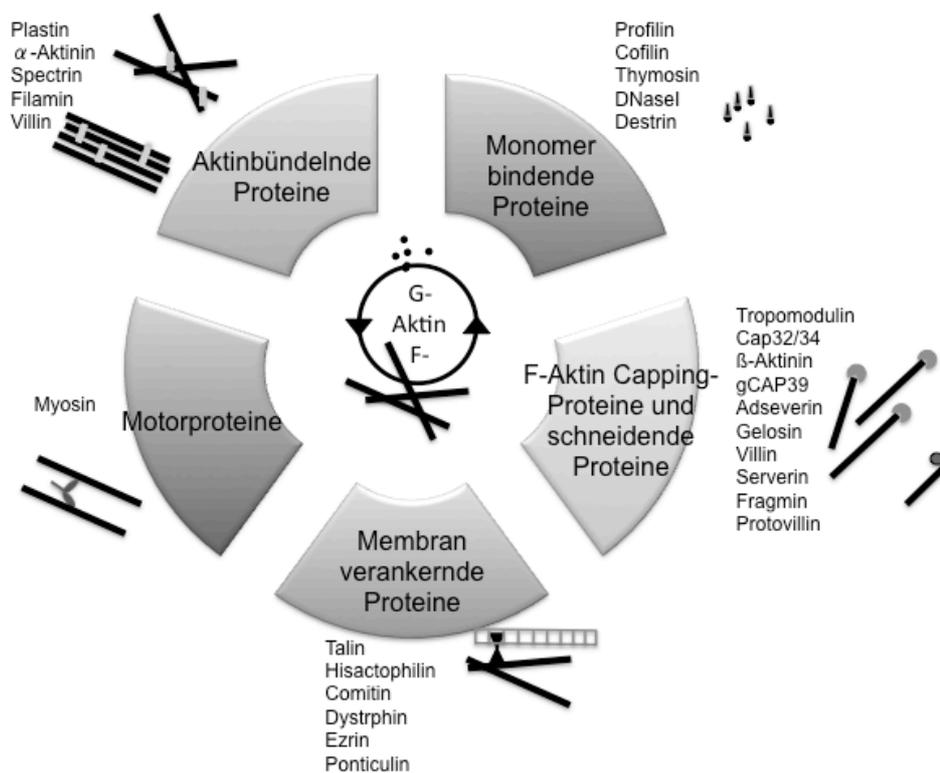
#### II.2.3.1.1 Aufbau und Aufgaben des Aktin-Zytoskeletts

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen ist ein dynamisches, faseriges Gebilde, durch das Zellbewegungen, morphologische Veränderungen und intrazelluläre Transportmechanismen ermöglicht werden. Dieses System setzt sich aus Mikrofilamenten, bestehend aus Aktin, Intermediärfilamenten, die aus verschiedenen fibrösen Proteinen aufgebaut sind, und Mikrotubuli aus  $\alpha/\beta$ -Tubulin-Heterodimeren zusammen (Herrmann and Aebi, 2000). Die einzelnen Untereinheiten sind durch nicht kovalente Bindungen zusammengefügt und bilden so Fasern aus. Daraus entsteht ein strukturierter Komplex, der einer strengen Kontrolle unterliegt. Ein Hauptbestandteil ist das Aktinzytoskelett, Mikrofilamente, die sich aus Aktinuntereinheiten zusammensetzen. Das Aktinzytoskelett spielt eine tragende Rolle bei den Bewegungsabläufen einer Zelle. Zudem kommt ihm eine besondere Bedeutung beim intrazellulären Transport durch das Zytosol zu. Ayscough und Drubin haben die Prinzipien des Aktinzytoskletts am Beispiel der Bäckerhefe *S. cerevisiae* untersucht (Ayscough and Drubin, 1996). Das hochdynamische Netzwerk aus Aktin-Polymeren und einer hohen Vielzahl an assoziierten Proteinen vermittelt hauptsächlich die Reaktion der Zellmotilität und Zellform auf extrazelluläre Stimuli. Schmidt und Hall nannten weiterhin die Organisation des Zytoplasmas und die Generierung mechanischer Kräfte innerhalb der Zellen zu den Hauptaufgaben des Aktinzytoskeletts

(Schmidt and Hall, 1998). Als dominierende Strukturbestandteile der Zelle führen die Mikrofilamente mechanische Arbeiten in der Zelle durch den Auf- und Abbau von Proteinuntereinheiten aus, wodurch eine Zellmotilität entsteht (Pollard and Borisy, 2003). Die Aktinfilamente sind doppelhelikale Polymere, die aus globulären Untereinheiten aufgebaut sind. Diese richten sich immer in einer „Kopf-zu-Schwanz“-Weise an und geben den Filamenten somit eine molekulare Polarität. Die sich dadurch ergebenden Filamentenden wurden als Plus- und Minusende bezeichnet (Pollard and Borisy, 2003). Das Wachstum der Filamente durch Anlagerung neuer Monomere erfolgt am Plusende. Weiterhin weisen die Aktinpolymere eine gerichtete Orientierung entlang der Zelloberfläche auf, wobei die Plusenden nach außen zeigen (Small et al., 1978). Bei der Polymerisierung von globulärem Aktin (G-Aktin) zu filamentösem Aktin (F-Aktin) wird ATP zu ADP und  $P_i$  hydrolysiert (Pollard, 1986). Neben der Energieabhängigkeit ist der Assemblierungsprozess durch ein aufwendiges System an assoziierten Strukturproteinen reguliert (Ayscough, 1998). Diese Aktin bindenden Proteine werden in funktionelle Klassen eingeteilt (Abbildung II-3) (Schleicher et al., 1995). G-Aktin bindende Proteine entziehen die monomeren Untereinheiten dem Gleichgewicht mit F-Aktin und verringern somit die Viskosität des Zytosols. Beispiele hierfür sind die Proteine Profilin, Cofilin und Thymosin (Carlier and Pantaloni, 1994; Rozycki et al., 1994; Sun et al., 1995). Die übrigen Aktin bindenden Proteine lagern sich an filamentösem Aktin an und unterscheiden sich anhand ihres Bindungsortes entlang der Filamente. Dabei beeinflusst die Art der Bindung entscheidend die Viskosität des Zytoplasmas und entsprechend die Fähigkeit der Zelle sich zu bewegen. Capping-Proteine besetzen die Endstellen der Filamente und verhindern damit eine weitere Anlagerung von Monomeren. Die Filamente werden dadurch kurz gehalten und die Viskosität niedrig. Zu dieser Gruppe zählen cap 32/34, Protovillin, Gelsolin, Villin, Severin (Eichinger et al., 1991; Eichinger and Schleicher, 1992; Gettemans et al., 1992; Hartmann et al., 1990; Hofmann et al., 1992; Pope et al., 1995). Eine weitere Gruppe bindet entlang der Filamente und stabilisiert, verbindet und formt Aktineinheiten. Aktinfilamente sind in Strukturen aus Bündeln und fächerförmigen Netzwerken durch aktinquervernetzende Proteine organisiert (Ayscough, 1998; Bartles, 2000; Puius et al., 1998). Die Bündel sind aus parallel angeordneten, eng nebeneinander liegenden Filamenten aufgebaut. In einem Netzwerk überkreuzen sich die einzelnen Filamente meist rechtwinklig und können zwei- oder dreidimensionale Gestalt annehmen. Unter der Plasmamembran liegt ein zweidimensionales Netzwerk und verstärkt die äußere Hülle der Zelle. Das Zytosol ist von einem dreidimensionalen Aktinnetzwerk durchzogen und erhält dadurch seine galertartige Konsistenz. Länge und Flexibilität der Proteine entscheiden dabei über die Art des entstehenden

Aktinbündelungsproteine. Man teilt die aktinvernetzenden Proteine in drei Gruppen ein. Zwei Gruppen mit jeweils einer Aktinbindedomäne, die entweder charakteristisch oder verschieden ist, und eine Gruppe von Proteinen mit zwei Aktinbindenden Domänen, die sich durch ihre CH-Domänen ausweisen. Zu dieser dritten Gruppe gehört auch die Plastin-Familie.

Die Reversibilität der Aktinpolymerisierung sowie der Proteininteraktionen ist eine entscheidende Bedingung, um die lebenswichtigen Funktionen wie Zellteilung, Zellmotilität und intrazellulären Transport aufrecht zu erhalten.



**Abbildung II-3: Aktinbindende Proteine und ihre Funktion. Verändert nach (Schleicher et al., 1995).**

### II.2.3.1.2 Bündelung von F-Aktin durch L-Plastin

Die ersten Untersuchungen zur Bündelung von F-Aktin durch Plastin wurden an T-Plastin durchgeführt. Matsudaira et al. beschreiben die Bündelung von Filamenten in einem parallel angeordneten Modell mit einem Abstand von jeweils 115-120 Å. Dies konnte auch durch ein Modell des Aktin-Fimbrin-ABD Komplexes von Hanein bestätigt werden (Hanein et al., 1998; Matsudaira et al., 1983). Die Aktinarrays werden durch Plastin zu unipolaren, hexagonalen Verbänden zusammengepackt, deren Plusenden zur Zelloberfläche weisen (Tilney et al., 2000; Tilney and Saunders, 1983). Dabei sind die Vorgänge der Aktinpolymerisierung, der Plastin-Bindung und der Kreuzvernetzung der Filamente gekoppelt (Volkman et al., 2001). Zudem weist die Aktinbündelung

durch Plastine eine Kalziumabhängigkeit auf (Lin et al., 1994; Namba et al., 1992). Die Kalziumdomäne am N-Terminus sowie die genauen Aktin-Binderegionen innerhalb der beiden CH-Domänen konnten anhand einer Elektronendichte-Korrelation identifiziert werden (Hanein et al., 1998). L-Plastin bündelt Aktin in einer ähnlichen Weise wie T-Plastin. Zum ersten Mal konnte die Bündelung von Aktin durch L-Plastin durch die Technik der hochauflösenden Kryo-Elektronenmikroskopie beobachtet und aufgenommen werden. Galkin beschreibt eine konservierte funktionelle Interaktion zwischen den CH-Domänen und Aktin (Galkin et al., 2008). ABD2 bindet in einer festen und stochastischen Weise an Aktin und schützt die Aktinfilamente so signifikant vor einer Depolymerisierung. Dabei reduziert die Bindung der ABD2 die Variabilität im Aktinfilament und die Bindestruktur geht in eine geschlossene Konformation über (Cheng et al., 1999; Lebart et al., 2004). Diese erste Bindung verursacht eine Konformationsänderung innerhalb von Bindedomäne 1 und überführt diese so in eine aktive Form. Die CH-Domäne 1 von ABD1 von L-Plastin kommt somit in enge räumliche Nachbarschaft zu einem zweiten, 120 Å entfernt liegenden Aktinfilament und kann anschließend ebenfalls eine Bindung eingehen (Klein et al., 2004; Lehman and Craig, 2004).

### *II.2.3.2 Zelluläre Funktionen von L-Plastin in Leukozyten*

Wie der Name L-Plastin bereits vermuten lässt, wurde L-Plastin ursprünglich als Leukozyten-spezifisches Protein beschrieben. Von daher stammen auch die meisten funktionellen Daten über L-Plastin aus Leukozyten. Das Protein wurde in mehreren Zelltypen der angeborenen Immunität, wie in Makrophagen und Neutrophilen nachgewiesen (Chen et al., 2003; Shinomiya et al., 1991). Aber auch in T und B Zellen, die der erworbenen Immunantwort angehören, wurde L-Plastin beschrieben (Henning et al., 1994; Todd et al., 2011).

Die Fähigkeit von Zellen, sich innerhalb des Organismus zu bewegen, ist lebensentscheidend, wenn man die Situation der Immunzellen bedenkt. Lebensbedrohlich ist sie hingegen im Hinblick auf eine unkontrollierte Migration von Zellen bei einer Tumorerkrankung. Für die Beweglichkeit der Zellen ist ein Zusammenspiel von Adhäsion, Polarisierung und Mobilität notwendig. Diese gilt für Immunzellen und auch für metastasierende Krebszellen. Als organisierendes Protein des Aktinzytoskeletts kommt L-Plastin dabei eine entscheidende Funktion zu. So konnte eine verminderte Motilität durch eine Reduktion der L-Plastin Expression in Jurkat T Zellen nachgewiesen werden (Lin et al., 2010). Auch die T Zellen L-Plastin defizienter (LPL<sup>-/-</sup>) Mäuse zeigten eine Reduktion der durch Chemoattraktanten

ausgelösten Migration, wie *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Neben der eingeschränkten migratorischen Fähigkeit zeigten diese Zellen auch eine ungerichtete Polarisierung nach Chemokinstimulation (Morley et al., 2010). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die Chemokin-vermittelte Migration von B Zellen beschrieben werden. L-Plastin defiziente B Zellen wiesen eine reduzierte Migration hin zu verschiedenen Chemoattraktanten auf. Zusätzlich ist L-Plastin in B Zellen auch für die Ausreifung einer Subpopulation, der Marginalzone B Zellen (MZ B Zellen), entscheidend, da deren Entwicklung von chemotaktischen und adhäsiven Signalen abhängig ist (Todd et al., 2011). Des Weiteren konnte in migrierenden Makrophagen eine Lokalisation von L-Plastin in Podosomen festgestellt werden (Ohsawa et al., 2004). Ein Einfluss der Phosphorylierung von L-Plastin auf die Mobilität der Zellen konnte bisher noch nicht gefunden werden (Morley, 2012).

Neben der Beteiligung an den migratorischen Fähigkeiten zeigt L-Plastin auch einen Einfluss auf die Aktivierung von T Zellen. L-Plastin wird nach Kostimulation humaner T Zellen aus dem Blut phosphoryliert (Henning et al., 1994). Die Akkumulation von L-Plastin in der immunologischen Synapse (IS) lieferte den ersten Hinweis auf eine Rolle in der Formierung der Synapse (Wabnitz et al., 2007). Während der Ausbildung kolokalisierte L-Plastin vorwiegend mit F-Aktin in der peripheren Region der IS und führte zu einer Stabilisierung. Ein verminderter L-Plastin Gehalt in peripheren T Zellen reduzierte die Aktivität der T Zellen, die Größe der IS und die Proliferation der Zellen (Wabnitz et al., 2010). Diese Ergebnisse konnten in einer Untersuchung mit L-Plastin defizienten murinen T Zellen bestätigt werden (Wang et al., 2010). Die T Zellantwort auf ein Antigen ist demnach beeinträchtigt. Ebenso wurden Defekte in der Proliferation und der Zytokinproduktion beschrieben, was auf eine entscheidende Funktion von L-Plastin auf die späten Phasen der Formierung der IS hindeutet.

Neutrophile sind als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr entscheidend für eine schnelle Reaktion auf Infekte. Die Ausreifung und Mobilität der Zellen werden dabei stark durch eine Integrin-vermittelte Signalweiterleitung gesteuert, an der L-Plastin beteiligt ist (Chen et al., 2003; Jones et al., 1998). Zusätzlich wurde neben der Rolle von L-Plastin in der Aktinbündelung über eine Funktion im FC $\gamma$ R Signaling von Neutrophilen diskutiert. Einen weiteren Hinweis zur L-Plastin-Rolle in der Unterstützung der angeborenen Immunabwehr gaben die Ergebnisse von Ohsawa in Makrophagen. Die Bindung von L-Plastin an funktionsentscheidende Proteine wie Iba1 wies auf eine Verbindung zur phagozytischen Funktion der Makrophagen hin (Ohsawa et al., 2004).

### II.2.3.3 Phosphorylierung von L-Plastin

Eine wichtige regulatorische Einheit von L-Plastin findet man in den Phosphorylierungsstellen im N-terminalen Bereich des Proteins. Bisher wurde ausschließlich von der Phosphorylierung von L-Plastin, jedoch nicht der beiden anderen Isoformen T- und I-Plastin berichtet. Eine 1985 veröffentlichte Arbeit zeigt eine durch Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) ausgelöste Phosphorylierung von L-Plastin in transformierten HL-60 Zellen (Anderson et al., 1985). Seither wurde diese Modifikation in einer Vielzahl von Zelltypen, ausgelöst durch unterschiedlichste Stimuli, beobachtet. 1991 publizierten Shinomiya und Kollegen eine Arbeit über die Phosphorylierung von L-Plastin in murinen peritonealen Makrophagen durch das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) (Shinomiya et al., 1991). Ebenso führt LPS in Makrophagen zu einer Stimulation der L-Plastin Phosphorylierung (Hagi et al., 2006). In einer Reihe weiterer Zellen des hämatopoetischen Systems konnte eine Phosphorylierung von L-Plastin durch andere Stimuli nachgewiesen werden. Eine durch N-Formyl-Peptid-Rezeptor Subtypen aktivierte Phosphorylierung von L-Plastin konnte in Neutrophilen festgestellt werden (Paclet et al., 2004). FPR1 ist ein wichtiger Chemokinrezeptor auf humanen polymorphonukleären Neutrophilen (PMN), dessen Stimulation zu Modifikationen von migrations-assoziierten Proteinen führt (Boldt et al., 2006). In PMNs kommt es auch durch die frühen Ereignisse einer Ligation des FC $\gamma$ R in Immunkomplexen zu einer Phosphorylierung von L-Plastin. Die FC $\gamma$ R2 Adhäsion sowie die Phagozytose von IgG-opsonierten Partikeln induzieren neben der Phosphorylierung auch die Translokation von L-Plastin in die Podosomen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung nicht durch das Mycotoxin Cytochalasin blockiert werden kann, was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung kein intaktes Aktinzytoskelett benötigt (Jones and Brown, 1996). In unserer Arbeitsgruppe wurde die Phosphorylierung von L-Plastin als Rezeptor-vermitteltes kostimulatorisches Ereignis in untransformierten humanen peripheren T Lymphozyten beschrieben (Henning et al., 1994).

Über die Phosphorylierungsstellen innerhalb des Proteins gaben Mutationsexperimente Aufschluss. Diese, in Fibroblasten durchgeführten Analysen, lieferten erste Hinweise auf die Lokalisation der Modifikation und determinierten die Aminosäurereste Serin 5 (Ser5) und Serin 7 (Ser7) als mögliche Phosphorylierungsstellen (Lin et al., 1998). Eine Phosphorylierung von Ser5 konnte ebenfalls in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde über eine Phosphorylierung von Ser7, unter Voraussetzung einer bereits erfolgten Phosphorylierung von Ser5, spekuliert (Jones et al., 1998). Inzwischen wurde eine

Phosphorylierung von L-Plastin vorwiegend an der Position 5 in Folge einer Vielfalt von Stimuli in verschiedensten Zelltypen beschrieben, wobei über die Funktion der Phosphorylierung erst wenig bekannt ist.

Man weiß, dass die Phosphorylierung von L-Plastin eine Rolle in der Aktivierung von T Lymphozyten hat. Frühere Arbeiten aus unserem Labor zeigten eine Induktion der L-Plastin Phosphorylierung durch eine Kostimulation von peripheren Blut-T Lymphozyten (PBT) und einen verstärkten Oberflächentransport der T Zell-Aktivierungsmoleküle CD69 und CD25 (Wabnitz et al., 2007). L-Plastin ist auch wichtig für die Ausbildung der immunologischen Synapse (IS). Die Expression einer nicht-phosphorylierbaren L-Plastin Mutante resultierte in einer reduzierten Akkumulation von LFA-1 in der IS. Dabei ist die Phosphorylierung von L-Plastin und damit auch die Ausbildung der IS durch das Immunsuppressivum Dexamethason inhibierbar (Wabnitz et al., 2011).

Über die an der Phosphorylierung von L-Plastin beteiligten Kinasen wird indes noch stark diskutiert. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA) L-Plastin *in vitro* phosphorylieren kann (Matsushima et al., 1988; Wang and Brown, 1999). Auch die Tatsache, dass die Phosphorylierungsstelle von L-Plastin am Aminosäurerest Serin 5 in einer Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch die PKA liegt, war ein weiterer Hinweis für deren Beteiligung (Shinomiya et al., 1995). In einer anderen Studie jedoch, in der Interleukin 8 und fMLP in PMNs eine Phosphorylierung von L-Plastin förderten, und auch der PKC-Aktivator PMA die Phosphorylierung signifikant stimulierte, schlussfolgerten die Autoren eine Signaltransduktionskaskade über PKC. Jedoch fehlten Beweise einer direkten Abhängigkeit (Shibata et al., 1993a; Shibata et al., 1993b)). In den Untersuchungen von Matsushima 1987 in PMNs konnten Inhibitoren der Adenylylcyclase und der Protein Kinase A die Phosphorylierung nach IL-1 Stimulation blockieren, wohingegen PKC-Inhibitoren keine Hemmung auslösten (Matsushima et al., 1987). Auch Wang und Kollegen diskutierten weitere Möglichkeiten. Demnach unterscheidet sich die verantwortliche Kinase in Abhängigkeit des Zelltyps sowie des verwendeten Stimulus. Untersuchungen der Phosphorylierung, ausgelöst durch fMLP, wiesen auf mehrere Signalwege hin, die an der L-Plastin Phosphorylierung beteiligt sind. So verringerten Inhibitoren der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), der Phospholipase D (PLD) und der Protein Kinase C (PKC) die Phosphorylierung (Wang and Brown, 1999). Trotz der intensiven Forschung an der verantwortlichen Kinase konnten noch keine eindeutigen Ergebnisse geliefert werden.

#### II.2.3.4 Ektope Expression von L-Plastin in Krebszellen

Die Expression von L-Plastin korreliert mit der freien Beweglichkeit von Zellen. Diese Eigenschaft trifft neben Leukozyten auch auf Krebszellen zu. Bereits eine der ersten Beschreibungen von L-Plastin stammt aus transformierten Zellen (Anderson et al., 1985). Seither wurde die ektope Expression von L-Plastin in einer Vielzahl nicht-hämatopoetischer transformierter Zellen, nicht jedoch in deren entsprechenden normalen Geschwisterzellen nachgewiesen (Leavitt et al., 1982; Leavitt and Kakunaga, 1980) und dient somit als Marker für humane Krebszellen (Leavitt et al., 1994). Untersuchungen an transformierten Zelllinien konnten eine ektope Expression von L-Plastin in 68 % aller getesteten Karzinome epithelialen Ursprungs, und in 53 % der mesenchymalen Tumore offenbaren (Lin et al., 1993). Zudem ist das L-Plastin Gen in den meisten humanen Tumorzelllinien (ca. 90 %) transkribiert, wie RT-PCR-Experimente belegen konnten (Park et al., 1994). Expression, Funktion und Korrelation von L-Plastin mit der Malignität unterscheiden sich je nach Ursprung des transformierten Gewebes. Ein Zusammenhang zwischen einer L-Plastin Expression und der Tumormetastasierung wurde für Darmkrebs (Foran et al., 2006; Otsuka et al., 2001) postuliert. In der metastatischen Darmkrebszelllinie SW620 ist das Gen, das für L-Plastin kodiert, im Vergleich zu der dazugehörigen premetastatischen Linie SW480, hochreguliert (Foran et al., 2006). Bei Darmkrebszelllinien die von einem primären und von metastatischen Tumoren eines einzigen Patienten generiert wurden, zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der L-Plastin Genexpression und der Progression des Krebsstadiums (Otsuka et al., 2001). Jedoch fehlte bisher ein direkter funktioneller Beweis *in vivo*. Ähnliches konnte auch für Prostatakrebs herausgefunden werden. RT-PCR sowie immunhistochemische Analysen an Karzinomzelllinien und malignem Prostataepithel konnten bestätigen, dass L-Plastin in tumorbefallenem Gewebe, jedoch nicht in gesundem Prostatagewebe exprimiert wird. Ein Zusammenhang zwischen Stadium der Malignität und Expression war nicht offensichtlich (Zheng et al., 1997). Der durch die Expression eines L-Plastin-antisense Gens verursachte verringerte Proteingehalt in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 verminderte die Proliferation und Invasion, wobei das Metastasierungsverhalten der Zellen nicht untersucht wurde (Zheng et al., 1999). Des Weiteren wurde berichtet, dass der Einsatz von Nanopartikeln zur Blockierung von L-Plastin die Invasion von malignen Prostatazellen im Matrigel-Invasionstest inhibiert (Delanote et al., 2010). Die Expression von L-Plastin in Prostatakarzinomzellen unterliegt der Regulation durch Steroidhormonrezeptoren (Zheng et al., 1997). Entsprechend beinhaltet der Plastin-Promoter mehrere Hormonrezeptor-sensitive Elemente, eine Östrogen- und drei

Androgen-spezifischen Regionen (Lin et al., 2000; Lin et al., 1993). Eine siRNA vermittelte verminderte L-Plastin Expression der humanen Melanomzelllinie IF6 führte ebenfalls zu einer reduzierten haptotaktischen Migration. Dementsprechend konnte eine ektope Expression von L-Plastin in der humanen Melanomzelllinie MV3 die Migration der Zellen in einem Transwellassay steigern (Klemke et al., 2007)

Im Rahmen der Arbeit von Klemke und Kollegen 2007 aus unserer Arbeitsgruppe wurde auch erstmals der Phosphorylierungsstatus von L-Plastin berücksichtigt. Darin konnte gezeigt werden, dass das invasive Potential humaner Melanomzellen durch die Phosphorylierung ektop exprimierten L-Plastins verstärkt wird (Klemke et al., 2007). Einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung des Phosphorylierungszustandes fand später Janji, der in einer Brustkrebszelllinie eine von der Phosphorylierung von L-Plastin abhängige Resistenz gegen  $\text{TNF}\alpha$  beschrieb (Janji et al., 2010). Wobei über die Regulation der Phosphorylierung von L-Plastin in nicht-hämatopoetischen Tumorzellen ist bisher nichts bekannt. L-Plastin erwies sich als regulierendes Protein, welches das metastatische Potential transformierter Zellen *in vitro* steigern konnte. Jedoch wurde bisher keine systematische Studie durchgeführt bei der die Bedeutung von L-Plastin und dessen Phosphorylierungsstatus untersucht wurde.

### **II.3 Ziel der Arbeit**

Zur erfolgreichen Metastasierung müssen Tumorzellen eine Vielzahl von Hindernissen überwinden. Dazu zählen die Einwanderung in die Blutbahn, das Überleben im Blutstrom, die Auswanderung ins Gewebe und die Ansiedlung und Etablierung einer metastatischen Kolonie. Für all diese Schritte muss die Zelle sich vielen unterschiedlichen physiologischen Bedingungen anpassen, Scher- und Zugkräften widerstehen und hoch mobil sein. Reguliert werden diese Prozesse überwiegend durch das Aktinzytoskelett der Zelle, das wiederum von Aktin bindenden Proteinen, wie L-Plastin, organisiert wird.

Untersuchungen zum Einfluss des ehemals als Leukozyten-spezifisches Plastin beschriebenen L-Plastins auf die Prozesse der Migration und Invasion von Tumorzellen wurden bisher hauptsächlich *in vitro* durchgeführt. Alle *in vivo* Hinweise beruhen auf Korrelationen in Patientenstudien, wobei funktionelle und kausale Zusammenhänge zwischen einer L-Plastin Expression und dem Metastasierungsstatus von Tumorzellen *in vivo* bisher fehlten.

Diese Studie sollte klären, ob L-Plastin eine kausale Rolle bei der Metastasierung nicht-hämatopoetischer maligner Tumorzellen übernimmt. Der zweite Fokus dieser

Arbeit lag auf der Analyse des Einflusses der Phosphorylierung von L-Plastin auf dessen Funktion in der Metastasierung von Tumorzellen. Dies wurde anhand eines Xenograft Mausmodells analysiert, in dem in einem ersten Ansatz die L-Plastin Expression in einer humanen Prostatakarzinomzelllinie über shRNA reduziert wurde. In einem zweiten Ansatz wurde ein Melanom-Modell verwendet, um die Auswirkung der ektopten Expression von phosphorylierbarem *versus* nicht-phosphorylierbarem L-Plastin auf die Tumormetastasierung zu charakterisieren.

## III Material und Methoden

### III.1 Materialien

#### III.1.1 Herstellerverzeichnis

abcam	Cambridge, UK
Apotheke des Universitätsklinikums	Heidelberg
AppliChem GmbH	Darmstadt
Affymetrix	High Wycombe, UK
B. Braun AG	Melsungen
BD Biosciences	Heidelberg
BD Transduction Laboratories	Heidelberg
BioLegend GmbH	Fell
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Biozym Scientific GmbH	Oldenburg
Calbiochem Merck4 Biosciences	Nottingham, UK
Caliper LiveSciences Xenogen	Alameda, CA, USA
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Carl Zeiss GmbH	Göttingen
Cell Concept	Freiburg
Charles River Laboratories	Sulzfeld
Clontech	Mountain View, CA, USA
Enzo Diagnostics	Framingdale, NY, USA
Eppendorf AG	Hamburg
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gibco (Invitrogen)	Darmstadt
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
IKA	Staufen
ImaGenes	Berlin
Innova, New Brunswick Scientific	Edison, New Jersey, USA
Invitrogen	Darmstadt

InvivoGen	San Diego
Jackson Immuno Research	Suffolk, UK
Life Technologies	Rockville, MD, USA
Linaris	Wertheim-Bettingen
Lonza	Köln
Marienfeld	Lauda-Königshofen
Menzel GmbH + Co KG	Braunschweig
Merck KGaA	Darmstadt
Millipore	Molsheim, F
Miltenyi Biotech	Bergische Gladbach
New England BioLabs	Frankfurt
Nikon GmbH	Düsseldorf
Nunc	Langenselbold
Pechiney Plastic Packaging	Menasha
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
PromoCell	Heidelberg
PromoKine	Heidelberg
Proteintech Group, Inc	Chicago, IL, USA
Qiagen GmbH	Hilden
Qiagen GmbH	Hilden
R&D Systems	Minneapolis, MI, USA
Sanyo	München
Sarstedt	Nümbrecht
Sartorius	Göttingen
Semper Care	Wien
Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Steinbrenner	Wiesenbach
The baker Company	Sanford, Maine, USA
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham MA, USA
Thermo Scientific	Bonn
UVP	Upland, CA, USA
VWR	Leuven, B
Webeco	Bad Schwartau
Whatman International Ltd.	Maldstone, UK
Zentrallager Theoretikum Universität	Heidelberg

### III.1.2 Laborausstattung

Autoklav	Webeco
Entwicklungsgerät	Typ CP 1000, Agfa
FACS Geräte	
FACSCalibur	BD
FACS-SCAN	BD
FACSVantage	BD
Feinwaage	BP211D, Sartorius laboratory
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Premium no frost
Gefrierschrank -80°C	Ultra Low, Sanyo
Gelsystem DNA	MiniSub Cell GT, BioRad
Gelsystem Proteine	Minigele, BioRad
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf
Inkubator Bakterienkultur	Incubator shaker, innova 4400
Inkubator Zellkultur	CO <sub>2</sub> Auto Zero, Heraeus instruments
IVIS 100 Imaging System	Xenogen
Kamera	Canon
Kühlschrank	Liebherr Premium no frost
Magnetrührer	IKAMAG REC-G, IKA
Mikroskope	
Time Lapse Videomikroskop	Axiovert 200 M, Zeiss
konfokales Mikroskop	Leica
Durchlichtmikroskop	ID 03, Zeiss
inverses Mikroskop mit Kamera	Leica, Canon
NanoDrop	ND-1000, Peqlab
pH Meter	pH720, inoLab
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten	Gibson
Pipettierhilfe	Pipetboy acu, IBS
Stromquellen	
Proteinsystem	PowerPac300, BioRad
Glyzin Gelsystem	1000/500, BioRad
Western Blot	LKB 2303 Multidrive XL
DNA Gelsystem	200/2.0, BioRad
Sterilbank	Steril Gard Hood, the baker Company
Stickstofftank	Chronos, Messer Griesheim

Thermocycler	T professional basic gradient, Biometra
UV Transilluminator	BioDoc-It Imaging System, UVP
Vortex	MS-1 Minishaker, IKA
Waage	Satorius laboratory
Wasserbad	Gfl 1092
Western Blot Kammer	PeqLab
Wippe	ST 5, CAT
Zählapparatur	CASY, Typ TT Innovatis Roche
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge	1-15 K, Sigma-Aldrich
Megafuge	3.0 RS, Heraeus instruments
Megafuge	3 S-R, Heraeus instruments
Megafuge	1.0 R, Heraeus instruments
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C, Eppendorf

### III.1.3 Verbrauchsmaterialien

Alkoholtupfer	Klinikapotheke
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co KG
Antisept	Klinikapotheke
Augen- und Nasensalbe	Klinikapotheke
Chromatographiepapier	Whatman # 3030917
Combitip plus	Eppendorf # 0030069.277
Deckgläser	Marienfeld # 2022318
Einmalhandschuhe Latex	Semper Care # 60260766
Einmalhandschuhe Nitril	VWR # 112-2372
Einwegskalpell	Feather No. 21 # 09109520
FACS Röhrchen	BD-Falcon # 352052
Falcon Reaktionsgefäße 15 ml	Greiner # 4210
Falcon Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner # 4230
Frischhaltefolie	Toppits
Injektionskanüle 0,3 mm x 13 mm	BD Microlance # 304000
Kodak BioMax Light Film	Sigma-Aldrich # 1538966
Kryoröhrchen 1,8 ml	nunc #343958
Minischraubröhre 1,5 ml	Greiner # 72.692.005
Objektträger	Menzel GmbH + Co KG # Iso 8037/1

Parafilm	Pechiney Plastic packaging # PM-996
Pasteurpipetten	WU Mainz
Petrischalen	nunc # 120928
Pipettenspitzen	Steinbrenner
PVDF-Membran 0,45 µm	Millipore # IPVH000010
SafeSeal Reagiergefäße 0,5 ml	Sarstedt # 72.704
Serologische Pipetten	costar
Spritzen	BD Microlance # 300013
Sterilfilter	Carl Roth GmbH + Ca KG
Transwell Cell Culture Inserts	BD # 353097
Wattestäbchen	Klinikapotheke
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	nunc # 178883
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	nunc # 156367
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	nunc # 156499

### III.1.4 Chemikalien

1 kb DNA Ladder	BioLabs # N3232S
Acrylamid	Roth # 3029.1
Agarose	Biozym # 840004
Aluminiumsulfat	J. T. Baker # 231-984-1
Aprotinin	Sigma-Aldrich # A1153
APS	Roth # 9593.2
Bacton™ Yeast Extract	BD # 211705
Bromphenolblau	Merck # 8122
BSA	Roth # 8076.3
DTT	Gebro # 1008
EDTA	Gebro # 1034
Essigsäure	Chemikalienlager Theoretikum
Ethanol	Chemikalienlager Theoretikum
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich # E 7637
FicoLite-H	Linaris # GTF1511YK-02
Glycerin	Applichem # A 3552,0500
Glyzin	Applichem # A 3177,1000
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck # 2014
Hexadimethrine bromide	Sigma-Aldrich # H9268

Kalimchlorid	Roth # 4936
Kaliumhydrogenphosphat	Roth # 4264348
Kcl	Merck # 4936
Ketanest	Klinikapotheke
Kollagen	BD # 354236
Leupeptin	Sigma-Aldrich # L 9783
Luciferin	Synchem OHG # BC219
Luminol (3-Amino-phtalhydrazid)	Fulka 09253
Methanol	Chemikalienlager Theoretikum
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich # M-9272
Mowiol	Calbiochem # 475904
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich # S6508
NaCl Kochsalzlösung 0,9 %	Braun # 8492A251
NaN <sub>3</sub>	Roth # K305.3
Natriumcarbonat	Applichem # A 1881,1000
Natriumchlorid	J.T. Baker # 0278
Natriumhydrogenphosphat	Merck # 6580
Nonident P40	Fluka # 74385
OPD Tabletten	Sigma-Aldrich # P6662-50TAB
p-Coumarsäure	Fulka # 28200
PBS	Biochrom AG # L182-10
PFA	Sigma-Aldrich # 16005
Precision Plus Protein Standards	Bio Rad # 161-0373
Propidiumiodid Lösung	Sigma-Aldrich # P4864-10ML
Saponin	Sigma-Aldrich # S4521-25G
SDS	Serva 20765
Temed	Roth # 2367.3
Tris	Roth # 4855.2
Triton X	Gebro # 2000
Tween 20	Gebro # 2001
Xylazine	Klinikapotheke

### III.1.5 Puffer, Medien und Reagenzien

#### III.1.5.1 Puffer und Medien für die Zellkulturarbeit

DMEM High Glucose	Cell Concepts # M-L2601-I
D-PBS Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Cell Concepts # B-L0500-I
D-PBS	Cell Concepts # B-L0529-I
RPMI 1640	Gibco # 21875-158
Trypsin	Gibco # 25300-096

#### III.1.5.2 Medium für die Bakterienkultur

##### LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
für Flüssigmedium	
Agar	17 g
zur Herstellung von Agarplatten	

#### III.1.5.3 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

##### Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-Hcl pH 6,8	60,55 g
0,4 % SDS	4,0 g
Aqua dest	1000 ml

Mit Aqua dest auf 800 ml auffüllen und pH prüfen. SDS hinzugeben und auf 1000 ml auffüllen.

##### Trenngelpuffer

1,5 M Tris-Hcl pH 8,8	181,71 g
0,4 % SDS	4,0 g
Aqua dest	1000 ml

Mit Aqua dest auf 800 ml auffüllen und pH prüfen. SDS hinzugeben und auf 1000 ml auffüllen.

Laempuffer pH 8,8 (10x)

1900 mM Glyzin	713,15 g
250 mM Tris	151,35 g
1 % SDS	50,0 g
Aqua dest.	5,0 l

Laemmli Ladepuffer (3x)

Tris Hcl pH 6,8	9,5 ml 0,5 M pH 6,8
9 % SDS	2,25 g
30 % Glycerin	8,6 ml 87 % Glycerin
150 mM DTT	0,575 g
Bromphenolblau	Spatelspitze
Auf 25 ml auffüllen	

TKM Lysepuffer

1,5 M Tris Hcl pH 7,5	0,5 ml
1 M Kcl	0,25 ml
1 M MgCl <sub>2</sub>	0,05 ml
1 M Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,01 ml
0,1 M NaF	0,5 ml
Leupeptin (2 mg/ml)	0,1 ml
Aprotinin (2 mg/ml)	0,1 ml
NP40 (20 %)	0,1 ml

Mit Aqua dest auf 10 ml auffüllen

Zur Analyse möglicher Phosphorylierungen von L-Plastin in Zelllysaten über ein natives Glyzingel wurde dem TKM Puffer 0,3 µM Okadainsäure hinzugefügt.

### III.1.5.4 Puffer und Lösungen für Glyzin-Gele

4 x Glyzinpuffer

Glyzin	15,01 g
Aqua dest	500 ml

pH mit 1 M NaOH auf 9,5 einstellen, mit Aqua dest auf 1000 ml auffüllen

## Probenpuffer

Saccharose	750 mg
Glyzin (200 mM)	3,75 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze

Mit Aqua dest auf 10 ml auffüllen

Vor Benutzung 1 ml Probenpuffer mit 36 µl DTT (2,6 M) versetzen.

*III.1.5.5 Puffer und Lösungen für WB*

## Semi-Dry-Blot Transferpuffer

Glyzin	2,93 g
Tris	5,81 g
SDS 10%	3,7 ml
Aqua dest	796,3 ml
Methanol	200 ml

## Blockingpuffer

1 x PBS	1000 ml
0,1 % Tween 20	1 ml
5 % BSA	5 g

## Waschpuffer

1 x PBS	1000 ml
0,1 % Tween 20	1 ml

## Methanol

## ECL Reagenz

Lösung A	Luminol (3-Amino-phtalhydrazid)
	0,5 g Luminol in 11,3 ml DMSO ergibt 250 mM
Lösung B	p-Coumarsäure (trans-Hydroxy-Zimtsäure)
	0,25 g p-Coumarsäure in 16,925 ml DMSO ergibt 90 mM
Lösung C	1,5 M Tris Hcl pH 8,8
	Vorratslösung bei 4°C in dunkler Flasche haltbar:
	Lösung A 2,5 ml
	Lösung B 1,113 ml
	Lösung C 16,67 ml

Aqua dest 229,717 ml

Unmittelbar vor Gebrauch zu 10 ml ECL-Mix 3,05 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugeben und mischen.

### III.1.5.6 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

#### 10 x TBE-Puffer

Tris	107,8 g
Borat	55,03 g
Na <sub>2</sub> EDTA	0,744 g
pH 8,3	

#### Gelladepuffer Orange 6x

Tris/Hcl pH 7,5	60 mM
Na-Acetat	30 mM
EDTA	12 mM
Glycerol	60 % (w/v)
Orange G	0,36 % (w/v)

### III.1.5.7 Puffer und Lösungen für die durchflusszytometrischen Analysen

#### FACS-Puffer

PBS <sup>+</sup>	500 ml
1 M NaN <sub>3</sub>	0,5 ml
BSA	2,5 g

#### Permeabilisierungspuffer

0,05 % Saponin in FACS-Puffer

#### Fixierungspuffer (1,5 % PFA)

PFA	1,5 g
PBS <sup>+</sup>	80 ml
bei 60°C lösen	
1 N NaOH	1 Tropfen
pH auf 4,7 mit 1 N Hcl einstellen	

### III.1.5.8 Puffer und Lösungen für die Transwelluntersuchungen

Migrationsmedium

RPMI 1640 + 0,1 % BSA

PBS-EDTA

PBS<sup>+</sup>

4 mM EDTA

Kollagen

20 µg/ml in 0,02 N Essigsäure

### III.1.6 Kits und Reagenzien

#### III.1.6.1 Kits

Amaza Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza # VCA-1003
BioArray high yield RNA labelling	Enzo Diagnostics # ENZ-42655-10
Gel Extraction Kit	Qiagen # 28704
Mycoplasmen PCR	Venor GeM # 11-7048
Pan T-cell isolation kit	Miltenyi Biotech # 130-091-156
PCR Purification Kit (250)	Qiagen # 28106
Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen # 12163
QIApre spin Miniprep Kit (250)	Qiagen # 27106
RNeasy Mini Kit	Quiagen # 74104
SuperScript Choice System	Life Technologies # 18090-019
GeneChip <sup>®</sup> Gene 1.0 ST V1 Array	Affymetrix # 901085

#### III.1.6.2 Reagenzien

Antibiotika:

G418	PromoCell # C-42094
Puromycin	Calbiochem # 540411
Hygromycin B	PromoCell # C-42095
Pen/Strep	Gibco # 15140

Ampicillin	Sigma-Aldrich # A-9518
CFSE	molec prob # C-1157
Interleukin 8	PromoKine # C-61830
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen # 11668-027
OPD Tabletten	Sigma-Aldrich # P6662-50TAB
PMA	Sigma-Aldrich # P 1585
SDF1 $\alpha$	Sigma-Aldrich # SRP 4388
Forskolin	Sigma-Aldrich # F6886-10MG
Ascorbinsäure	Roth # 3525.1

### III.1.7 Antikörper

#### III.1.7.1 Primärantikörper

**Tabelle III-I: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primärantikörper**

Antikörper	Beschreibung	Verwendung	Herkunft	Nummer
<b>LPL4A.1</b>	mk, M, IgG	WB: 1 $\mu$ g/ml FACS: 4 $\mu$ g/ml IH: 5 $\mu$ g/ml	Neomarks	# MS-1326-P1
<b>recPla662</b>	pk, R	WB: 1:10.000	Eurogentec	# SA662
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	pk, R	WB: 1:900	Sigma-Aldrich	# A2066
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	mk, M	WB: 1:5.000	Sigma-Aldrich	# A5316
<b>Luciferase</b>	pk, R, IgG	FACS: 10 $\mu$ g/ml	Sigma-Aldrich	
<b>Phalloidin AF 647</b>	G, anti-M IgG	IF: 1:100	Invitrogen	# A22287
<b>Phalloidin AF 488</b>	G, anti-M IgG	IF: 1:100	Invitrogen	#A12379

M = Maus, R = rabbit (= Kaninchen), G = goat (Ziege), mk = monoklonal, pk = polyklonal, WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz, IH = Immunhistologie

**Tabelle III-II: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten direkt markierten Antikörper**

Antikörper	Verwendung	Herkunft	Nummer
<b>Maus anti human CXCR4 (CD184) PECy5</b>	FACS: 1:10	BD	# 555975
<b>Maus anti human E-Cadherin (CD324) PE</b>	FACS: 1:20	BioLegend	# 324106

### III.1.7.2 Sekundärantikörper

**Tabelle III-III: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sekundärantikörper**

Antikörper	Verwendung	Herkunft	Nummer
Ziege anti Maus HRP	WB: 0,08 µg/ml	Jackson	# 715-035-150
Ziege anti Kaninchen IgG HRP	WB: 0,08 µg/ml	Jackson	# 711-035-152
PE Ziege anti Maus Fab2	FACS: 1:200	Dianova	# 715-116-151
PE Ziege anti Kaninchen Fab2	FACS: 1:200	Dianova	# 711-116-152
FITC Ziege anti Kaninchen IgG	FACS: 1:200	Jackson	# 711-095-152
Cy2 Ziege anti Kaninchen Fab	FACS: 1:200	Dianova	# 711-227-003
Brilliant Violet 421 Ziege anti Kaninchen	FACS: 1:50	Biolegend	# 406410

### III.1.8 Enzyme

DNA Polymerasen:	Taq	New England BioLabs # M0267S
Restriktionsenzyme:	<i>BamHI</i>	New England BioLabs # MO223S
T4 DNA Ligase		Promega # M1801

### III.1.9 Oligonukleotide

**Tabelle III-IV: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotide**

Oligonukleotide	Herkunft	Sequenz
Luc.for	Invitrogen	CCGACGCACATATCGAGGTG
Luc.rev	Invitrogen	CCTTAATGAGAATCTCGCGG
EGFP BamH1.for	Invitrogen	GCATGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG
EGFP Nco1.rev	Invitrogen	GCATCCATGGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
HTLV 5UTR	Invitrogen	TGCTTGCTCAACTCTACGTC
SV40 pAN	Invitrogen	AACTTGTTTATTGCAGCTT

### III.1.10 Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle III-V aufgelistet.

**Tabelle III-V: Eigenschaften und Herkunft der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide**

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
<b>pUC19-LPL</b>	Expressionsplasmid mit Ampicillin- und Hygromycin B Resistenzgen, CMV Promotor, enthält den ORF von L-Plastin einkloniert über <i>BamHI</i>	eigenes Labor
<b>pUC19-S5A-LPL</b>	Expressionsplasmid mit Ampicillin- und Hygromycin B Resistenzgen, CMV Promotor, enthält den ORF von S5A mutiertem L-Plastin einkloniert über <i>BamHI</i>	eigenes Labor
<b>pSELECT-hygro-mcs</b>	Duales Expressionsplasmid mit Hygromycin B Resistenzgen, hEF1/HTLV Promoter und MCS	InvivoGen
<b>pSELECT-LPL</b>	Duales Expressionsplasmid mit Hygromycin B Resistenzgen, hEF1/HTLV Promoter, enthält den ORF von L-Plastin einkloniert über <i>BamHI</i>	Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert
<b>pSELECT-S5A-LPL</b>	Duales Expressionsplasmid mit Hygromycin B Resistenzgen, hEF1/HTLV Promoter, enthält den ORF von S5A mutiertem L-Plastin einkloniert über <i>BamHI</i>	Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert
<b>pCAGG3.1-Luc2</b>	Expressionsplasmid mit G418- Antibiotika Selektionsgen und „Chicken actin“ Promoter, enthält den ORF von Luciferase	G. van der Pluijm

### III.1.11 Organismen

#### III.1.11.1 Bakterien

Das Bakterium *Escherichia coli* (Stamm XL2 blue) fungierte als Zwischenwirt für konstruierte Plasmide. Der Genotyp sowie die Referenz des verwendeten Stammes sind in Tabelle III-VI aufgeführt.

**Tabelle III-VI: Verwendeter *E. coli* Stamm, dessen Genotyp und Herkunft**

Stamm	Genotyp	Herkunft
<b><i>E. coli</i> XL2 blue</b>	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 Amy Cm <sup>R</sup> ] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene

### **III.1.11.2 Zelllinien**

#### **III.1.11.2.1 Humane Prostatakarzinomzelllinie PC-3M-pro4/luc**

Die PC-3 Linie entstammt einer Knochenmetastase eines Grad IV Prostata Adenokarzinoms eines 62-jährigen männlichen kaukasischen Patienten (Kaighn et al., 1979). Die adhärenzte Zelllinie wächst in Kultur als Einzelschicht. Diese PC-3 Zellen wurden in Vorsteherdrüsen athymischer Mäuse injiziert. Anschließend wurden Klone mit erhöhtem metastatischem Potential ausgewählt. Die Zellen aus den Xenotransplantat-Tumoren wurden anschließend mehrere Male wieder in die Prostata athymischer Mäuse inokuliert und somit selektioniert (Buijs et al., 2007a; Buijs et al., 2007b). In die auf diese Weise generierten PC-3M-Pro4 Zellen mit gesteigerter Malignität wurde stabil das Reportergen für Luciferase transfiziert. Diese Zelllinie ist eine freundliche Gabe von Herrn Dr. Marco Cecchini (Universität Bern; Abteilung Urologie/urologisches Forschungslaboratorium, Bern).

#### **III.1.11.2.2 Humane Melanomzelllinie MV3**

Die Zelllinie MV3 ist eine Melanomzelllinie und stammt ursprünglich aus einer Lymphknotenmetastase (Edward, 2001; van Muijen et al., 1991) einer 76 jährigen kaukasischen Patientin. Nach chirurgischer Entfernung wurden Fragmente der frischen Melanommetastase Nacktmäusen subkutan injiziert. Diese Passagierung wurde dreimal wiederholt. Die Zelllinie zeichnet sich durch ein hohes Metastasierungspotential in Nacktmäusen aus und wächst als Einzelschicht in der Zellkultur.

### **III.1.11.3 Primäre Zellen**

#### **III.1.11.3.1 Humane periphere Blut T Lymphozyten (PBT)**

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen T Lymphozyten dienten ausschließlich Kontrollexperimenten. Die Zellen wurden aus heparinisiertem Vollblut freiwilliger Spender gewonnen. Humane PBMCs wurden durch eine Ficoll Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut erhalten. Die T Lymphozyten wurden durch eine Negativselektion über magnetische Kugeln mit dem „*Pan T-cell isolation kit II*“ (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

## III.2 Methoden

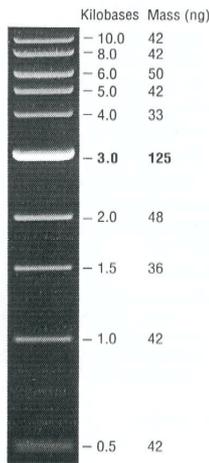
### III.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### III.2.1.1 Kultivierung der Bakterien

Die Anzucht der *E.coli* Kulturen erfolgte in LB-Flüssigmedium bei 37°C im Rundschtüttler bei 220 upm bzw. auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37°C. Zur Selektion von Plasmiden mit Amp<sup>R</sup>-Gen-Expressionskassette wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Entsprechend bei einer Selektion über ein Hygromycinresistenzgen durch Hygromycin B in einer Endkonzentration von 50 µg/ml.

#### III.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein Verfahren dar, mit dessen Hilfe Makromoleküle wie Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Aufgrund der ionisierten Phosphatgruppen der DNA- und RNA-Moleküle besitzen Nukleinsäuren eine negative Nettoladung, wodurch eine Wanderung im elektrischen Feld zur Anode hin veranlasst wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei neben der Nettoladung von Größe und Konformation der Moleküle ab. Des Weiteren kann die Geschwindigkeit durch die elektrische Feldstärke, die Porengröße der Gelmatrix und die Pufferzusammensetzung beeinflusst werden. Die Durchführung erfolgte nach einer Vorschrift von Sambrook (Sambrook, 1989) in einem 1 %igen Agarosegel in 1 x TBE-Puffer (pH 8,3) bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm. Zur Markierung der Lauffront wurden die Proben mit 1/6 Volumen Ladepuffer versetzt. Die Bestimmung der Fragmentgröße erfolgte durch Abgleich mit einem Standardmarker („1 kb DNA ladder, BioLabs) der in [Abbildung III-1](#) dargestellt ist. Zur Detektion der DNA wurde das Gel mit Ethidiumbromid (30 mg/l) versetzt. Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridiniumbromid) ist ein roter Phenanthridin-Farbstoff, der sich als interkalierende Substanz zwischen den Basen doppelsträngiger DNA/RNA einlagert, sein Absorptionsspektrum dadurch verändert und unter Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert.



**Abbildung III-1:** Marker zur Größenbestimmung der DNA Fragmente bei einer Agarosegelelektrophorese. 1 kb DNA Ladder (BioLabs) eingesetzt in 1 %igen Agarosegelen.

### III.2.1.3 DNA-Reisolierung aus dem Agarosegel

DNA-Fragmente können aus einem Agarosegel extrahiert werden. Hierfür wurde die DNA im Anschluss an eine Auftrennung im 1 %igen TBE-Agarosegel mit einem Skalpell aus der Agarose ausgeschnitten und mit Hilfe des „Gel Extraction Kit“ der Fa. Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die eluierte DNA wurde in Wasser aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### III.2.1.4 Restriktion von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen erlauben den Verdau von Plasmid-DNA. Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um bakterielle Enzyme, die in der Lage sind, spezifische Sequenzen aus 4-8 Basenpaaren in einer doppelsträngigen DNA zu erkennen und die Phosphodiesterbindungen innerhalb dieser Erkennungsstellen zu spalten. Dabei entstehen kurze einzelsträngige Überhänge („sticky ends“) mit einem 5'Phosphat- und einem 3'OH-Ende. In Bakterien zählen diese Enzyme zu den Abwehrmechanismen gegen fremde DNA. Zum Verdau eines Plasmids wurde ein Restriktionsverdau mit folgenden Komponenten durchgeführt:

DNA	1,0 $\mu\text{l}$
10 x Puffer	2,0 $\mu\text{l}$
Restriktionsendonuklease I	0,5 $\mu\text{l}$
Restriktionsendonuklease II	0,5 $\mu\text{l}$
RNaseA	0,1 $\mu\text{l}$
A. dest	ad 20,0 $\mu\text{l}$

Die Reaktion verlief bei 37°C maximal 1,5 Stunden. Anschließend wurde die restringierte DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Sollte die fragmentierte DNA in einer Ligation zum Einsatz kommen, wurde das Restriktionsprodukt reisoliert.

### III.2.1.5 Ligation

Im Rahmen einer Ligation werden komplementäre Enden von DNA-Doppelsträngen mittels DNA-Ligasen verknüpft, womit eine Klonierung von DNA-Restriktionsfragmenten in einen zuvor linearisierten Vektor möglich wird. Bei diesem Vorgang kommt es zur ATP-abhängigen Schließung einer Phosphodiesterbindung zwischen der freien 5'Phosphatgruppe und der 3'Hydroxylgruppe zweier aufeinanderfolgender Zuckerreste im Zucker-Phosphatrückgrad. Um komplementäre Basenpaarungen an den Ligationstellen zu erreichen, ist eine vorherige Behandlung von Vektor und Insert mit den gleichen oder kompatiblen Restriktionsendonukleasen notwendig. Verwendung fand die T4-DNA-Ligase des Phagen T4 (Fa. AppliChem), welche sowohl zur Verknüpfung von „*sticky ends*“ als auch von „*blunt ends*“ in der Lage ist.

Der zu ligierende DNA-Abschnitt wie auch der Zielvektor wurden restringiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Restriktionsfragmente aus dem Gel isoliert. Die zur Ligation eingesetzte Insertmenge variierte in Abhängigkeit der Insert- und Vektorgröße. Der Ligationsansatz setzte sich entsprechend zusammen:

Insert	x µl
Vektor	17,0 – x µl
10 x Ligationspuffer (Applichem)	2,0 µl
T4-DNA-Ligase (Applichem)	1,0 µl

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C. Im Vorfeld einer Elektroporation des Ligationsansatzes in elektrokompente *E. coli*-Zellen erfolgte eine Dialyse gegen 10 %iges Glycerin über 1 h zur Verringerung des Salzgehaltes. Dazu wurde der Ligationsansatz auf einen 0,025 µm-Dialysefilter (Millipore) pipettiert.

### *III.2.1.6 Transformation von E. coli mit rekombinanter Plasmid-DNA (Elektroporation)*

Die Methode der Elektroporation basiert auf der Porenbildung in der Bakterienmembran durch Behandlung mit kurzen elektrischen Impulsen hoher Frequenz. Dadurch wird die Zellmembran für hochmolekulare Stoffe durchlässig und eine Transformation pro- und auch eukaryotischer Zellen wird ermöglicht (Calvin and Hanawalt, 1988; Dower et al., 1988).

Zur Elektroporation wurden *E. coli* Zellen des Stammes XL2 blue verwendet. Der Elektroporationsansatz bestand aus 40 µl kompetenten Zellen und dem Ligationsgemisch. Die Elektroporation erfolgte in gekühlten Elektroporationsküvetten (Fa. BioRad) bei einem Ohmschen Widerstand von 200 Ω, einer Spannung von 2,5 kV sowie einer Feldstärke von 25 µF im Gene Pulser II der Fa. BioRad. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in vorgewärmtem Medium zur Stabilisierung aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde auf drei LB<sub>Amp</sub>-Platten in Aliquots von 50-250 µl ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### *III.2.1.7 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen*

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA, die frei von RNA ist, wurde das "Plasmid-Miniprep-Kit" der Fa. Qiagen verwendet. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers aus den zuvor transformierten Bakterienzellen, die als Zwischenwirt fungierten. Diese Methode der Plasmidisolierung basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Zellen mit einer nachfolgenden selektiven Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silikamembran. Durch wiederholte Waschschrte kann die Plasmid-DNA von Verunreinigungen mit Proteinen und RNA befreit werden, mit Wasser eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

### *III.2.1.8 DNA-Konzentrationsbestimmung*

Die Konzentrationsbestimmung einer löslichen DNA-Suspension erfolgte photometrisch durch die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die Messung erfolgte mit dem Gerät „BioPhotometer“ der Fa. Eppendorf in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 8,5 mm. Reine DNA zeigt ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum aromatischer

Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan liegt bei 280 nm. Durch Bildung des Quotienten aus den Absorptionen  $A_{260}/A_{280}$  ist die Bestimmung der Reinheit der DNA möglich. Dieser Wert sollte bei reiner DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte unter 1,8 weisen auf eine hohe Proteinkonzentration hin, wohingegen ein Quotient über 2,0 das Vorhandensein von RNA vermuten lässt.

Zur Messung wurde ein Volumen von 100  $\mu\text{l}$  eingesetzt, wobei die DNA-Proben in einer Verdünnung von 1:100 vorlagen und gegen steriles Wasser als Referenz gemessen wurden.

### *III.2.1.9 Präparation von Gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen*

Die Aufreinigung von Gesamt RNA aus eukaryotischen Zelllinie erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Lysierte und homogenisierte Zellen wurden auf eine Silikamembran gegeben, die RNA Sequenzen über 200 Basen bindet. Weitere Verunreinigungen wurden ausgewaschen und die Gesamt RNA mit Wasser von der Silikasäule eluiert.

### *III.2.1.10 RNA-Konzentrationsbestimmung*

Die RNA-Konzentration sowie der Reinheitsgrade der aufgereinigten Nukleinsäuren wurden photometrisch am Gerät „NanoDrop ND-1000“ (Peqlab) bestimmt. Für alle Arbeiten wurden RNase-freie Materialien verwendet.

Dieses spezielle Photometer ermöglicht die Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in sehr kleinen Volumina. Die Nukleinsäurekonzentration errechnete sich aus den erhaltenen Extinktionswerten nach folgender Formel:  $c = OD_{260} \times E \times d$ , wobei c die Nukleinsäurekonzentration, E der Extinktionskoeffizient und d der Verdünnungsfaktor ist. Gemessen wurde in einem Volumen von 1  $\mu\text{l}$ .

## **III.2.2 Protein- und Immunchemische Methoden**

### *III.2.2.1 Auftrennung von Proteingemischen mittels SDS-PAGE*

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das denaturierende System der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Die 1967 von Shapiro beschriebene

Methode ist eine schnelle, einfache und empfindliche Möglichkeit zur Analyse von Proteinen (Shapiro et al., 1967). Sie basiert auf der Auftrennung der durch SDS denaturierten Proben im elektrischen Feld nach ihrer Größe.

Dabei führen Denaturierungsreagenzien und ein Überschuss an SDS zur Auflösung der Tertiärstruktur der Proteine und zur Dissoziation von Komplexen und Multimeren in ihre Untereinheiten. An die Peptidketten lagern sich entsprechend ihrer Länge negativ geladene SDS-Moleküle an, durch die die Eigenladung des Proteins komplexiert und ihm eine negative Partialladung verliehen wird, die zur Molmasse annähernd proportional ist.

Die Porengröße der zur Auftrennung verwendeten chemisch inerten Polyacrylamidgele wird durch die Konzentration von Acrylamid und dem quervernetzenden Methylenbisacrylamid bestimmt. Ammoniumpersulfat (APS) führt zur durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) katalysierten Polymerisation.

In der vorliegenden Arbeit kam die Methode der diskontinuierliche SDS-PAGE zum Einsatz, wodurch eine Konzentrierung der Proben im großporigen Sammelgel und eine anschließende Auftrennung der Komponenten im engporigen Trenngel erreicht wurde.

Ansatz zur Herstellung von zwei Sammel- und Trenngelen:

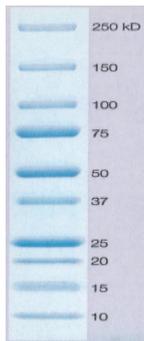
Trenngel (10 % Polyacrylamid):

Rotiphoresegel 30 (Acrylamid)	7,00 ml
Tris-1,5 M pH 8,8	5,25 ml
Aqua dest	8,75 ml
TEMED	14 µl
APS 10 %	210 µl

Sammelgel (5 % Polyacrylamid):

Rotiphoresegel 30 (Acrylamid)	1,50 ml
Tris-0,5 M pH 6,8	2,25 ml
Aqua dest	5,25 ml
TEMED	90 µl
APS 10 %	9 µl

Das gegossene Trenngel wurde vor dem Polymerisieren mit 2-Propanol überschichtet, welches vor dem Hinzufügen des Trenngels durch Waschen mit Wasser wieder vollständig entfernt wurde. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde parallel zu den Proben eine Mischung von Proteinen bekannter molekularer Masse (Abbildung III-2) elektrophoretisch getrennt.



**Abbildung III-2:** Precision Plus Protein™ Standards All blue (Bio Rad) zur Größenbestimmung der Proteine bei einer SDS-PAGE.

### Probenvorbereitung

Zur Auftrennung wurden 9 µl der mittels TKM-Lyse lysierten Zellen eingesetzt, mit 3 x Ladepuffer (Endkonzentration 1 x) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlen auf RT wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel im vertikalen Elektrophoresesystem „Power Pac“ (Fa. BioRad). Die aufgetrennten Proben wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert und mit Antikörpern detektiert.

### *III.2.2.2 Auftrennung von Proteingemischen im Glyzin-Gelsystem*

Die Auftrennung von Proteingemischen im Glyzin-Gelsystem erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Dieses System ermöglicht eine Unterscheidung von phosphorylierten Proteinen und unphosphorylierten Proteinen durch eine veränderte Laufeigenschaft im Glyzingel unter nativen Bedingungen.

Ansatz zur Herstellung von zwei Glyzin-Gelen (6 % Polyacrylamid):

Rotiphoresegel 30 (Acrylamid)	6,00 ml
4 x Glyzinpuffer	7,50 ml
Aqua dest	16,50 ml
TEMED	24 µl
APS 10 %	300 µl

### Probenvorbereitung

5 µl TKM-Lysat wurden mit 10 µl Probenpuffer für Glyzingele versetzt und ohne weitere Behandlung auf das Gel aufgetragen. Als Stromquelle für den Gellauf diente ein Gerät der Firma BioRad. Das Programm S1 wurde mit folgenden Bedingungen gewählt: 125

V, 15 mA pro Gel, 200 Vh. Die aufgetrennten Proben wurden auf eine PVDF-Membran übertragen und immunologisch analysiert.

### *III.2.2.3 WB/Immunodetektion*

Beim Western-Blot werden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Membran übertragen (Gershoni and Palade, 1983). Diese Methode des immunologischen Nachweises von Proteinen beinhaltet im Anschluss an den Transfer auf die Membran die Inkubation mit spezifischen Antikörpern, deren Bindung durch ein geeignetes Chemilumineszenz-Nachweisverfahren sichtbar gemacht wird.

#### III.2.2.3.1 „Semi-dry-Blotting“

Die PVDF-Membran wurde durch Methanol aktiviert und zusammen mit dem Polyacrylamidgel und dem Blotting-Papier in Transferpuffer kurz äquilibriert. Die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Western-Blotting Kammer der Firma Peqlab. Dabei waren die Blotting-Bestandteile in der Reihenfolge Filterpapier-Membran-Gel-Filterpapier von der Anode zur Kathode gestapelt. Der Protein-Transfer erfolgte über 1 h bei  $1,2 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche. Aufgrund der durch SDS verliehenen negativen Ladung der Proteine ergibt sich eine Wanderung im horizontalen Blotting-System von der Kathode zur Anode hin.

#### III.2.2.3.2 Immunodetektion mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem

##### Sekundärantikörper

Die Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde mit Blockierungspuffer (5 % BSA in Waschpuffer) abgesättigt, um freie, reaktive Bereiche zu blockieren, die unspezifische Bindungsstellen für die Antikörperlösung bieten können. Nach Dekantieren folgte eine einstündige Hybridisierung mit primärem Antikörper (Verdünnung nach Angaben des Herstellers in 20 ml Blockingpuffer). Die Lösung wurde durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und die Membran 30 min mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung nach Angaben des Herstellers in 20 ml Blockingpuffer) behandelt. Alle Schritte erfolgten bei RT unter ständigem Wippen. Nach weiteren vier Waschschritten von je fünf Minuten mit jeweils 20 ml Waschpuffer erfolgte die Zugabe von ECL-Reagenz mit  $3,1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ . Die Detektion der

Lichtemission erfolgte durch Auflegen von Röntgenfilmen in der Dunkelkammer, die anschließend mit dem Gerät CP1000 der Firma AGFA entwickelt wurden.

#### III.2.2.3.3 Bestimmung der Proteinmenge

Die Analyse der in den Zelllysaten enthaltenen Proteinmengen erfolgte densitometrisch mit dem Densitometer GS-800 der Firma BioRad. Dabei wurde die Bandenintensitäten des Proteins von Interesse durch Abgleich mit der Aktin-Bandenintensität der jeweiligen Probe relativiert. Dazu wurde das Programm QuantityOne der Firma BioRad verwendet.

### **III.2.3 Zellexperimentelle Methoden**

#### *III.2.3.1 Kultivierung der Zellen und Passagierung*

Die Inkubation der verwendeten Zelllinie erfolgte in RPMI-Medium für die Zelllinie MV3 bzw. in DMEM Medium für die Zelllinien PC-3M-pro4/luc mit 10 % FKS bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Zur Kultivierung von T Zellen wurde RPMI Medium mit 10 % FKS verwendet. Die gebräuchliche Kultivierung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen und die Passagierung erfolgte nach Erreichen einer 70-90 %igen Konfluenz. Dabei wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Falcongefäß überführt und bei 138 g 4 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Vollmedium gelöst und die gewünschte Menge in neue Kulturflaschen verteilt. Zum Passagieren unter Selektionsdruck wurden dem Kulturmedium Antibiotika in entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Die Anzucht der Zelllinie PC-3M-pro4/luc erfolgte unter Zugabe von 500 µg/ml G418 zum Erhalt der Luciferase-Expression sowie nach lentiviraler Infektion zusätzlich mit 1 µg/ml Puromycin. Die Zelllinie MV3 wurde nach Transfektion mit den L-Plastin cDNA-Konstrukten mit einer Hygromycin B Konzentration von 400 µg/ml kultiviert. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zum Test auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination der Zellen wurden von allen kultivierten Zelllinien regelmäßig Mykoplasmen-PCR-Reaktionen durchgeführt. Dazu wurde das Mycoplasmenkit von Venor GeM verwendet.

### *III.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl*

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit der CASY® Zellzählapparatur der Firma Innovatis nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese ermöglicht es, Zellzahl, Vitalität und Aggregationsgrad einer Zellsuspension zu analysieren. Für jede Zelllinie war es zunächst notwendig, mit „Casy® blue“-Lösung Kontrollproben toter Zellen unter standardisierten Bedingungen herzustellen, um bei der Vitalitätsmessung nach dem Stromausschlussverfahren die zelltypspezifische Position des „Totpeaks“ zu ermitteln. Bei lebenden Zellen mit einer intakten Zellmembran wirkt diese als elektrischer Isolator, der den Strom ausschließt, hingegen kann der Strom bei toten Zellen mit geschädigter Membran durch das Zytoplasma fließen. Dadurch wird eine simultane Differenzierung zwischen Zelltrümmern, toten Zellen, lebenden Zellen und Zellaggregaten ermöglicht.

Für die Messung der Zellzahl wurden entsprechend der Zelllinie 50 µl bzw. 100 µl einer Zellsuspension mit 10 ml „Casy®ton“-Lösung gemischt und in ein „CASY®cup“ gegeben. Anschließend wurde die Zellzahl durch eine dreimalige Messung von jeweils 400 µl der Zellsuspension mit einer 150 µl Kapillare bestimmt.

### *III.2.3.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen*

Zur langfristigen Archivierung gewonnener Zellklone wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden Zellen einer konfluent bewachsenen 750 ml Zellkulturflasche nach waschen und trypsinieren auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde zu je 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert und schrittweise bis auf  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Als Einfriermedium diente RPMI bzw. DMEM + 10 % FKS + 10 % DMSO.

### *III.2.3.4 Zellstimulation*

Die Stimulation adhärenter Zellen erfolgte im 24 Lochplatten Format. Dazu wurden am Vortag entsprechende Mengen von Zellen in die Vertiefungen ausgesät. Vor der Stimulation mit Phorbolester PMA wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von PMA zum frischen Kulturmedium in einer Endkonzentration von  $10^{-8}$  M. Die Stimulation verlief über 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  und wurde auf Eis abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend von der Zellkulturplatte gelöst und lysiert.

### III.2.3.5 Lysatpräparation

Die Lyse der adhären Ten Tumorzelllinien sowie der T Lymphozyten erfolgte durch TKM-Lysepuffer. Dazu wurden die Zellen gegebenenfalls durch Schaben von der Zellkulturplatte gelöst, bei 138 g für 4 min sedimentiert und anschließend mit PBS gewaschen.  $1 \times 10^6$  Tumorzellen wurden in je 5  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Zelltrümmer und Kerne wurden durch einen Zentrifugationsschritt (21.000 g, 4°C, 15 min) sedimentiert und der Überstand als postnukleäres Lysat in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Kurzfristig wurden die Lysate bei -20°C gelagert, für eine längere Lagerung wurden die Proben bei -80°C gehalten.

### III.2.3.6 Transfektionsmethoden

#### III.2.3.6.1 Lipofektion

Unter der DNA-Transfektion einer eukaryotischen Zelle versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in eine lebende Zelle. Das Einbringen fremden genetischen Materials in eine eukaryotische Zelle mit Hilfe von Liposomen wird als Lipofektion bezeichnet. Dabei wird die Komplexbildung aus negativ geladener DNA und kationischen Lipiden ausgenutzt, um die Abstoßungsreaktion der negativ geladenen DNA an der ebenfalls negativ geladenen Membran zu verhindern. Der daraus resultierende DNA-Lipid-Komplex kann mit der Zellmembran fusionieren und diese endozytotisch passieren. Zur stabilen Transfektion muss die eingeschleuste DNA im Anschluss in das Genom der Wirtszelle aufgenommen werden. Zur Selektion stabil transfizierter Klone trägt die Fremd-DNA zusätzlich zum Gen von Interesse auch ein Antibiotika-Resistenzgen als Selektionsmarker.

Lipofectamine ist ein Liposomenreagenz aus polykationischen Lipiden, die nach Ultraschallbehandlung in wässriger Lösung positiv geladene Liposomen bilden, welche dann die DNA nahezu 100 %ig aus der Lösung aufnehmen. Der nach außen positiv geladene Liposomen/DNA-Komplex fusioniert nach Adsorption an die Zelloberfläche mit der Plasmamembran, wodurch die DNA direkt ins Zytoplasma gelangt.

Dazu werden am Vortag der Transfektion  $1 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu$ l Medium in eine 24 Lochplatte ausgesät und kultiviert. Ein Gemisch aus 50  $\mu$ l Opti-MEM-Medium und 0,8  $\mu$ g DNA wird mit einer Mischung aus 50  $\mu$ l Opti-MEM und 2  $\mu$ l Lipofektamin vereint, welche zunächst 5 min bei RT ruhen gelassen wurde. Nach weiteren 20 Minuten, in denen sich die Komplexe bilden können, werden diese zu den Zellen gegeben und 48

h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser 48 h kann das Medium durch Vollmedium ersetzt werden und die Selektion der Transfektanden beginnen. Zur Anzucht von Einzelkolonien wird die Zellsuspension nach der Transfektion in ein größeres Zellkulturgefäß überführt, welches ein isoliertes Wachstum von Klonen und deren Separierung ermöglicht. Erst nach der Überführung mehrerer Einzelklone in ein 96 well Format beginnt die Expansion und funktionelle Untersuchung der einzelnen Klone.

#### III.2.3.6.2 Lentivirale Infektion

Lentiviren gehören aufgrund ihrer taxonomischen Charakteristika, wie Struktur, Aufbau und Eigenheiten des Replikationsverhaltens, in die Familie der Retroviren (Coffin, 1992). Die 80-100 nm großen Partikel enthalten ein 8-9 kb großes einzelsträngiges, lineares, unsegmentiertes, in diploider Form vorliegendes RNA-Genom in Plusstrangorientierung, welches nach der Infektion der Zielzelle durch die virale Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben wird. Ein weiteres Merkmal der Familie ist die viruseigene Integrase, die diese doppelsträngige DNA in das Genom der Zielzelle integriert.

Virale Vektoren können verwendet werden, um fremde genetische Informationen in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Da Viren in der Lage sind, eukaryotische Zellen zu infizieren und deren Synthesemaschinerie dazu veranlassen, ihr genetisches Material zu produzieren, eignen sie sich für den Gentransfer. Der Vorteil lentiviraler Partikel gegenüber anderen viralen Vektoren liegt in dem breiten Spektrum infizierbarer Zelltypen, welches schwierig zu infizierende Zellen wie Nervenzellen oder sich nicht teilende Zellen mit einschließt. Dies führt zu einer stabilen Expression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzellen.

Lentiviral basierende Partikel stellen somit eine effektive Methode zur Infektion von Wirtszellen und Integration spezifischer DNA Konstrukte in das Wirtsgenom dar. Das in dieser Arbeit zur Anwendung gebrachte MISSION shRNA System von Sigma-Aldrich besteht aus lentiviralen Transduktionspartikeln, welche eine shRNA gegen die mRNA von L-Plastin enthalten. Die von dieser shRNA exprimierten small interfering RNAs (siRNAs) führen zu einer leistungsstarken Reduktion des entsprechenden Proteins über die Methode der genspezifischen RNA Interferenz in eukaryotischen Zellen.

Die in die lentiviralen Partikel eingeschlossenen Vektoren werden nach Bindung an die Zellmembran ins Zytoplasma eingeschleust. Die hier stattfindende reverse Transkription des RNA-Genoms in DNA ist für den Transport in den Zellkern sowie die Integration ins Genom der Wirtszelle entscheidend. Das Silencing-Konstrukt wird nun konstitutiv exprimiert und in „*short interfering hairpins*“ RNAs (shRNAs) prozessiert, die

für die RNA-Interferenz verantwortlich sind. Diese hemmen durch Bindung an die komplementäre mRNA des Proteins spezifisch dessen Expression.

Um das Risiko der Generierung rekombinanter Viren durch eine autonome Replikation zu verringern, wurden dem Virengenom entscheidende Gene entnommen. Zusätzlich wurden die notwendigen Gene, die die Verpackung der Silencing-Sequenz in ein virales Capsid fördern, auf mehrere Helferplasmide verteilt, die keine signifikanten homologen Regionen enthalten. Dies minimiert die Wahrscheinlichkeit homolog rekombinanter Ereignisse, welche ansonsten möglicherweise zur Generierung viraler Capside durch autonome Replikation führen könnten. Zur Selektion sowie stabilen Haltung positiv infizierter Zellen trägt das lentivirale Plasmid zusätzlich ein Puromycinmarker gen.

#### Bestimmung des lentiviralen Virustiters

Zur erfolgreichen Infektion von Zelllinien mit lentiviralen Partikeln ist eine präzise Bestimmung des für jede Zelllinie spezifischen Virustiters eine essentielle Voraussetzung. Die zur Transduktion benötigte Menge an viralen Partikel mit einer entsprechenden „multiplicity of infection“ (MOI) differiert in unterschiedlichen Zelllinien. Der MOI ist die Nummer an transduzierten lentiviralen Partikeln pro Zelle und ist für die Transduktionseffizienz entscheidend. Aus diesem Grund wurden zunächst verschiedene Anzahlen an lentiviralen Partikeln zur Infektion der PC3 Zelllinie eingesetzt und die Infektionseffizienz durchflusszytometrisch getestet.

#### Lentivirale Infektion der Zellen

Zur lentiviralen Infektion von Zellen wurden zunächst  $1,6 \times 10^4$  Zellen in frischem DMEM-Medium in Vertiefungen in einem 96 Plattensystem ausgesät. Nach einer Inkubation von 18-20 h im Brutschrank wurde das Medium entnommen und 120 µl frisches Medium, das Hexadimethrinbromid in einer finalen Konzentration von 8 µg/ml enthält, zugegeben. Am Folgetag wurden 5 µl der Lösung der lentiviralen Partikel in die entsprechenden Vertiefungen zugegeben. Neben den spezifischen lentiviralen Konstrukten wurden zusätzlich lentivirale Positiv- sowie Negativkontrollen transfiziert. Nach einer 24stündigen Inkubation im Brutschrank konnte der Überstand, der die lentiviralen Partikel enthält, abgenommen werden und durch 120 µl Vollmedium ersetzt werden. Erst nach weiteren 24 Stunden wurde das Selektionsantibiotikum Puromycin zugegeben.

#### III.2.3.6.3 Antibiotika-Titration

Die Selektion stabiler Klone, denen erfolgreich Fremd-Nukleinsäure transferiert wurde, erfolgte durch eine Antibiotikazugabe. Vor den entsprechenden Transfektionen mussten aus diesem Grund die letalen Konzentrationen der Antibiotika für jede einzelne Zelllinie bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen auf 96 Lochplatten in einer Zellzahl von  $1,6 \times 10^4$  Zellen verteilt. Nach Adhäsion wurden unterschiedliche Konzentrationen der Selektionsantibiotika hinzugefügt. Das Überleben der Zellen wurde an den folgenden Tagen mit Hilfe eines Lichtmikroskops beurteilt. Die Selektionskonzentration wurde als die Konzentration definiert, bei der nach 3-5 Tagen das Ablösen der Zellen vom Plattenboden und das Absterben der Zellen begonnen hat.

#### III.2.3.6.4 Selektion stabiler Klone

Nach Transfektion der Fremd-Nukleinsäure in die Empfängerzellen wurden die Zellen unter Selektionsbedingungen kultiviert. Für die Selektion war auf den verwendeten Transfektionsvektoren ein Antibiotika-Resistenzgen vorhanden. Dazu wurde die zuvor ermittelte Selektionskonzentration an Antibiotika dem Medium hinzugefügt. So konnte eine Anzucht der Zellen gewährleistet werden, die Fremd-Nukleinsäure erfolgreich aufgenommen und in ihr Genom integriert haben. Die Selektion startete 48 h nach Transfektion. Das antibiotikahaltige Medium wurde alle 48 h erneuert, um tote Zellen zu entfernen, bis resistente Kolonien zu identifizieren waren. Der Erfolg der Transfektion wurde endgültig über Western-Blot Analyse oder FACS Färbung bestätigt.

#### III.2.3.6.5 Isolierung von Einzelkolonien

Um individuelle Klone anzuziehen, war eine Isolierung von Einzelklonen aus der resistenten Mischkultur notwendig. Dazu wurden die selektierten Klone zu dem Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens resistenter Kolonien vereinzelt. Dieser Schritt ist notwendig, um eventuelle individuelle Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Zellen auszuschließen. Hierzu wurde die Mischkultur durch statistisches Verdünnen ausplattiert, wodurch sich eine errechnete Zelldichte von 0,3 Zellen pro Vertiefung in einer 96 Lochplatte ergeben hat. Die Zellen, die zu Klonen angewachsen sind, wurden weiter expandiert und ebenfalls durch Proteinanalysen getestet. Ein weiterer Ansatz ist die Isolierung durch räumlich isoliertes Wachstum wie unter III. 2.3.6.1 beschrieben.

### *III.2.3.7 Vorbereitung der Tumorzellen für die Injektion in die Maus*

Zwei Tage vor der intrakardialen bzw. subkutanen Injektion der Tumorzellen wurde jeweils eine definierte Menge an Zellen ( $3,8 \times 10^6$ ) in eine 175 ml Flasche ausgesät, um final eine zu 70 % konfluente Zelldichte zu erreichen. Die Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt in antibiotikafreiem Medium kultiviert. Am Tag der Injektion wurde der Zellrasen zweimal mit D-PBS gewaschen und die Zellen trypsiniert. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl mit dem CASY wurden die Zellen in D-PBS auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Diese Zellzahl wurde erneut überprüft und die Suspension bis zum Zeitpunkt der Injektion auf Eis gelagert. Für alle Schritte wurde teflonbeschichtete Plastikware verwendet, um eine Adhäsion der Zellen an die Plastikwand zu verhindern.

### *III.2.3.8 Immunfluoreszenzfärbung*

Die Untersuchung der Zellmorphologie erfolgte durch die Behandlung fixierter Zellen mit Phalloidin. Phalloidin ist das Gift des Knollenblätterpilzes und bindet an filamentöses Aktin (Estes et al., 1981). Durch die Kopplung des Giftes mit dem Farbstoff Alexa Fluor 647 ist eine Markierung aller Aktinfasern der Zelle möglich und damit eine genaue Darstellung der Morphologie. Hierfür wurden die Zellen auf ein mit 20 µg/ml Kollagen I beschichtetes Deckglas ausgesät und für 2 h kultiviert. Nach Fixierung der Zellen mit 1,5 % PFA und einer Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,05 % Saponin wurden die Zellen mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aufgequollen und anschließend für 30 min mit dem Farbstoff inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels eines konfokalen Laserscan Mikroskops (Leica Microsystems).

### *III.2.3.9 Indirekter ELISA*

Der „*Enzyme linked immunosorbent assay*“ beruht auf der Immunreaktion zwischen einem Antigen und einem Enzym-gekoppelten Antikörper. Der Nachweis findet in 96 well Platten statt, deren Oberfläche mit einem spezifischen Antikörper gegen das Polypeptid von Interesse beschichtet ist. Die Methode wurde zum Nachweis von spezifischen Polypeptiden im Serum von Mäusen eingesetzt. Bei Zugabe des Serums binden die, wenn im Serum vorhandenen, spezifischen Polypeptide an die Beschichtungsantikörper. Zum Nachweis einer Reaktion wird ein zweiter spezifischer Antikörper gegen ein anderes Epitop des Peptids eingesetzt. Der optische Nachweis einer Bindung erfolgt über einen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper.

Nachgewiesen wurde das Protein L-Plastin im Serum von tumortragenden Mäusen. Die Beschichtung der 96 well half-area Platten erfolgte mit einem human spezifischen monoklonalen L-Plastin Antikörper (500 ng LPL4A.1). Nach der Beschichtung der Platten wurden freie Stellen auf der Plattenoberfläche durch PBS + 1 % BSA abgeblockt. Das zu untersuchende Serum wurde über Nacht auf die Platte gegeben, um eine Bindung von eventuell vorhandenem L-Plastin an die Antikörper zu ermöglichen. Überschüssiges Serum mit nicht spezifischen Polypeptiden wurde gewaschen und die gebundenen Polypeptide über einen zweiten spezifischen Antikörper gegen rekombinantes L-Plastin (recPla662; 1:10.000) markiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte über einen Peroxidase-gekoppelten anti Kaninchen Antikörper (anti-rabbit HRP; 1:5.000). Die Peroxidase reagiert mit dem Substrat OPD (1 mg/ml OPD in  $K_2HPO_4$  mit 1  $\mu$ g/ml  $H_2O_2$ ) in einem Farbumschlag, der bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen wurde. Zur Konzentrationsbestimmung wurde bei jeder Messung eine Standardkurve mit rekombinantem L-Plastin mit den folgenden Proteinkonzentrationen pipettiert: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0 ng/ml Protein. Die Detektion fand am ELISA reader „sunrise“ der Firma Tecan statt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Magellan Software.

### III.2.3.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS („*fluorescence activated cell sorting*“) stellt eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften dar.

Durch einen während der Messung angelegten Überdruck werden die Zellen beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt. Diese hydrodynamische Fokussierung der Zellen ermöglicht die Messung des Vorwärts- und des 90°-Seitwärtsstreulichtes, wodurch die relative Zellgröße bzw. Zellgranularität von Einzelzellen bestimmt werden kann. Granularität und Größe der Zellen korrelieren mit der Lichtintensität, woraus sich die relative Lichtintensität als Einheit der FACS-Analyse ergibt. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit einem FACS Calibur, FACScan oder LSRII der Firma BD durchgeführt.

#### III.2.3.10.1 Oberflächenfärbung

Die Färbung von Oberflächenmolekülen erfolgt nach Ablösen der Zellen aus der Zellkulturflasche durch PBS-EDTA (4 nM EDTA) und Fixieren der Zellen mit 1,5 %igem Paraformaldehyd.  $2 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz wurden dazu mit entsprechenden

Primärantikörperverdünnungen in FACS-Puffer 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift und das Zellpellet wurde, bei indirekten Färbungen, mit in FACS-Puffer verdünntem Sekundärantikörper für 30 min im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Bei Verwendung direkt markierter Antikörper entfiel dieser Schritt. Durch eine weitere Waschung der Zellen wurden überschüssige Antikörper entfernt und die Zellen für die Messung in FACS-Puffer aufgenommen. Die Messungen erfolgten am Gerät FACSCalibur (BD).

#### III.2.3.10.2 Intrazelluläre Färbung

$2 \times 10^5$  Zellen wurden pro Ansatz nach Ablösen aus der Zellkulturflasche in je eine Vertiefung einer 96 well Platte überführt. Zur Fixierung wurden die Zellen für 15 min in 1,5 %igem Paraformaldehyd aufgenommen. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen durch 0,05 % Saponin permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (138 g, 2 min), der Überstand abgesaugt und in 50  $\mu$ l der Primärantikörperverdünnung (FACS-Puffer/0,05 % Saponin) für 45 min aufgenommen. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer/0,05 % Saponin erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper für 30 min unter Schütteln im Dunkeln. Überschüssiger Antikörper wurde durch einen Waschschrift entfernt und das Zellpellet für die Messung in FACS-Puffer resuspendiert.

#### III.2.3.11 Proliferationstest

Der Proliferationstest wurde durch Aussäen von  $1,5 \times 10^4$  Zellen in je vier Vertiefungen einer 24 well Platte durchgeführt. Die Zellen wurden dazu über den Versuchszeitraum von fünf Tagen im Brutschrank inkubiert. Täglich wurden die Zellen einer Vertiefung entnommen und die Zahl mit Hilfe des CASY Systems oder der Neuenheimer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden dazu zunächst mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in 1 ml Medium aufgenommen. Das Medium der übrigen Vertiefungen wurde nach Ermessen erneuert, um eine ständige optimale Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

#### III.2.3.12 In vitro Biolumineszenzbildgebung

Zur Bestimmung der Biolumineszenz der Zellen wurden serielle Verdünnungen der Zellen von  $1 \times 10^3$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen in Vertiefungen einer schwarzen 96 well Platte ausgesät. Den in PBS resuspendierten Zellen wurde 600  $\mu$ g/ml D-Luciferin zugefügt

und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Photonenemission der Zellen im IVIS100 der Firma Caliper Life Science detektiert. Die Auswertung und Quantifizierung der aufgenommenen Signale erfolgte mit der Software Living Image® (Caliper Life Science, Xenogen Corporation).

### III.2.3.13 Viabilitätstest mit Propidiumiodid

Die Bestimmung der Viabilität einer Zellpopulation erfolgte durch die Behandlung mit Propidiumiodid. Dieser Farbstoff kann durch eine poröse Zellmembran in das Zellinnere eindringen und in der DNA der Zellen interkalieren. Lebende Zellen mit einer intakten Zellmembran sind für den Farbstoff nicht zugänglich. Somit können lebende von toten Zellen unterschieden werden (Jacobs and Piphoo, 1983). Die Anreicherung von Propidiumiodid wurde im Durchflusszytometer analysiert.

Die Zellen wurden dazu mit 0,5 µg/ml Propidiumiodid versetzt und nach 5 min im FACSCalibur untersucht. Der Farbstoff hat ein Emissionsmaximum von 590 nm und kann im PE-Kanal detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten mit Ethanol abgetötete Zellen.

### III.2.3.14 Wundheilungsexperiment

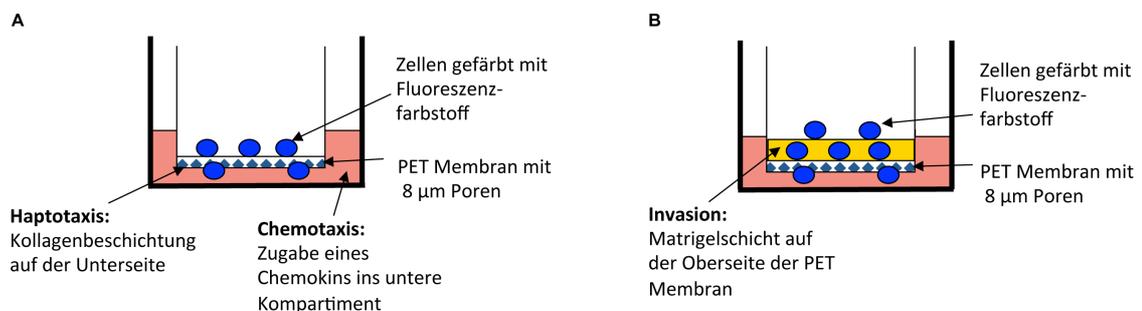
Der „wound healing assay“ oder auch „scratch assay“ stellt eine einfache Methode zur Untersuchung der directionalen Migration von Zellen *in vitro* dar. Dazu wurde eine Wunde in einem Zellmonolayer verursacht und die Fähigkeit der Zellen zur Migration dadurch ermessend, wie lange sie zur Schließung der Wunde benötigen.

Der Zellmonolayer wurde durch das Aussäen von  $5 \times 10^5$  Zellen in 24 well Einsätze kreiert. Nach einer Adhäsionsphase der Zellen erfolgte eine vierstündige Behandlung der Zellen mit 10 µg/ml Mitomycin C zur Hemmung der Proliferation. Mitomycin C ist ein zytotoxisch wirkendes Antibiotikum, isoliert aus *Streptomyces caespitosus*. Durch die Interkalierung zwischen zwei DNA Strängen führt es zu einer kovalenten Bindung des Doppelstrangs und somit zur Verhinderung der zur Replikation sowie Transkription notwendigen Trennung der Doppelstränge. Anschließend wurde dem Zellmonolayer eine Wunde durch Kratzen mit einer 200 µl Pipettenspitze zugeführt und das Mitomycin C durch Mediumwechsel entfernt. Die Wundheilung wurde mittels Time-Lapse-Videomikroskopie über 24 h oder 30 h beobachtet. Die Zellen befanden sich währenddessen unter Kulturbedingungen. Die Auswertung des Wanderverhaltens der Zellen erfolgte mit dem Programm ImageJ.

### III.2.3.15 Transwellexperiment

Der Migrations- bzw. Matrigel Invasions-Assay diente der Untersuchung des migratorischen sowie invasiven Verhaltens verschiedener Zellsubtypen. Dazu kam das Cell Culture Insert System von BD zum Einsatz, wobei die Zellen Poren von einem Durchmesser von 8  $\mu\text{m}$  in einer Polyethylen-Terephthalat (PET) Membran durchwandern müssen. Dabei sitzt ein Filtereinsatz in speziell eingekerbten 24 well Platten und erlaubt das separate Füllen einer unteren und oberen Kammer. Die Zellen wurden auf Transwellfiltern ausgesät und durch Zugabe von Chemoattraktanten unterhalb der Filter zur Migration angeregt. Die Zahl der Zellen im untern Kompartiment wurde zur Kalkulation der migrierten Zellen benutzt.

Zur Ermittlung des Migrationsverhaltens wurde die untere Seite des Filtereinsatzes mit Kollagen beschichtet. Die Beschichtung des Filtereinsatzes erfolgte am Vortag über Nacht bei 4°C mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen in 0,02 N Essigsäure. Die Zellen wurden vor dem Migrations/Invasionstest mit CFDA gefärbt, mit PBS<sup>+</sup> + 4 mM EDTA von der Zellkulturflasche gelöst und auf die entsprechende Zellzahl eingestellt. Den Zellen, die ins obere Kompartiment gefüllt wurden, wurden im unteren Kompartiment entweder ein Medium mit oder ohne speziellem Chemoattraktant angeboten, um das haptotaktische bzw. chemotaktische Verhalten der Zellen studieren zu können. Als Migrationsmedium wurde immer RPMI mit 0,1 % BSA eingesetzt. Ausgesät wurden jeweils 3 x 10<sup>4</sup> Zellen in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  auf der Filteroberfläche. Das untere Kompartiment wurde mit jeweils 400  $\mu\text{l}$  Migrationsmedium bestückt. Als Chemoattraktant für die Zelllinie PC3 diente 350 ng/ml SDF1 $\alpha$ . Zur Untersuchung der Chemotaxis der MV3 Zelllinie wurde dem Medium 10 % FCS hinzugefügt. Nach 18 stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die durch die Poren gewanderten Zellen fixiert, eingedeckt, im Laser Scan Mikroskop (Leica) dokumentiert und vier exemplarische optische Felder ausgezählt.



**Abbildung III-3:** Schematische Abbildung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der (A) haptotaktischen und chemotaktischen Migration und (B) der Invasivität der Zellen mit Hilfe des Transwellsystems.

### III.2.3.16 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse erlaubt einen Vergleich der Genexpression verschiedener Zellen. Die Verwendung von GeneChip Systemen ist dabei eine fortschrittliche und kosteneffektive Methode zur Erstellung von Genexpressionsprofilen. Verwendet wurde das humane GeneChip<sup>®</sup> Gene 1.0 ST V1 Array System der Firma Affymetrix nach Angaben des Herstellers. Dabei ist jeweils ein Gene als „probe set“ definiert, wobei jedes „probe set“ wiederum aus mehreren Sonderpaaren besteht, die chipgebunden vorliegen. Dadurch ist nicht nur eine herkömmliche 3' Genanalyse sondern ein Vollängengenabgleich gewährleistet. Biotinylierte Antisense cRNA wurde nach einem von Affymetrix standardisierten Markierungsprotokoll hergestellt. Dazu wurde aus Zellen präparierte RNA unter Verwendung der T7-(dT)24 Primern und des SuperScript Choice Systems für cDNA Synthese (Life Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) in cDNA umgeschrieben. Die Biotinmarkierung der cRNA erfolgte durch die in vitro Transkription mit dem „BioArray high yield RNA transcript labelling“ Kit (Enzo Diagnostics, Framingdale, NY, USA). Die dabei entstandene cRNA wurde aufgereinigt, fragmentiert und auf U133A Genchips hybridisiert. Die Hybridisierung wurde mit einem GeneChip Hybridisierungsöfen 640 durchgeführt, anschließend erfolgte eine Trocknung im GeneChip Fluidics Station 450 und die Messung mit dem GeneChip Scanner 3000. Die verwendeten Gerätschaften waren von der Firma Affymetrix. Durchgeführt wurden die Messungen vom Zentrum für medizinische Forschung der Universität Heidelberg, Core Einrichtung für Mikroarray-Analytik. Die Custom CDF Version 14 mit Entrez basierten Gendefinitionen wurde verwendet um die Arrays zu annotieren (Sandberg und Larsson 2007). Die Rohfluoreszenzintensitätswerte wurden durch eine Quantilnormalisierung normalisiert. Die differentielle Genexpression wurden per ANOVA Test mit Hilfe der kommerziellen Software SAS JMP7 Genomics, Version 4, von SAS analysiert. Pathways zu verschiedensten Zellfunktionen wurden der öffentlichen Datenbanken (KEGG „*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*“) entnommen. Ein Fisher's Test wurde zur Detektion signifikant regulierter Pathways herangezogen.

## III.2.4 Tierexperimentelle Methoden

### III.2.4.1 *Verwendeter Mausstamm*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse wurden von der Firma Charles River bezogen und in der interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg gehalten. Verwendet wurden immundefiziente, athymische Nacktmäuse des Stamms Balb/c (Balb/c nude). Die Tiere basieren auf einem BALB/cABom-nu und BALB/cAnNCrj-nu Hintergrund und zeichnen sich durch einen fehlenden Thymus sowie die Unfähigkeit der Produktion reifer T Lymphozyten aus und sind somit immundefizient. Zudem weisen sie einen Albino Phänotyp auf, was eine spätere Detektion des Biolumineszenzsignals ermöglicht. Je nach applizierter Tumorzelllinie wurden männliche oder weibliche Tiere verwendet.

### III.2.4.2 *Versuchstierhaltung*

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte nach den Richtlinien des Regierungspräsidiums Karlsruhe in der IBF der Universität Heidelberg in einer spezifisch keimfreien Atmosphäre. Futter sowie Wasser wurden ad libidum angeboten. Die Tiere saßen zu maximal fünf Geschwistertieren in durchsichtigen Polykarbonkäfigen auf Weichholzgranulat. Die Raumtemperatur lag stabil bei 20°C, der Tag-Nachtrhythmus erfolgte automatisch nach MEZ von 7:00 Uhr bis 19:00 Uhr.

### III.2.4.3 *intraperitoneal verabreichte Injektionen*

#### III.2.4.3.1 Anästhesie von Versuchstieren

Die Anästhetika Ketanest/Xylazin wurden intraperitoneal verabreicht. Verwendet wurde ein Gemisch aus Ketanest (120 mg/kg) und Xylazine (16 mg/kg). Injiziert wurden je 100 µl pro 10 g Körpergewicht. Dazu wurden die Tiere von Hand fixiert und anschließend in warmer Umgebung bis zum Eintreten der Narkose beobachtet. Anschließend erfolgte die intrakardiale Injektion der Tumorzellen.

#### III.2.4.3.2 Luciferin Applikation

Vor der Biolumineszenz-Analyse wurden die Tiere mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran betäubt. Dann wurden 150 mg steriles Luciferin pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität mit dem Gerät IVIS 100 erfolgte 5 Minuten nach Applikation.

#### III.2.4.4 *Xenotransplantat-Metastasierungsmodell*

Unter dem Begriff der Transplantation versteht man die Übertragung von zellulärem Material, Zellen, Geweben oder Organen, zwischen Angehörigen derselben Spezies (Allotransplantation) oder zwischen Angehörigen verschiedener Spezies, was unter dem Begriff der Xenotransplantation zusammengefasst wird. Dazu zählt auch der Transfer humaner Zellen in immundefiziente athymische Nacktmäuse. Neben der fehlenden Körperbehaarung weisen diese Tiere auch einen erheblichen Defekt in der Entwicklung von T Lymphozyten auf, was zu einer stark eingeschränkten Immunabwehr führt. Aus diesem Grund können humane transplantierte Tumorzellen in diesen Tieren Tumore ausbilden und zum Teil auch metastasieren (Schumacher and Mitchell, 1997).

In dieser Arbeit wurde ein Xenotransplantatmodell verwendet, bei dem Tumorzellen subkutan oder intrakardial in die Versuchstiere injiziert werden und deren Wachstum sowie deren Metastasierungsverhalten studiert wird.

Zur Bestimmung des Tumorwachstums und der Metastasenbildung wurden Mäuse mit den verschiedenen Tumorzelllinien, denen aus diesem Grund das Reporterkonstrukt Luciferase stabil transfiziert wurde, inokuliert. Über einen Zeitraum von 8 Wochen wurden die Tiere wöchentlich mit Hilfe des IVIS 100 Imaging Systems (Caliper Life Science, Xenogen Corporation) untersucht, um den Verlauf des Tumorwachstums und des Metastasierungsstatus am lebenden Tier festzuhalten.

#### III.2.4.4.1 Intrakardiale Applikation der Tumorzellen

Zur intrakardialen Injektion der Tumorzellen in die Mäuse war es notwendig, die Tiere mittels eines Xylazin (100 mg/ml)/Ketanest (25 mg/ml)-Gemisches zu anästhesieren. Nach Eintritt der Narkose wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen der Zelllinie PC3 bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen der Zelllinie MV3 in einem Volumen von 100  $\mu$ l in den linken Herzventrikel 5 Wochen alter Tiere injiziert. Zur Punktierung des linken kardialen Ventrikels wurde eine 13er Kanüle mit einer 1 ml Spritze verwendet. Der Eintritt von rotem Blut in die Kanülenspitze in einer pulsierenden Frequenz lässt auf eine korrekte Position

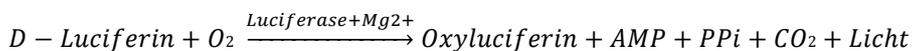
schließen. Nach der Injektion wurden die Tiere für 2-3 Stunden beobachtet um mögliche nachfolgende Komplikationen zu erkennen.

#### III.2.4.4.2 Subkutane Applikation der Tumorzellen

Die subkutane Injektion der Tumorzellen in die Maus erfolgte ohne Betäubung der Tiere mit Hilfestellung eines Tierpflegers zur Fixierung der Tiere. Appliziert wurden je Maus  $1,5 \times 10^5$  PC3 Zellen und  $2,5 \times 10^5$  MV3 Zellen in die linke Flanke der 5 Wochen alten Tiere in einem Volumen von 100  $\mu$ l PBS.

#### III.2.4.4.3 Biolumineszenzbildgebung

Zur Untersuchung der Tiere mittels Biolumineszenzimagining (BLI) wurden diese zunächst durch Isofluran narkotisiert. Dazu wurden die Mäuse über Inhalationsnarkose (1-2 % Isofluran) für einen Zeitraum von insgesamt ca. 10 min betäubt. Fünf Minuten nach intraperitonealer Verabreichung von Luciferin (Konzentration: 15 mg/ml; 100  $\mu$ l/10 g Körpergewicht) wurde die Photonenemission mit Hilfe des Xenogen IVIS 100 über eine Zeitspanne von einer Minute (Binning M) und über eine Zeitspanne von 10 Sekunden (Binning S) bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert. Dabei wurde zunächst die dorsale Seite der Tiere und im Anschluss die ventrale Seite der Tiere aufgenommen. Reihenfolge sowie zeitlicher Ablauf wurden für alle durchgeführten Aufnahmen exakt eingehalten. Die stabil von den Tumorzelllinien exprimierte Luciferase ist dabei in der Lage, in der unten angegebenen ATP-abhängigen Reaktion das Luciferin zu spalten, wobei Energie in Form von Photonen freigesetzt wird. Diese Photonen können detektiert werden und zeigen somit durch Überlagerung mit einer Durchlichtaufnahme der Tiere die Lokalisation der Tumorzellen im Körper an.



ATP/AMP: Adenosintriphosphat/ Adenosinmonophosphat

O<sub>2</sub>: Sauerstoff

CO<sub>2</sub>: Kohlendioxid

PPi: Diphosphat

Diese Untersuchung erfolgte jeweils unmittelbar nach der intrakardialen Tumorzellinjektion zur Kontrolle des Erfolgs der Inokulation sowie wöchentlich (für die Zelllinie PC3) oder zwei mal wöchentlich (für die Zelllinie MV3) zur Ermittlung des Metastasierungsstatus über die gesamte Versuchsdauer. Das dazu verwendete Gerät IVIS 100 Imaging System zählt zu den nicht invasiven bildgebenden Verfahren und bietet die Möglichkeit, sowohl fluoreszente als auch biolumineszente Reporter *in vitro*

und *in vivo* zu erfassen (Calipers).

#### III.2.4.4.4 Tötung der Versuchstiere und Probenentnahme

Die Abtötung der Versuchstiere erfolgte nach den im Tierversuchsantrag definierten Richtlinien (Tierantrag Regierungspräsidium Karlsruhe G168/09).

#### III.2.4.4.5 Messung der Primärtumorgröße

Die Primärtumorgröße wurde ebenfalls wöchentlich mit Hilfe einer digitalen Schieblehre bestimmt. Dazu wurden Länge sowie Breite des Tumors gemessen und das Tumolvolumen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumorgröße} = \text{Länge} \times \text{Breite}^2 \times 0,5$$

### III.2.5 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung aller vorliegenden Versuche wurde das Programm Prism4 verwendet. Zur Evaluierung statistischer Unterschiede wurde mit dem zweiseitigen unabhängigen t-Test für nicht gepaarte normalverteilte Stichproben gerechnet. Zur Analyse der Überlebenskurven der Versuchstiere nach intrakardialer Injektion wurde die Kaplan-Meier Methode angewandt. Die Ermittlung statistischer Unterschiede in der Überlebenszeit erfolgte mit dem zweiseitigen unabhängigen t-Test für nicht gepaarte normalverteilte Stichproben. Alle Fehlerraten sind als Mittelwert mit „*standard error of the mean*“ (Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) angegeben. Eine statistische Signifikanz ist mit  $p < 0,05$  angegeben.

## **IV Ergebnisse**

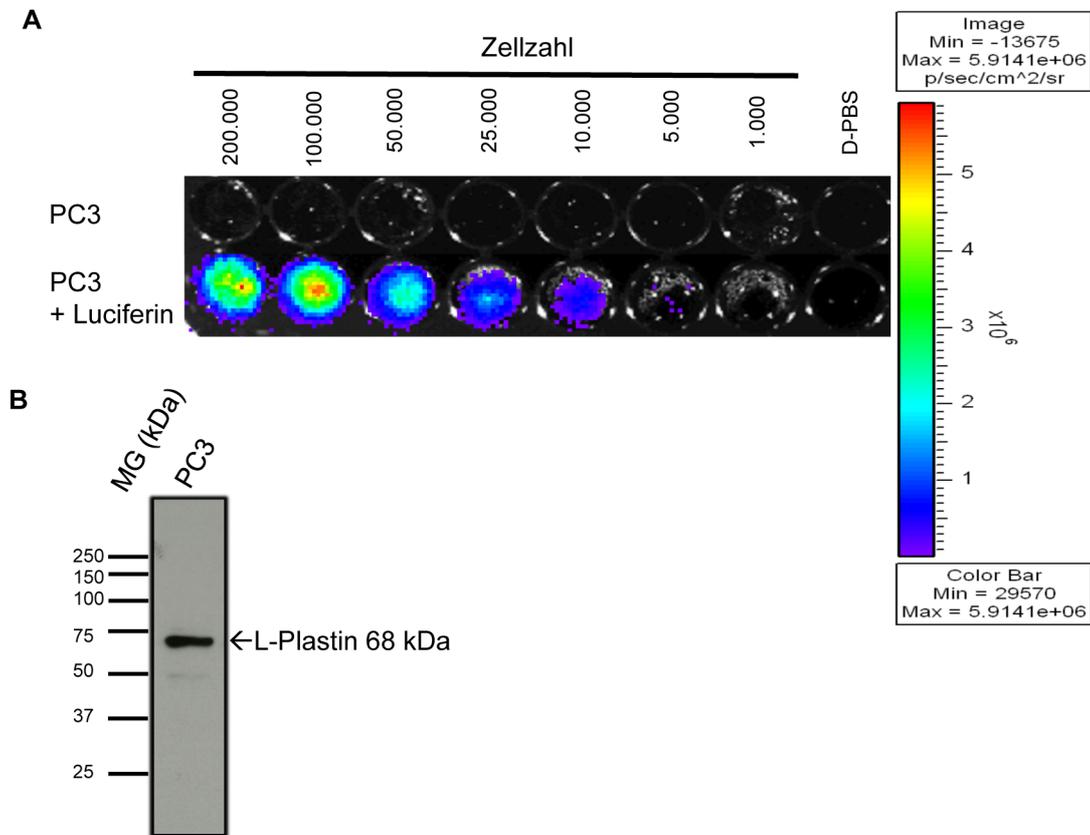
### **IV.1 Die Reduktion der L-Plastin Expression führt zur verminderten Migration und Metastasierung in einem experimentellen Prostatakarzinom-Modell**

#### **IV.1.1 Die humane Prostatakarzinomzelllinie PC3 weist eine Expression von L-Plastin auf**

Die humane Zelllinie PC3 ist eine bekannte und oft verwendete Prostatakarzinomzelllinie, die aus einer Knochenmetastase eines kaukasischen Patienten isoliert wurde. Es ist bekannt, dass nach intrakardialer Injektion der Zellen in immunsupprimierte Mäuse die Zellen überwiegend in die Knochen der Mäuse metastasieren (Chu et al., 2008). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Klon PC-3MproG4-luc (im weiteren Verlauf als PC3 bezeichnet) ist stabil mit dem Luciferasegen transfiziert. Das ist ein entscheidendes Kriterium, um im weiteren Verlauf der Arbeiten eine nicht invasive regelmäßige Kontrolle des Tumorstatus zu gewährleisten. Denn appliziertes Luciferin kann durch Luciferase unter Freisetzung von Photonen gespalten werden. Die Detektion dieser Photonen mittels Biolumineszenzimagining ermöglicht eine Aussage über die Lokalisation der Tumorzellen in der Maus. Zur Kontrolle der Biolumineszenzaktivität der PC3 Zellen wurde diese zu Beginn der Arbeiten dokumentiert ([Abbildung IV-1A](#)). Die Zelllinie PC3 wies nach Zugabe von 600 µg/ml Luciferin eine deutliche Biolumineszenzaktivität auf. In den seriell verdünnten Zellen konnte eine abnehmende Photonendetektion entsprechend der eingesetzten Zellzahl erkannt werden. Es konnte somit auf eine korrekte Luciferaseexpression rückgeschlossen werden. Zellen ohne Luciferin wiesen hingegen keine Photonenemission auf.

Da in dieser Arbeit zunächst der Einfluss der L-Plastin Expression auf die Metastasierung von Tumoren untersucht werden sollte, wurden die Zellen zunächst auf dieses Protein hin untersucht. Zur Feststellung der endogenen Expression von L-Plastin in PC3 wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt ([Abbildung IV-1B](#)). Dabei konnte gezeigt werden, dass L-Plastin von der Zelllinie PC3 exprimiert wurde. Das 68 kDa große Protein wurde mit Hilfe eines L-Plastin spezifischen Antikörpers in Zelllysaten detektiert. Diese Zelllinie eignete sich damit um die Auswirkungen einer L-

Plastin Expression auf die Metastasierung von Tumorzellen zu untersuchen. Das sollte erreicht werden, indem die endogene L-Plastin Expression reduziert wurde.



**Abbildung IV-1: PC3 Zellen exprimieren Luciferase und weisen eine Expression von L-Plastin auf.** (A) Detektion der Photonemission nach Zugabe von Luciferin zu seriell verdünnten PC3 Zellen (200.000-1.000 Zellen/Vertiefung). Detektionsdauer: 5 min. (B) **Western Blot nach SDS-PAGE zum Nachweis der L-Plastin Expression.** 360.000 Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. L-Plastin wurde mit einem L-Plastin spezifischen Antikörper (LPL4A.1) markiert und anschließend mittels eines Sekundärantikörpers detektiert (anti Maus HRP). n=3. MG = Molekulargewicht.

## IV.1.2 Reduktion der L-Plastin Expression in PC3 durch shRNA

### IV.1.2.1 Etablierung einer lentiviralen Infektion von PC3 Zellen zur shRNA vermittelten Reduktion der L-Plastin Expression

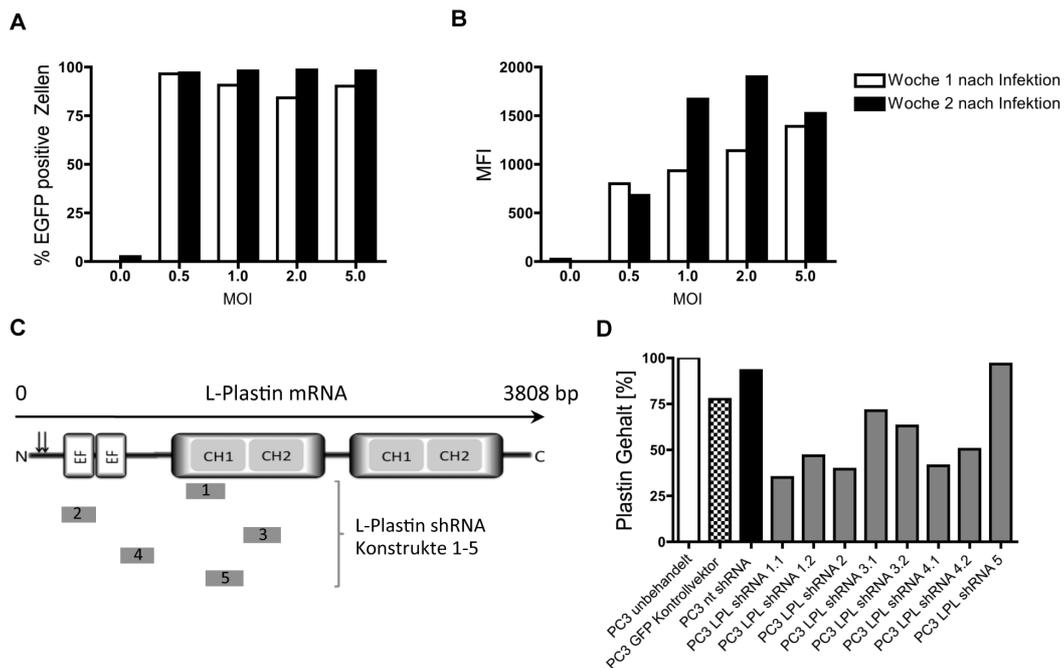
Um die Signifikanz der L-Plastin Expression in PC3 für deren Metastasierung zu analysieren, sollte dessen Expression mit Hilfe lentiviraler Transfektion von shRNA reduziert werden. Da diese Manipulation von PC3 Zellen nicht zu den standardisierten Methoden im Labor gehörte, war eine Etablierung notwendig. Dazu musste zunächst

eine generelle Infizierbarkeit der PC3 Zellen durch lentivirale Partikel sichergestellt werden. In diesem Zusammenhang wurden Testinfektionen mit lentiviralen Partikeln durchgeführt, und dazu ein EGFP Konstrukt in die Zellen transfiziert. Dies erlaubte eine schnelle Analyse der Infektionseffizienz im Durchflusszytometer. Zusätzlich sollte anhand dieser Vorversuche auch die optimale Anzahl der zur Infektion eingesetzten lentiviralen Partikeln ermittelt werden.

PC3 Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an lentiviralen Partikeln behandelt und für eine Woche kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde dann für eine durchflusszytometrische Analyse entnommen (Abbildung IV-2A). Untersucht wurde der Anteil an EGFP exprimierenden Zellen. In allen Ansätzen war der Großteil der Zellen EGFP positiv (zwischen 84 und 96 %). Die übrigen Zellen wurden eine weitere Woche in Kultur gehalten und anschließend ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht. Der Gehalt an EGFP positiven, und somit erfolgreich infizierten Zellen, lag nach zwei Wochen bei ca. 98 % in allen Ansätzen (Abbildung IV-2A). Dabei stieg die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen ab einer *multiplicity of infection* (MOI) >1 deutlich an (von 680 auf 1672) (Abbildung IV-2B). Für die weiteren Versuche wurde daher diese Anzahl an lentiviralen Partikeln pro Infektionsansatz verwendet.

Nachdem sichergestellt werden konnte, dass die Zelllinie PC3 lentiviral infizierbar ist, galt es eine L-Plastin spezifische shRNA Sequenz zu finden, die zu einer effektiven Reduktion der L-Plastin Expression in den infizierten Zellen führt. Getestet wurden in diesem Zusammenhang fünf verschiedene L-Plastin spezifische shRNA Sequenzen, deren komplementärer Bereich sich in der kodierenden Region des L-Plastin Gens befindet (Abbildung IV-2C). Die Vektorkarte sowie die genauen Sequenzen der verwendeten shRNA Konstrukte sind im Anhang (Abbildung IX-1) aufgeführt.

Die infizierten Zellen wurden *in vitro* vermehrt und über eine Puromycin Resistenz selektioniert. Alle herangewachsenen Klone wurden mittels Western Blot auf ihre Plastin Expression hin untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie eine Positivkontrolle für die erfolgreiche Infektion (PC3 GFP Kontrollvektor) und eine Negativkontrolle mit unspezifischer shRNA (PC3 „*non target*“ (nt) shRNA). Die verschiedenen L-Plastin spezifischen shRNA Konstrukte führten zu einer unterschiedlich starken Reduktion der L-Plastin Expression (Abbildung IV-2D). Die stärksten Effekte erzielte die shRNA1 mit einer Verringerung der Plastin Expression um ca. 70 % für Klon 1 (PC3 Luc LPL shRNA 1.1) und ca. 55 % für Klon 2 (PC3 Luc LPL shRNA 1.2). Dieses shRNA Konstrukt wurde für die weiteren Infektionen verwendet.

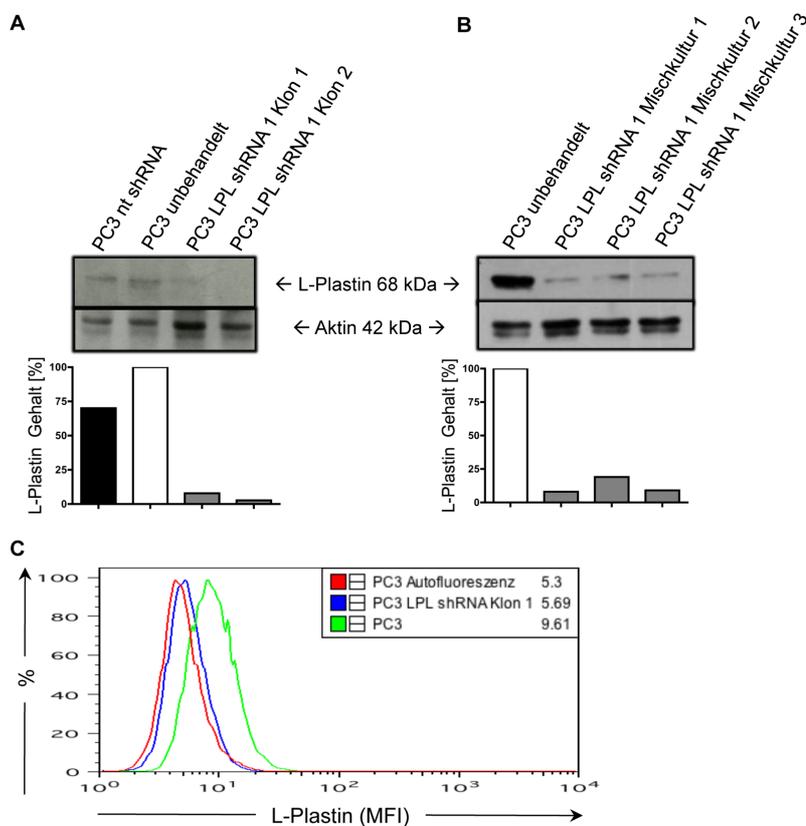


**Abbildung IV-2: Der L-Plastin Gehalt konnte erfolgreich in der PC3 Zelllinie mittels shRNA reduziert werden. (A und B) Austestung der optimalen Konzentration an lentiviralen Partikeln zur Infektion von PC3 Zellen.** Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen zur Infektionseffizienz von PC3 mit dem Kontrollkonstrukt PK pLKO.1-GFP Turbo ein bzw. zwei Wochen nach lentiviraler Infektion. **(A) Prozentsatz der EGFP positiven Zellen und (B) MFI der Zellen.** Für die weiteren Infektionen wurde ein MOI von 1 eingesetzt. **(C) Schematische Darstellung der Binderegionen der verschiedenen LPL shRNA Konstrukte (1-5) innerhalb der L-Plastin mRNA.** **(D) Verschiedene L-Plastin shRNA Konstrukte führen zu Veränderungen des L-Plastin Gehalts in PC3 Zellen.** Graphische Auswertung des L-Plastin Gehalts mit LPL shRNA transfizierten Zellen. PC3 Zellen wurden mit 5 verschiedenen L-Plastin shRNA Konstrukten (LPL shRNA) transfiziert und nach Auswachsung von Einzelklonen diese auf eine verminderte L-Plastin Expression hin untersucht. Je 360.000 Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einer „non target“ shRNA (nt shRNA) transfiziert. L-Plastin wurde mit einem L-Plastin Antiserum (recPla662) markiert und anschließend mittels eines Sekundärantikörpers detektiert (anti Kaninchen HRP). Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte densitometrisch. Die Signalstärke der unbehandelten Probe wurden = 100 % gesetzt.

Zur Etablierung einer PC3 Zelllinie mit stabiler L-Plastin Reduktion wurden erneut Zellen mit Lentiviren, die das L-Plastin spezifische shRNA Konstrukt 1 beinhalten, infiziert, selektiert und Klone herangezogen. Diese wurden erneut mittels Western Blot und FACS Analyse untersucht. Um zu unterstreichen, dass die shRNA spezifisch zu einer verringerten L-Plastin Expression führt wurde für die weiteren L-Plastin Nachweise ein monoklonaler L-Plastin Antikörper verwendet, der im Gegensatz zum polyklonalen recPla662 Antiserum ausschließlich L-Plastin und nicht T-Plastin erkennt (Vgl. [Abbildung IV-1](#)).

Nach Anzucht von Klonen aus den Infektionsansätzen konnten zwei Klone etabliert werden. Der L-Plastin Gehalt von Klon 1 konnte um 92 %, der von Klon 2 um 97 % reduziert werden ([Abbildung IV-3A](#)). Zusätzlich wurden lentiviral behandelte Zellen nicht klonal kultiviert und die L-Plastin Expression in den Mischkulturen mittels Western Blot untersucht ([Abbildung IV-3B](#)). Auch in den Mischkulturen der infizierten Zellen ist eine deutliche Reduktion der L-Plastin Expression zu beobachten. Nach Relativierung

der L-Plastin-Menge der unterschiedlichen Ansätze anhand der Aktin-Expression, konnte eine Reduktion von L-Plastin zwischen 81 % und 92 % in den parallelen Infektionsansätzen im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis wurde durch eine intrazelluläre FACS Analyse der Zellen mit dem Antikörper LPL4A.1 verifiziert (Abbildung IV-3C). Auch hier zeigte sich eine Reduktion der L-Plastin Expression in der Zelllinie, die mit der spezifischen L-Plastin shRNA transfiziert wurde. Im weiteren Verlauf wird der Knock-down Klon als „PC3 LPL shRNA“ bezeichnet. Die Zellen, die mit der unspezifischen „non target“ shRNA behandelt wurden werden als „PC3 nt shRNA“ bezeichnet.



**Abbildung IV-3: Verringerte L-Plastin Expression in PC3 Zellen nach lentiviralem shRNA Transfer. (A und B) Nachweis einer verringerten L-Plastin Expression mittels Western Blot und dazugehöriger densitometrischer Bestimmung des L-Plastin Gehalts. (A)** Das L-Plastin shRNA Konstrukt 1 wurde mittels lentiviraler Infektion in die Zelllinie PC3 transfiziert. Nach Einzelklonselektion wurden die Klone 1 und 2 auf eine verminderte L-Plastin Expression hin untersucht. **(B)** Das L-Plastin shRNA Konstrukt 1 (LPL shRNA 1) wurde mittels lentiviraler Infektion in die Zelllinie PC3 transfiziert. Nach Selektion der infizierten Zellen wurden die nichtklonalen parallelen Infektionsansätze auf eine verminderte L-Plastin Expression hin untersucht. Je 360.000 Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. L-Plastin wurde mit einem L-Plastin spezifischen Antikörper (LPL4A.1) markiert und anschließend mittels eines Sekundärantikörpers detektiert (anti Maus HRP). **(C) Intrazelluläre L-Plastin Färbung in der Zelllinie PC3.** Durchflusszytometrische Analyse der Ausgangszelllinie PC3 und PC3 LPL shRNA. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde L-Plastin mit einem L-Plastin spezifischen Antikörper (LPL4A.1) markiert und anschließend mit einem PE konjugiertem anti Maus Sekundärantikörper (anti Maus PE) detektiert. Gezeigt ist die Überlagerung der Histogramme von PC3 Autofluoreszenz (rot), PC3 (grün) und PC3 LPL shRNA (blau), angegeben ist der MFI.

### IV.1.3 Charakterisierung der lentiviral infizierten Zellen

#### *IV.1.3.1 Lentivirale Infektion und Reduktion der L-Plastin Expression haben keinen Einfluss auf die Luciferaseexpression, Morphologie, Proliferation und E-Cadherin Expression von PC3 Zellen*

Im weiteren Verlauf der Arbeiten sollten die Tumorzellen zur Analyse ihrer metastatischen Eigenschaften in einem Maus Xenograft-Model untersucht werden. Der Metastasierungsstatus der Tiere wurde im Folgenden über die Biolumineszenzaktivität der Zellen bestimmt. Um eine spätere Tumorlast der Tiere zwischen den verwendeten Zellen vergleichen zu können, musste zunächst sichergestellt sein, dass die Biolumineszenzaktivität der Klone nicht wesentlich differierte. Nach Etablierung der PC3 LPL shRNA Zelllinie wurde deren Biolumineszenzstatus dokumentiert (Abbildung IV-4A). Dazu wurden seriell verdünnte Zellen mit Luciferin versetzt und die Photonenemission bestimmt. Die transduzierten Kolonien zeigten im Vergleich mit der Ausgangslinie keinen Unterschied bezüglich ihrer Luciferase Aktivität. Aus den Ergebnissen der Biolumineszenzmessung ging hervor, dass alle Zelllinien ab einer Anzahl von 5000 Zellen pro Vertiefung zu einem detektierbaren Signal führten (Abbildung IV-4A). Dies stellte die Erkennung und Detektion der Tumorherde mit vergleichbarer Mindestgröße sicher. Die Stärke des BLI Signals in der Zelllinie PC3 war bei einer Anzahl von 200.000 Zellen geringfügig stärker als bei den shRNA transfizierten PC3 Zellen.

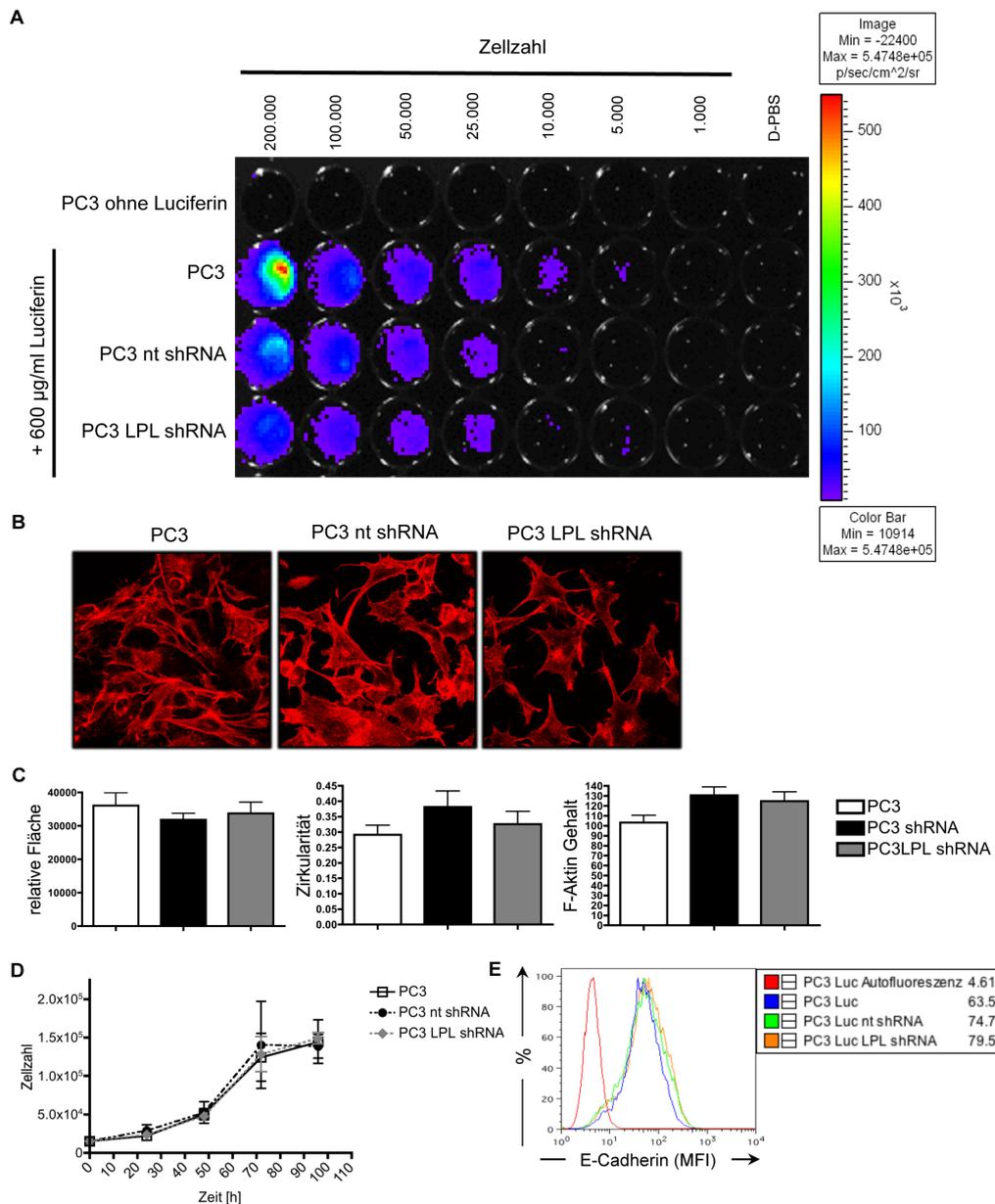
Die Methode der lentiviral vermittelten Transfektion von Zellen ist eine effektive Methode zur Einschleusung fremder Nukleinsäure. Jedoch kann die Infektion mit Lentiviren auch andere Einflüsse, sogenannte „*off target*“ Effekte, und die Induktion einer antiviralen Zellantwort auf die Zellen haben (Jackson et al., 2003; Sledz et al., 2003). Aus diesem Grund wurde der Phänotyp der Zellen vor und nach der Infektion verglichen. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Betrachtung von Merkmalen, die für den untersuchten Prozess der Metastasierung der Zellen relevant sein könnten.

Daher wurden in den nächsten Experimenten mögliche Effekte der lentiviralen Infektion sowie des L-Plastin Knock-downs auf die Morphologie und den F-Aktin Gehalt der Zellen geprüft (Abbildung IV-4B und C). Dazu wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät, für zwei Stunden kultiviert und anschließend mit PFA fixiert. F-Aktin wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin markiert. Morphologische Kriterien waren die Größe der Zellen sowie deren Zirkularität. Letzterer Wert gibt Aufschluss darüber, ob die Zellen eher runde Gestalt oder eine längliche Form aufweisen. Ein Wert von 1 bedeutet in diesem Zusammenhang ein gleiches Verhältnis von Länge zu Breite

(Kreis). Zur Auswertung herangezogen wurden nur frei liegende einzelne Zellen, deren gesamter Zellkörper gut erkennbar war. Sie nahmen bei Adhärenz auf Kollagen eine dendritische Gestalt mit vielen Podosomen an. Man konnte die deutliche Ausbildung von Stressfasern an den Zellrändern und dünneren Aktgeflechten im Inneren der Zelle erkennen. Die Zelllinien zeigten untereinander keinen signifikanten Unterschied in der Größe und Zirkularität (Abbildung IV-4B und C). Es war zudem kein Unterschied im F-Aktin Gehalt zwischen den Kontrollzellen und den L-Plastin Knock-down Zellen zu erkennen.

Um mögliche später zu beobachtende Unterschiede in der Größe der Tumoren erklären zu können, wurde als weiteres Kriterium die Proliferation der lentiviral infizierten Zellen untersucht. Die Teilungsrate der Zellen wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden beobachtet. Dabei wurde die Zellzahl alle 24 Stunden (CASY) ermittelt (Abbildung IV-4D). Alle Zellen wiesen eine identische Proliferationsgeschwindigkeit auf. Somit hatte weder die lentivirale Infektion noch eine L-Plastin Reduktion Einfluss auf das spontane Proliferationsverhalten *in vitro*.

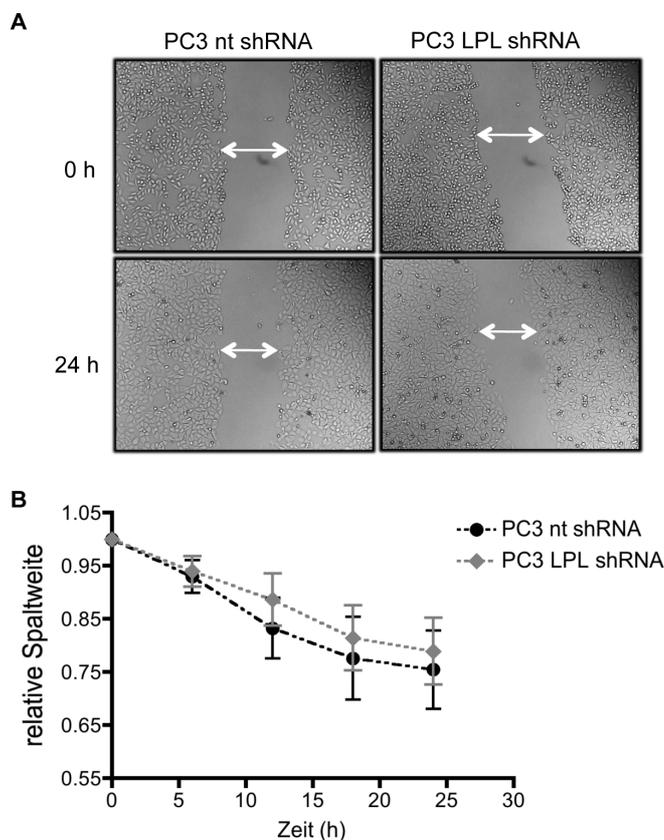
Während der Metastasierung wandern Tumorzellen durch den Körper und kommen dabei mit unterschiedlichen Zellarten und Substanzen in Kontakt. Zur Migration ist ein ständiges Anheften und Lösen der Zellen an das vorliegende Substrat notwendig. Dies geschieht mittels Integrinen und anderen Adhäsionsmolekülen, die die Zell-Zell Kontakte und Interaktionen der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix regulieren. Verlust und Dysregulation von Adhäsionsmolekülen führen zu einem Aufbruch der Gewebestruktur und fördern die Lösung von Zellen aus ihrem Verbund. Entscheidende Rollen kommen dabei dem, vor allem auf Epithelien exprimierten, Adhäsionsmolekül E-Cadherin zu (Behrens et al., 1991; Handschuh et al., 1999). Einer Studie zufolge soll sich der L-Plastin Gehalt in Darmkrebszelllinien auf die E-Cadherin Expression auswirken (Foran et al., 2006). Dieser Befund konnte hier jedoch in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 nicht bestätigt werden (Abbildung IV-4E). Der E-Cadherin Gehalt der Zellen änderte sich nicht in Abhängigkeit der L-Plastin Expression.



**Abbildung IV-4: Lentivirale Infektion sowie L-Plastin Reduktion zeigten keinen Einfluss auf die Luciferase Expression, die Morphologie, die Proliferation sowie die E-Cadherin Expression der PC3 Zellen. (A) Luciferase Expression der PC3 Zellen blieb nach lentiviraler Infektion unverändert.** Nachweis einer Luciferase-Expression von PC3 Klonen mittels BLI. Detektion der Photonenemission nach Zugabe von Luciferin in seriell verdünnten Zellen (200.000-1.000 Zellen/Vertiefung). Detektionsdauer: 5 min. Verglichen wurde die Ausgangszelllinie PC3 mit den lentiviral infizierten Klonen PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA. **(B und C) Lentivirale Infektion und L-Plastin Knock-down hatten keinen Einfluss auf die Morphologie der PC3 Klone.** 150.000 Zellen (PC3, PC3 nt shRNA, PC3 LPL shRNA) wurden auf ein Kollagen (20 µg/ml) beschichtetes Deckgläschen ausgesät und mit Phalloidin AlexaFluor674 angefärbt. **(B)** Konfokal mikroskopische Aufnahmen der Zellen. **(C)** Graphische Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen in Hinsicht auf die Fläche der Zellen, den F-Aktin Gehalt und die Zirkularität der Zellen, wobei der Wert 1 eine kreisrunde Zelle beschreibt. Ausgewertet wurden mind. 20 Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen, angegeben sind die Mittelwerte mit dem SEM. **(D) Lentivirale Infektion und L-Plastin Knock-down hatten keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der PC3 Klone.** 15.000 Zellen pro Vertiefung (PC3, PC3 nt shRNA, PC3 LPL shRNA) wurden in 24 Lochplatten ausgesät und täglich die Zellzahl (CASY) bestimmt. Abgebildet sind die Mittelwerte fünf unabhängiger Versuche und der jeweilige SEM. **(E) L-Plastin Reduktion in der Zelllinie PC3 führte zu keiner Veränderung der E-Cadherin Expression auf der Zelloberfläche.** Durchflusszytometrische Analyse von PC3, PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA. Die Zellen wurden mit einem PE-konjugierten anti-E-Cadherin Antikörper inkubiert. Gezeigt ist die Überlagerung der Histogramme von PC3 Autofluoreszenz, PC3, PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA mit dem MFI.

#### IV.1.3.2 Die Reduktion der L-Plastin Expression hat keinen Effekt auf die zweidimensionale Migration der Zellen im Wundheilungstest

Ein weiterer biologischer Prozess mit Relevanz im Hinblick auf die metastasierende Eigenschaft von Tumorzellen ist die Migration auf zweidimensionalen Substraten. Um dies *in vitro* zu untersuchen wurde ein Wundheilungstest durchgeführt, bei dem beobachtet wurde, wie schnell ein Zellrasen in der Lage ist, eine mechanisch durch Kratzen zugeführte Wunde zu schließen. In diesem experimentellen Ansatz wirkte sich die Reduktion von L-Plastin nicht auf die Fähigkeit der Zellen zu migrieren aus. Nach Durchtrennung des geschlossenen Zellrasens bewegten sich die mit einer nt shRNA transfizierten Zellen im gleichen Tempo zur Spaltmitte hin wie die Zellen mit einer verringerten L-Plastin Expression. Nach 24 Stunden verringerte sich die Spaltbreite prozentual gleich (Abbildung IV-5). Um auszuschließen, dass es sich bei den Zellbewegungen um eine spontane Ausbreitung der Zellfläche durch Zellteilung handelte, wurden die Zellen zuvor mit Mitomycin C behandelt, welches die Proliferation hemmt.



**Abbildung IV-5: L-Plastin Reduktion hatte keinen Einfluss auf die zweidimensionale Migration der PC3 Klone PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA. (A) Exemplarische Aufnahmen zum Zeitpunkt 0 h und 24 h. Die Detektion des Wanderverhaltens zum Schließen des vorhandenen Spaltes im Zellrasen wurde über 24 h mittels Videomikroskopie beobachtet. (B) Graphische Auswertung der relativen Spaltweite. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die Größe der Ausgangswunde wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Die Punkte zeigen die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten und den jeweiligen SEM.**

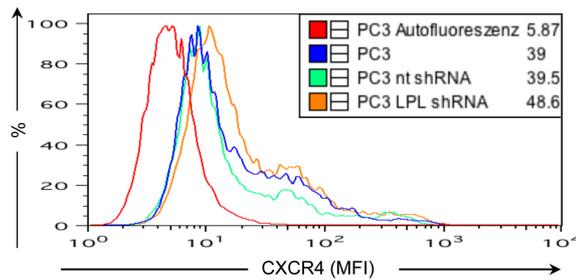
#### **IV.1.4 L-Plastin Reduktion führt zu einer verminderten Migration *in vitro***

##### *IV.1.4.1 L-Plastin Reduktion verringert die Chemokin-vermittelte haptotaktische Migration*

Bei der Bewegung von Zellen unterscheidet man zwischen einer spontanen und einer zielgerichteten Migration. Folgt die gerichtete Bewegung dabei einem Konzentrationsgefälle eines substratgebundenen Signalstoffes, spricht man von Haptotaxis. Ist ein löslich vorliegender Lockstoff (Chemokin) für das vorliegende Konzentrationsgefälle verantwortlich, bezeichnet man diese Migrationsform als Chemotaxis. In der metastatischen Kaskade sind die Prozesse der Migration und Invasion entscheidende Schritte. Diese Prozesse ermöglichen der Tumorzelle bei ihrer Metastasierung eine gerichtete Bewegung und Wanderung durch den Organismus. Dabei sind die Zielorgane der Metastasierung meist nicht willkürlich und zufällig, sondern in der Regel für jeden Tumortyp spezifisch definiert. Entscheidend dafür sind neben den gewebespezifischen Faktoren der lokalen Wirtszellen auch lösliche Faktoren wie Chemokine, oder andere chemotaktische Proteine oder haptotaktische Signale (Nicolson, 1993). Für Prostatakarzinomzellen wurde die Interaktion zwischen SDF1 $\alpha$  und seinem Chemokinrezeptor CXCR4 als entscheidend für die Metastasierung beschrieben und wurde daher im Folgenden als Stimulus verwendet (Arya et al., 2004).

##### IV.1.4.1.1 Nachweis einer CXCR4 Expression der Zelllinie PC3

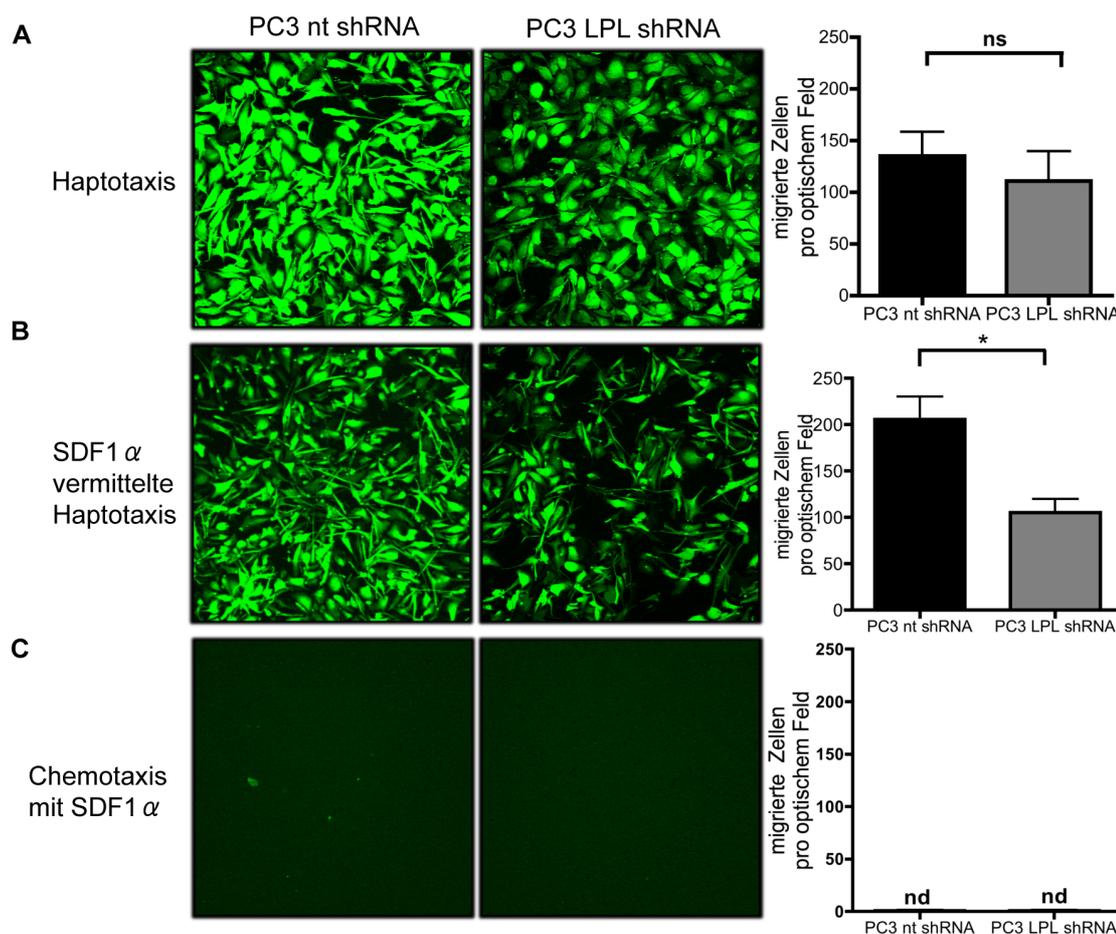
Bevor SDF1 $\alpha$  als Chemokin für PC3 Zellen eingesetzt werden konnte, musste die Expression des Rezeptors CXCR4 auf der Oberfläche der Prostatakarzinomzellen geprüft werden. PC3 Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR4 (Abbildung IV-6). Jedoch wies nur ein geringer Teil der Population eine hohe CXCR4 Expression auf. Ein Großteil der Zellen exprimierte CXCR4 in einer niedrigeren Molekülzahl auf ihrer Oberfläche. Der hier zu erkennende äußerst geringfügige erhöhte CXCR4 Nachweis der PC3 LPL shRNA Zellen erwies sich nicht als statistisch signifikant.



**Abbildung IV-6: PC3 Zellen exprimieren CXCR4 auf ihrer Oberfläche.** Durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA. Die Zellen wurden fixiert, mit einem PECy5-konjugierten anti-CXCR4 Antikörper inkubiert und am FACSCalibur gemessen. Gezeigt ist die Überlagerung der CXCR4 Histogramme von PC3 Autofluoreszenz, PC3, PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA (MFI).

#### IV.1.4.1.2 L-Plastin Reduktion vermindert die SDF1 $\alpha$ -vermittelte haptotaktische Migration, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die reine haptotaktische Migration

Die haptotaktischen und chemotaktischen migratorischen Fähigkeiten der PC3 Zellen wurden mittels Transwellassays getestet (Abbildung IV-7). Dieses experimentelle System im 24 well Maßstab trennt durch eine poröse Membran zwei separate Zellkultur-Kompartimente voneinander ab und ermöglicht eine separate Füllung der Kompartimente. So können Zellen sowie taktische Reize zum Startzeitpunkt des Versuchs lokal begrenzt werden. Die einseitige Beschichtung der Membran (haptotaktischer Reiz), wie auch die begrenzte Zugabe eines Chemokins in nur ein Kompartiment (chemotaktischer Reiz), rekonstruieren somit die haptotaktische oder chemotaktische Anlockung von Tumorzellen während der Metastasierung. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene haptotaktische Versuchsansätze gewählt. Diese unterschieden sich durch die zusätzliche Zugabe von SDF1 $\alpha$  in der sogenannten Chemokin-vermittelten Haptotaxis. Als haptotaktischer Stimulus diente jeweils eine Kollagenbeschichtung der Membranunterseite. Im Vergleich hierzu fehlte bei der Untersuchung der chemotaktischen Migration die Kollagenbeschichtung. Bei SDF1 $\alpha$  vermittelter Haptotaxis wurden beide Stimuli angeboten. Die L-Plastin Reduktion (PC3 LPL shRNA) führte bei PC3 Zellen nur zu einer geringen, aber nicht signifikanten, Veränderung in der haptotaktischen Migration (Abbildung IV-7A) verglichen mit der Anzahl transmigrierter PC3 nt shRNA Zellen. Bot man den Zellen zusätzlich zum haptotaktischen Stimulus auch SDF1 $\alpha$  als Chemokin an, verringerte sich die Anzahl an transmigrierenden Zellen jedoch signifikant (Abbildung IV-7B). SDF1 $\alpha$  alleine hingegen reichte bei beiden PC3 Zellen nicht als Anreiz aus, um eine Migration im verwendeten System zu induzieren (Abbildung IV-7C). Auch weitere in der Literatur diskutierte Stimuli wie NIH3T3 konditioniertes Medium, BSA oder FCS (Hua et al., 2009; Teng et al., 2010; Xu et al., 2009) bewirkten hier keine Migration (Daten nicht gezeigt). Fehlt somit ein haptotaktischer Reiz, sprachen die Zellen auch nicht auf ein Chemokinsignal an.



**Abbildung IV-7: L-Plastin Knock-down führte bei PC3 Zellen zu keiner signifikanten Reduktion der haptotaktischen Migration, aber zu einer reduzierten Chemokin-vermittelten haptotaktischen Migration.** Transwellassay zur Untersuchung der (A) haptotaktischen (B) Chemokin-vermittelten haptotaktischen und (C) chemotaktischen Migration der PC3 Klone. (A und B) Nach Beschichtung der Unterseite der Filtereinsätze mit Kollagen wurden jeweils 30.000 CFDA gefärbte Zellen (PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA) in das obere Kompartiment der Transwelleinsätze gegeben und für 18 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Chemoattraktant diente (B und C) im unteren Kompartiment 350 ng/ml SDF1 $\alpha$ . Anschließend wurden die Zellen auf der Unterseite des Filters mit einem konfokalen Laserscannmikroskop dokumentiert. Auf der rechten Seite sind die dazugehörigen statistischen Auswertungen gezeigt. Ausgezählt wurden jeweils 4 optische Felder, angegeben sind die Mittelwerte der transmigrierten Zellen aus drei unabhängigen Versuchen und der SEM (\*=p<0,05, nd = nicht detektierbar).

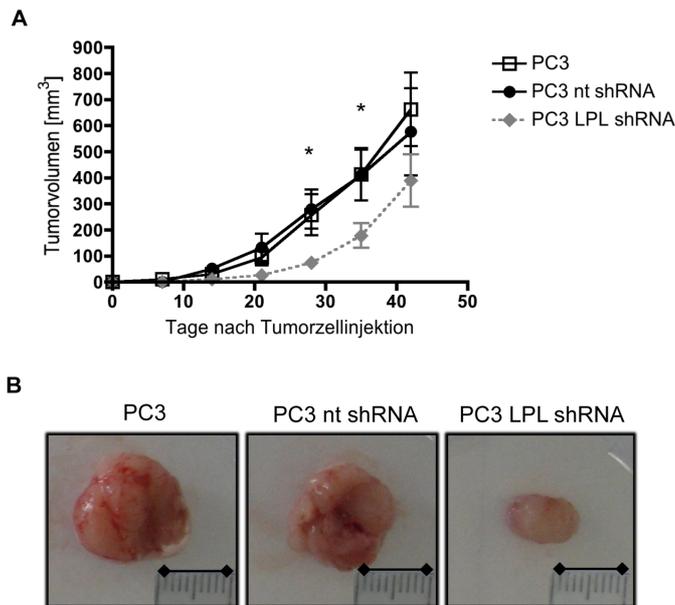
Um die Relevanz von L-Plastin für die Metastasierung der Zellen auch *in vivo* zu beweisen, wurde in einem nächsten Schritt das System in ein murines Xenograft-Model transferiert.

## **IV.1.5 L-Plastin Reduktion wirkt sich negativ auf die Etablierung und das Wachstum von Prostatatumoren und Metastasen *in vivo* aus**

### *IV.1.5.1 L-Plastin Reduktion beeinträchtigt die Etablierung und das Wachstum eines subkutan induzierten Prostatatumors*

Da L-Plastin *in vitro* einen Effekt auf die transmigratorischen Eigenschaften der Tumorzellen aufwies, wurde in einem nächsten Schritt die Rolle von L-Plastin auf das Tumorzellwachstum und die Metastasierung *in vivo* untersucht. Zunächst wurde dabei die Fähigkeit der PC3 Zellen zur Etablierung eines Primärtumors nach subkutaner Injektion der Tumorzellen in immunsupprimierte Mäuse analysiert. Verwendung fand dabei ein Xenograft-Modell, in dem PC3 Zellen männlichen immunsupprimierten Balb/c nude Mäusen injiziert wurden. Diese athymischen Mäuse können keine reifen T Zellen generieren und stoßen artfremde Zellen dadurch nicht ab. Zudem können die Tumorzellen im Körperinneren durch das Fehlen des Körperfells besser mittels Biolumineszenz detektiert werden. Zur Analyse des Primärtumorwachstums wurden PC3 Zellen subkutan in den linken Oberschenkel der Tiere injiziert. Das Tumorzellwachstum wurde wöchentlich dokumentiert und die Tumorzellgröße mit Hilfe einer Schieblehre bestimmt. Wie zu erwarten unterschied sich das Volumen des Primärtumors zwischen der Ausgangszelllinie PC3 den PC3 nt shRNA Zellen nicht. Eine Reduktion von L-Plastin führte dagegen zu einem deutlich kleineren Primärtumor. Durch einen L-Plastin Knock-down konnte die Größe des Tumors um etwa 50 % reduziert werden. Dies galt sowohl für das Tumorzellvolumen ([Abbildung IV-8A](#)) als auch für den Durchmesser der Geschwülste ([Abbildung IV-8B](#)). An Tag 27 und 36 nach Tumorzellinjektion war eine statistisch signifikante Reduktion feststellbar.

Nach subkutaner Verabreichung der PC3 Zellen konnte keine Streuung der Tumorzellen nachgewiesen werden. Dies wurde bis zur Tötung der Mäuse über Biolumineszenzbildgebung kontrolliert. Alle Tiere erreichten vor einem möglichen Auftreten von Metastasen eine Primärtumorzellgröße, zu der nach Vorgaben der Tierschutzkommission der Versuch beendet werden musste. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein weiteres Xenograft-Modell verwendet, das nach intrakardialer Injektion der PC3 Zellen die Untersuchung der Metastasierung ermöglichte.



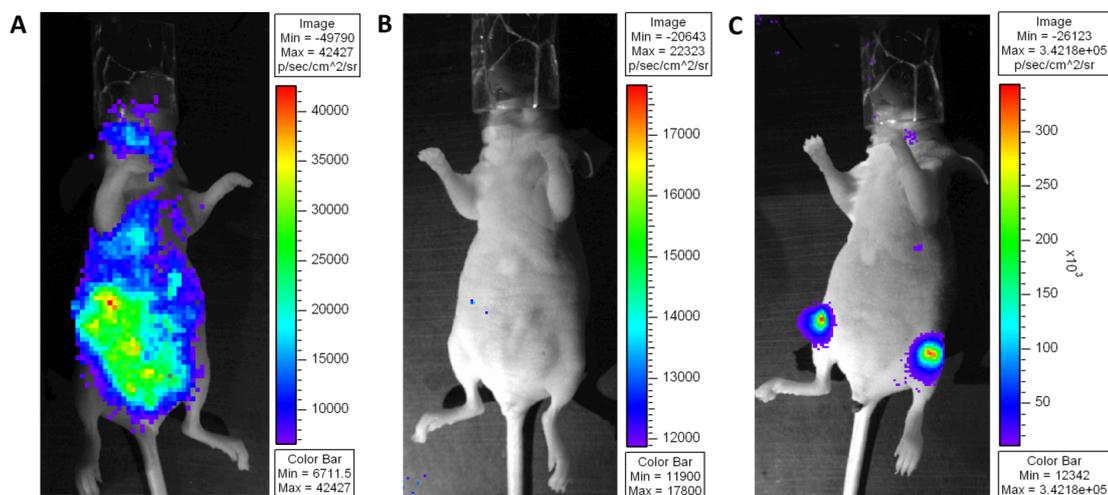
**Abbildung IV-8: L-Plastin Knock-down in PC3 Zellen führte zu einem reduzierten subkutanen Tumorwachstum.**  $1,5 \times 10^5$  Tumorzellen (PC3, PC3 nt shRNA, PC3 LPL shRNA) in 100  $\mu$ l PBS wurden jeweils subkutan in den linken Oberschenkel von 5 Wochen alten männlichen immundefizienten Balb/c Mäusen injiziert. Das Tumorwachstum wurde mittels Schieblehre wöchentlich gemessen. **(A)** Das Tumolvolumen berechnete sich nach der Formel: Länge  $\times$  Breite<sup>2</sup>  $\times$  0,5. Angegeben sind die Mittelwerte und der SEM (\*= $p < 0,05$ ) aus zwei unabhängigen Versuchen mit  $n=10$ . **(B)** Photographien der nach Tötung der Tiere entnommenen Tumoren. Abgebildet ist jeweils ein exemplarischer Tumor pro Versuchsgruppe. Die angegebene Maßeinheit ist 1 cm.

#### IV.1.5.2 L-Plastin Reduktion führt zu einer verminderten Metastasierung nach intrakardialer Injektion von Tumorzellen

##### IV.1.5.2.1 Verifizierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass L-Plastin die Ansiedlung von Tumorzellen nach subkutaner Injektion und die Etablierung eines Primärtumors förderte. Dies gab einen ersten Hinweis auf die Beteiligung von L-Plastin an den initialen Schritten des Primärtumorwachstums. Aufgrund des schnellen Tumorwachstums konnte in diesem experimentellen Ansatz jedoch nicht der Einfluss von L-Plastin auf die Tumorzellmetastasierung untersucht werden. Um weitere Schritte innerhalb des komplexen Prozesses der Tumoretablierung und dem Verlauf einer Krebserkrankung zu untersuchen, wurden die Tumorzellen daher im Folgenden intrakardial in Mäuse injiziert. Die intrakardiale Injektion von Tumorzellen in die Maus ist ein experimentell schwieriges Verfahren, dessen erfolgreiche Durchführung kontrolliert werden muss. Hierbei muss eine immer identische Anzahl an Tumorzellen in den linken Herzventrikel der Mäuse injiziert werden, um eine direkte Verteilung der Zellen mit dem Blutstrom im Körper der Maus sicherzustellen. Dies wurde in den frisch injizierten Tieren ca. 60 min nach dem Tumorzelltransfer mittels Biolumineszenz untersucht. Um den weiteren Verlauf der Tumorzellverteilung zu kontrollieren, wurden zudem 24 Stunden sowie alle sieben Tage nach der Tumorzellinjektion Aufnahmen der Tiere angefertigt (Abbildung IV-9). Kurze Zeit nach Injektion der Tumorzellen konnte

eine diffuse Verteilung der Zellen im Körper der Maus festgestellt werden (Abbildung IV-9A). Die luciferaseexprimierenden Tumorzellen befanden sich vor allem im Rumpf des Tieres, in der Lunge sowie im Kopfbereich. Nach 24 Stunden waren fast keine Biolumineszenzsignale mehr sichtbar (Abbildung IV-9B). Nach ca. zwei bis drei Wochen zeigten sich präzise differenzierte Photonenanhäufungen, die jeweils einer metastatischen Läsion entsprachen (hier gezeigter Zeitpunkt: 4 Wochen nach Tumorzellinjektion) (Abbildung IV-9C). Diese befanden sich für die Zelllinie PC3 überwiegend im Skelettsystem der Tiere. Diese Verifizierung erfolgte mit allen in der Arbeit verwendeten Zelllinien.

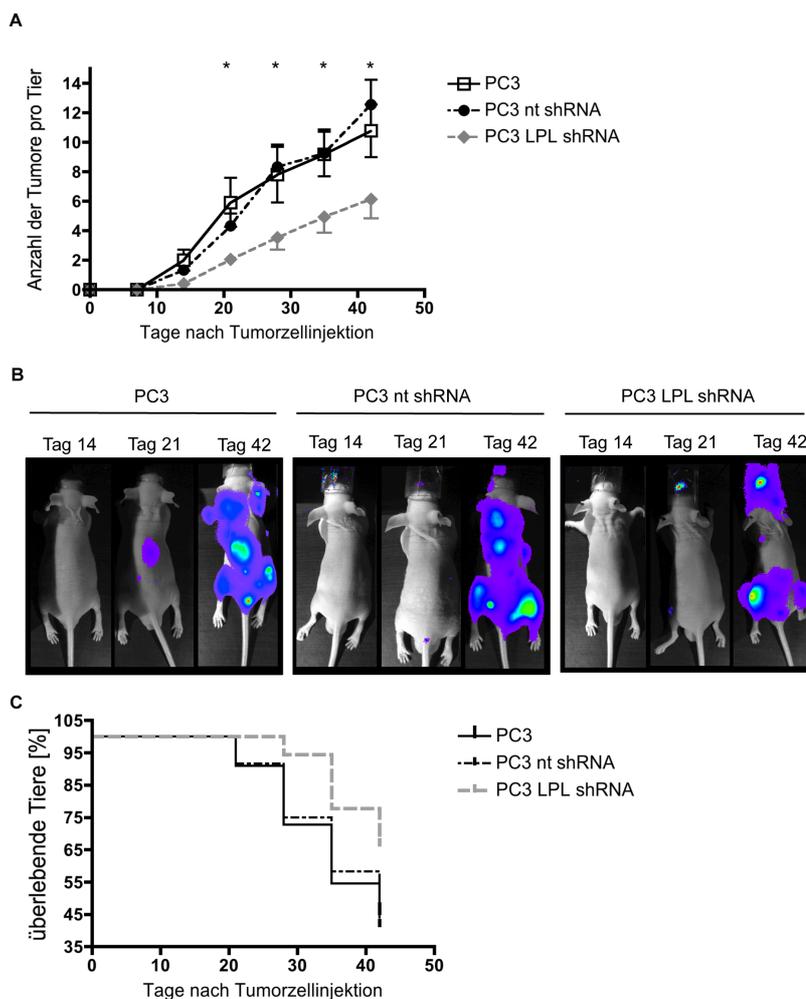


**Abbildung IV-9: Evaluierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion von Tumorzellen mittels Biolumineszenzbildgebung.**  $1,5 \times 10^5$  Luciferase positive Tumorzellen (PC3) wurden in 100  $\mu$ l PBS in den linken Herzventrikel 5 Wochen alter immundefizienter Balb/c Mäuse injiziert. (A) 60 Minuten im Anschluss an die Applikation konnte mittels Biolumineszenzbildgebung nach intraperitonealer Luciferin Injektion eine diffus über den gesamten Körper der Maus verteilte Photonenanhäufung detektiert werden. (B) 24 Stunden nach der Tumorzellapplikation konnte in demselben Tier fast kein Signal mehr detektiert werden. (C) Nach 4 Wochen waren differenzierte einzelne Photonenanhäufungen zu erkennen, die einzelne Tumorherde (Metastasen) darstellen.

#### IV.1.5.2.2 L-Plastin Reduktion in PC3 Zellen reduziert die Metastasierung und verlängert das Überleben der Mäuse nach intrakardialer Tumorzellinjektion

Nach erfolgreicher Evaluierung der intrakardialen Injektion der PC3 Zellen in Mäuse wurden anhand dieser Methodik die metastatischen Fähigkeiten von PC3 Zellen untersucht. Zur erfolgreichen Ausbildung einer Metastase müssen die Tumorzellen die Blutbahn verlassen, entlang verschiedenen Geweben migrieren, in Organe einwandern und sich dort ansiedeln und vermehren. Nach der intrakardialen Applikation der Tumorzellen in Mäuse wurde die Anzahl an entstandenen Tumoren sowie das Überleben der Tiere beobachtet (Abbildung IV-10). Die L-Plastin Reduktion

verminderte in der Tat die Fähigkeit der Tumorzellen Metastasen zu bilden. Dies zeigte sich deutlich in der Anzahl der auswachsenden Tumorherde pro Tier (Abbildung IV-10A und B). Die Metastasierung der Tumorzellen konnte durch einen L-Plastin Knock-down um ca. 50 % reduziert werden ( $p < 0,05$  für PC3 vs. PC3 LPL shRNA und PC3 nt shRNA vs. PC3 LPL shRNA). Während injizierte PC3 Zellen zu durchschnittlich  $10,78 \pm 1,78$  Tumoren pro Tier führten, resultierte eine Injektion von PC3 LPL shRNA Tumorzellen nur in einer durchschnittlichen Anzahl von  $6,143 \pm 1,313$  Tumoren pro Tier. Alle Tiere denen PC3 Zellen oder PC3 nt shRNA Zellen injiziert wurden entwickelten Tumore. Jedoch waren nur bei 73 % der Tiere, die Tumorzellen mit einem L-Plastin Knock-down injiziert bekamen, Metastasen zu detektieren. Entsprechend war auch das Überleben der Tiere verlängert, denen L-Plastin Knock-down Tumorzellen injiziert wurden (Abbildung IV-10C). Die Versuchsgruppen mit nicht behandelten oder nt shRNA behandelten Tumorzellen zeigten erwartungsgemäß untereinander keine Unterschiede bezüglich des Metastasierungsstatus und des Überlebens.



**Abbildung IV-10:** L-Plastin Knock-down in PC3 Zellen führte zu einer verringerten Anzahl an Metastasen in Mäusen nach intrakardialer Injektion der Tumorzellen und verlängerte das Überleben der Tiere.  $1,5 \times 10^5$  Tumorzellen (PC3, PC3 nt shRNA, PC3 LPL shRNA) in  $100 \mu\text{l}$  PBS wurden jeweils in den linken Herzventrikel 5 Wochen alter männlicher immundefizienter Balb/c Mäuse injiziert. Die Anzahl an Metastasen wurde wöchentlich mittels Biolumineszenz detektiert. **(A)** Statistische Auswertung der Anzahl der Tumore pro Tier über einen Zeitraum von 42 Tagen. Angegeben sind die Mittelwerte und der SEM von 3 unabhängigen Versuchen ( $*=p<0,05$ ) **(B)** Biolumineszenzaufnahmen von Beispeltieren an Tag 14, 21 und 42. **(C)** Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer. Mit  $n=12$  für die Gruppen PC3 und PC3 nt shRNA und  $n=17$  für die Gruppe PC3 LPL shRNA.

Zusammenfassend lässt sich zu diesem Zeitpunkt sagen, dass eine Reduktion von L-Plastin in PC3 Zellen zu einer verminderten Migration *in vitro* wie auch zu einer reduzierten Metastasierung und einem geringeren Primärtumorwachstum führte. Diese Arbeit stellt damit die erste systematische Untersuchung der Rolle der L-Plastin Expression in Tumorzellen dar. Obwohl die hier gezeigten Daten eindeutig sind, gibt es in der Literatur Widersprüche über die Korrelation der Expression von L-Plastin mit dem Tumorstadium in Patientenstudien. Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe, in denen die Funktion von L-Plastin in humanen T Zellen charakterisiert wurde, gaben immer mehr Hinweise auf eine entscheidende Rolle der Phosphorylierung von L-Plastin auf die Funktion des Proteins. Dies könnte auch für das Verhalten der Tumorzellen wichtig sein. Dieser Aspekt konnte jedoch mit dem bisher verwendeten experimentellen System nicht weiter untersucht werden. Aus diesem Grund wurde ein weiteres System etabliert, mit dessen Hilfe nun auch der Einfluss des Phosphorylierungsstatus von L-Plastin auf die Metastasierung von L-Plastin exprimierenden Tumorzellen mit analysiert werden konnte. Dazu wurde die humane Melanomzelllinie MV3 verwendet, die kein L-Plastin exprimiert.

## **IV.2 Eine ektope Expression von L-Plastin führt zur verstärkten Metastasierung einer humanen Melanomzelllinie**

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass L-Plastin durch eine Phosphorylierung reguliert wird. Um der Frage, ob und wie eine L-Plastin Phosphorylierung die Metastasierung von Tumorzellen beeinflusst, nachzugehen, wurde ein Testsystem verwendet, wodurch es möglich war eine phosphorylierbare und nicht-phosphorylierbare L-Plastin Variante zu vergleichen. Erste *in vitro* Hinweise auf einen Einfluss des Phosphorylierungsstatus von L-Plastin auf die Invasion von Tumorzellen lieferte eine Arbeit aus unserem Labor von Klemke et al. (Klemke et al., 2007). Diese Daten wurden mit der humanen Melanomzelllinie MV3 mit Hilfe von Transwell-Versuchen erhoben. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer L-Plastin Expression und Phosphorylierung auf die metastasierenden Eigenschaften von MV3 Zellen *in vivo* in einem Maus Xenograft-Modell analysiert. Dabei wurde in einem ersten Schritt auf ein bereits bekanntes orthotopes Modell der subkutanen Applikation der Tumorzellen in die Mäuse zurückgegriffen. Des Weiteren wurde zur Untersuchung der metastatischen Kapazität in Abhängigkeit von L-Plastin die intrakardiale Injektion von MV3 Zellen in Mäuse etabliert und erstmals beschrieben.

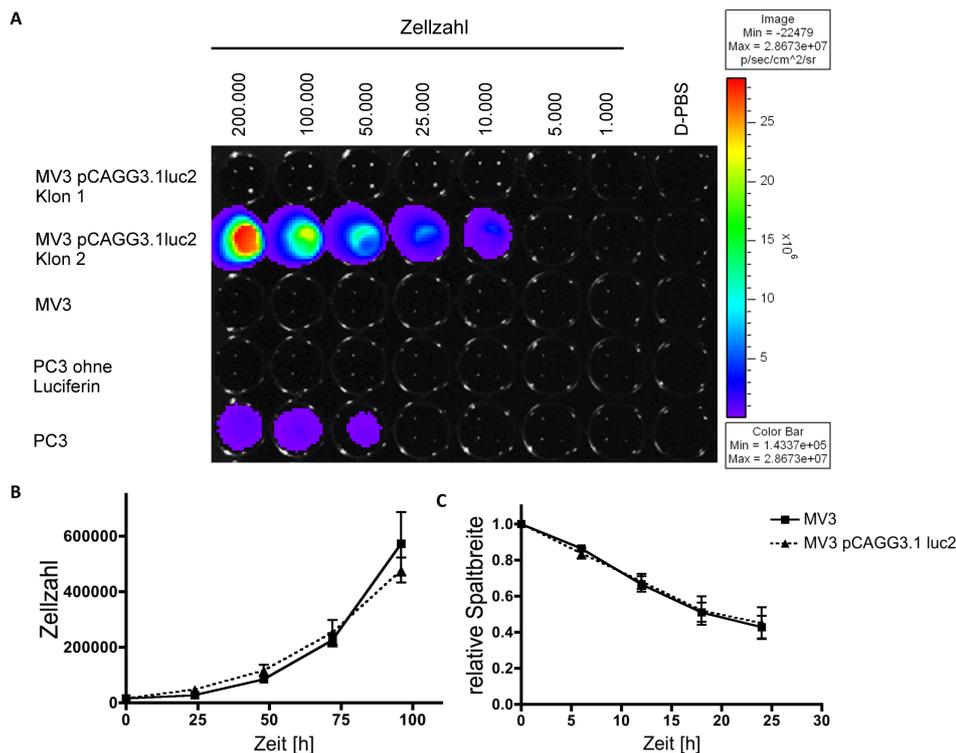
### **IV.2.1 Etablierung von L-Plastin exprimierenden MV3 Zellen**

#### *IV.2.1.1 Generierung von L-Plastin und Luciferase exprimierenden MV3 Zellen*

Die humane Melanomzelllinie MV3 wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines Melanompatienten isoliert. Um das Wachstum und die Metastasierung dieser Tumorzelllinie in dem bereits bekannten intrakardialen Mausmodell nicht-invasiv beobachten zu können, musste diese Zelllinie zunächst mit einem Luciferasegen transfiziert werden. Dazu wurde anfänglich ein Vektorsystem verwendet, bei dem sich die kodierende Region der Luciferase unter Kontrolle eines CMV-Promotors befand. Nach Transfektion der cDNA in MV3 Zellen durch Lipofektion wurden stabile, Luciferase positive, Klone generiert, die im Anschluss auch mit den L-Plastin-cDNAs transfiziert wurden. Bei den folgenden funktionellen *in vitro* sowie *in vivo* Experimenten musste jedoch erkannt werden, dass die Fähigkeit der transfizierten MV3 Zellen zur Luciferase-Expression verloren ging (Daten nicht gezeigt). Dies machte einen weiteren

Einsatz dieser Zellen unmöglich. Glücklicherweise konnte durch die Diskussion mit Kollegen auf einer Fachkonferenz ein Luciferase-Plasmid unter Kontrolle des „*chicken actin*“ Promotors beschafft werden, das eine dauerhafte Expression von Luciferase nach Transfektion in Tumorzellen versprach. Entsprechend wurde das Vektorsystem pCAGG3.1-luc2 in MV3 Zellen transfiziert (Abbildung IX-2). Dieser Vektor war eine freundliche Gabe von Gabri van der Pluijm und Geertje van der Horst, Universität Leiden. Die Transfektion erfolgte über die Lipofektionsmethode. Transfizierte Klone wurden über eine G418-Antibiotikaresistenz klonal selektioniert und die Luciferase-Expression der Klone mittels Biolumineszenzmessung kontrolliert (Abbildung IV-11A). Die Biolumineszenzanalyse zeigte, dass nur Klon 2 eine Luciferase-Expression aufwies. Im Vergleich zur vorher verwendeten PC3 Zelllinie war die Expression deutlich stärker. Stabil Luciferase exprimierende Klone wurden des Weiteren auf ihre proliferierenden und migrierenden Eigenschaften hin untersucht. Damit sollte ein möglicherweise ungewollt auftretender Effekt der Transfektion auf diese Merkmale ausgeschlossen werden. Diese Charakteristika wurden zur Untersuchung gewählt, da sie eine Relevanz für die später analysierte Metastasierung haben. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte über 96 Stunden. Dabei wurden die Zellen täglich gezählt (Abbildung IV-11B). Es konnte keine Veränderung der Teilungsrate zwischen untransfizierten und Luciferase exprimierenden Zellen festgestellt werden.

Auch die zweidimensionale Migration der Zellen wurde durch die Lipofektion nicht beeinflusst (Abbildung IV-11C). Das migratorische Potential der Zellen wurde über einen Wundheilungs-Assay bestimmt. Dabei wurde die Fähigkeit der Zellen beobachtet, eine mechanisch zugefügte Trennung eines Zellrasens zu schließen. Um einen Einfluss der Proliferation der Zellen auf die Schließung der Lücke auszuschließen, wurde die Teilungsfähigkeit der Zellen zu Versuchsbeginn mit Mitomycin C inhibiert. Für alle folgenden Experimente wurden ausschließlich die Luciferase exprimierenden MV3 Zellen verwendet, die ab dem jetzigen Zeitpunkt mit MV3 benannt werden.

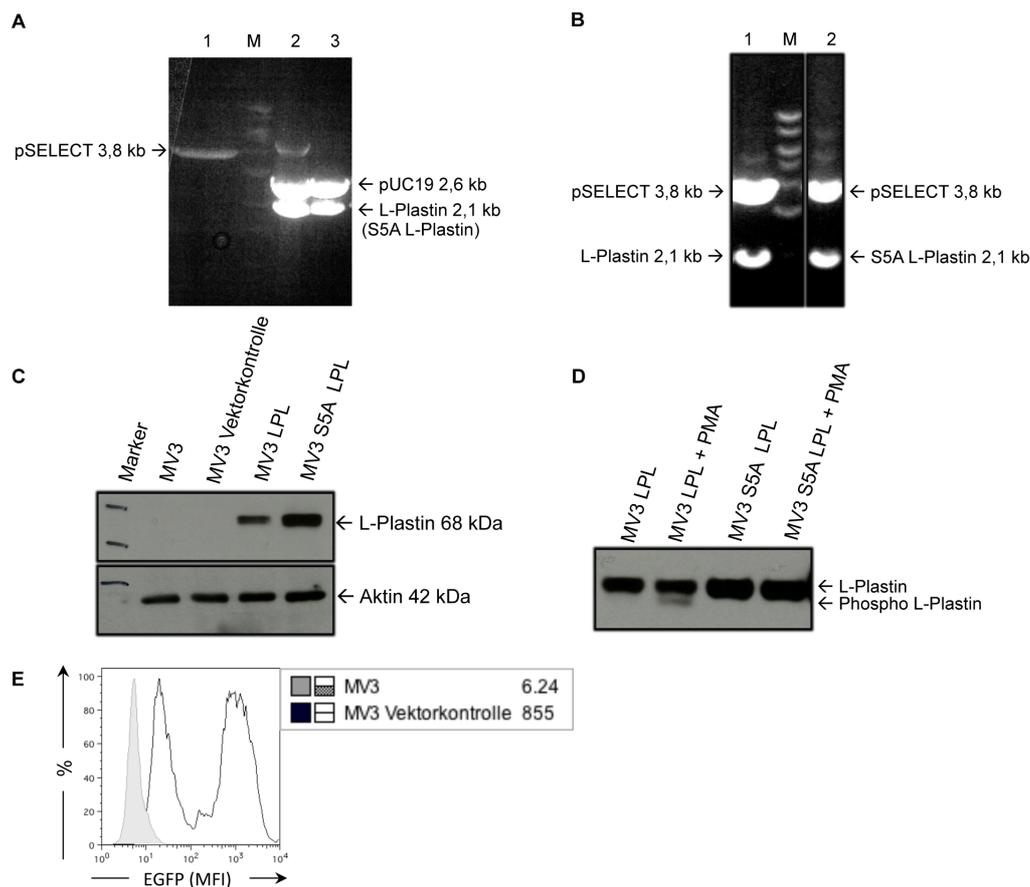


**Abbildung IV-11: Etablierung einer Luciferase exprimierenden MV3 Zelllinie. (A) Nachweis einer Luciferase-Expression verschiedener MV3 Klone nach Transfektion des Luciferase tragenden Plasmids pCAGG3.1-luc2.** Seriell verdünnte Zellen (200.000-1.000 Zellen/Vertiefung) der mit pCAGG3.1-luc2 transfizierten MV3 Klone MV3 pCAGG3.1-luc2 Klon 1 und MV3 pCAGG3.1-luc2 Klon 2. Nach Zugabe von Luciferin konnte die Photonemission der Ausgangszelllinie MV3 (dritte Zeile) mit den transfizierten Zelllinien verglichen werden. Als Kontrolle diente die Luciferase positive Zelllinie PC3. Detektionsdauer: 5 min. **(B) und (C) Transfektion der Zelllinie MV3 mit dem Luciferase-Konstrukt pCAGG3.1-luc2 hatte keinen Einfluss auf (B) das Proliferationsverhalten und (C) das zweidimensionale Migrationsverhalten der Zellen.** (B) 10.000 Zellen pro Vertiefung (MV3, MV3 pCAGG3.1-luc2) wurden in 24 Lochplatten ausgesät und täglich die Zellzahl bestimmt (Neubauer Zählkammer) durchgeführt als Triplikate. Abgebildet sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten und der jeweilige SEM. (C) Die Detektion des Wanderverhaltens zum Schließen des vorhandenen Spalts im Zellrasen wurde über 24 h mittels Videomikroskopie beobachtet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die Größe der Ausgangswunde wurde jeweils gleich 1 gesetzt. Durchgeführt als Triplikate. Die Punkte zeigen die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten und den jeweiligen SEM.

MV3 Zellen zählen zu den 32 % der Karzinome, die keine L-Plastin Expression aufweisen (Lin et al., 1993). Dies ermöglichte durch eine ektope Expression, neben der Rolle der Expression des Proteins, auch den Einfluss einer Phosphorylierung von L-Plastin auf das Metastasierungspotential von MV3 Zellen zu erforschen. Dazu wurden MV3 Zellen generiert, die entweder Wildtyp L-Plastin (LPL) oder mutiertes L-Plastin (S5A LPL) exprimierten. Bei der mutierten Form handelt es sich um einen Variante, die an Position 5 der Aminosäurekette einen Alanin-Rest anstatt eines Serin-Restes enthält. Dadurch ist die für L-Plastin beschriebene Phosphorylierungsstelle mutiert. Eine Phosphorylierung des Proteins sollte damit nicht mehr möglich sein. Die zur Transfektion eingesetzten Konstrukte wurden zunächst in den Expressionsvektor pSELECT kloniert (Abbildung IX-3). Dieser enthält zur Selektion von positiv transformierten Zellen ein Hygromycinresistenzgen. Dazu wurden die kodierenden

Sequenzen des L-Plastin Gens und des mutierten L-Plastin Gens als *Bam*HI-Fragmente aus dem Vektor pUC19 ausgeschnitten (Abbildung IV-12A), gelelektrophoretisch aufgetrennt und zur Ligation in den ebenso behandelten Grundvektor pSELECT eingefügt. Nach erfolgter Ligation wurde das Produkt durch Elektroporation in *E. coli* transformiert. Nach Plasmidpräparation konnte die Anwesenheit der Insert-DNA anhand einer Restriktionsanalyse kontrolliert werden (Abbildung IV-12B). Dazu wurde erneut die Restriktionsendonuklease *Bam*HI eingesetzt, die Fragmente von jeweils 2,1 kb freisetzte. Dies entspricht der Größe der L-Plastin cDNA. Die gerichtete Klonierung der cDNA Sequenzen wurde über Sequenzierung bestätigt. Weiterhin wurde ein Kontrollkonstrukt kloniert, das als Reportersequenz die kodierende Region des EGFP Gens enthält (Vektorkarte siehe Anhang). Die klonierten L-Plastin Konstrukte sowie der Kontrollvektor wurden nun zur Transfektion von MV3 Zellen verwendet. Diese erfolgte erneut über Lipofektion. Die transfizierten Zellen wurden über eine Hygromycin Resistenz selektioniert. Klone der Transfektionsansätze wurden herangezogen und auf die Expression der transfizierten cDNA hin untersucht. Die erfolgreiche Transfektion und Expression der L-Plastin-Konstrukte konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung IV-12C). Die Expression des Kontrollproteins EGFP wurde über Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurde die Eigenfluoreszenz des EGFP Proteins genutzt (Abbildung IV-12E). Die generierten MV3 Klone werden im weiteren Verlauf als MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL bezeichnet.

Hauptziel dieses experimentellen Systems war die Erforschung des Einflusses der Phosphorylierung von L-Plastin auf die Metastasierung der MV3 Zellen. Daher war es wichtig, eine generelle Phosphorylierbarkeit des in MV3 Zellen exprimierten Wildtyp L-Plastin sicherzustellen und die Inhibierung der Phosphorylierung von L-Plastin durch die verwendete Mutante zu bestätigen. In diesem Zusammenhang wurden Zelllysate von MV3 LPL und MV3 S5A LPL nach Stimulation im nativen Glyzingel aufgetrennt und im Western Blot für L-Plastin gefärbt (Abbildung IV-12D). Eine Doppelbande in der L-Plastin Färbung zeigt eine Phosphorylierung des Proteins an. Wie zu erwarten war wurde Wildtyp L-Plastin, im Gegensatz zur mutierten S5A Variante, nach PMA Stimulation der Zellen phosphoryliert. Eine einzige Punktmutation, die zum Austausch des Aminosäurerestes Serin5 zu Alanin führte, reichte somit aus, um eine Phosphorylierung von L-Plastin zu verhindern. Damit war die Möglichkeit gegeben, erstmals systematisch die Auswirkungen der Phosphorylierung von L-Plastin auf das Verhalten der Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen.



**Abbildung IV-12: Generierung von L-Plastin (und Luciferase) exprimierenden MV3 Zellen (A) Gelelektrophoretische Restriktionsanalyse von pSELECT-hygro-mcs, pUC19-L-Plastin und pUC19-S5A L-Plastin.** Der Restriktionsansatz (*Bam*HI-Verdau) wurde nach dreistündigem Verdau im Agarosegel (1%) aufgetrennt und dieses anschließend mit Ethidiumbromid zur DNA Detektion behandelt. Dem Restriktionsverdau von pSELECT mit *Bam*HI folgte vor der gelelektrophoretischen Auftrennung ein einstündiger Verdau mit alkalischer Phosphatase um die Religation des Vektors zu verhindern. [1: *Bam*HI Restriktion von pSELECT; M= Größenstandart „Smart ladder 1 kb“; 2: *Bam*HI Restriktion von pUC19-LPL; 3: *Bam*HI Restriktion von pUC19-S5A LPL] **(B) Gelelektrophoretische Restriktionsanalyse zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung von pSELECT(S5A)-LPL.** Der Restriktionsansatz (*Bam*HI-Verdau) wurde nach einstündigem Verdau im Agarosegel (1 %) aufgetrennt und dieses anschließend mit Ethidiumbromid zur DNA Detektion behandelt. Die positiven und zur weiteren Transfektion eingesetzten Plasmide sind oben gezeigt. [1: *Bam*HI Restriktion von pSELECT-LPL; M: Größenstandart „Smart ladder 1 kb“; 2: *Bam*HI Restriktion von pSELECT-S5A LPL]. **(C) Nachweis einer L-Plastin Expression in Luciferase positiven MV3 Zellen nach Transfektion mit L-Plastin cDNA Konstrukten.** Je 360.000 Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. L-Plastin wurde mit einem L-Plastin spezifischen Antikörper (LPL4A.1) markiert und anschließend mittels eines Sekundäntikörpers detektiert (anti Maus HRP). **(D) Stimulation mit PMA führte zu einer Phosphorylierung von ektop exprimiertem L-Plastin in MV3 Zellen, wohingegen mutiertes L-Plastin (S5A LPL) nicht phosphoryliert werden konnte.** Nachweis einer L-Plastin Expression und Phosphorylierung von L-Plastin in MV3 Zellen mittels Western Blot nach nativem Glyzingel. Die Zellen wurden, wenn angegeben, mit PMA ( $10^{-8}$  M für 30 min) stimuliert und in Anwesenheit von Okadainsäure ( $0,3 \mu\text{M}$ ) lysiert. 400.000 MV3 Zellen wurden pro Spur in einem nativen Glyzin-Gelsystem aufgetrennt. Eine Phosphorylierung von L-Plastin nach Stimulation ist anhand des Auftretens einer zusätzlichen Bande zu erkennen. **(E) Expression des Kontrollvektors pSELECTHygro-EGFP in MV3 Zellen nach Lipofektion.** Nachweis der EGFP Expression mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen.

#### *IV.2.1.2 Charakterisierung der transfizierten Melanomzellen MV3*

Die hier verwendete Lipofektion ist eine weit verbreitete und gut charakterisierte Methode zur genetischen Manipulation von Zelllinien. Dennoch können ungewollte Nebeneffekte auftreten, die anschließende Ergebnisse verfälschen könnten. Um dieses Risiko auszuschließen, wurden die generierten Zellen MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL zunächst hinsichtlich ihrer Biolumineszenzaktivität analysiert und verglichen (Abbildung IV-13A). Die Detektion der Photonenemission mittels Biolumineszenzmessung nach Zugabe von Luciferin zu seriell verdünnten Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen den verwendeten Subzelllinien. Es war bei allen Zellen bereits ein Biolumineszenzsignal ab 1000 Zellen zu detektieren. Dies machte einen späteren Vergleich der im Tierexperiment entstandenen Metastasen möglich.

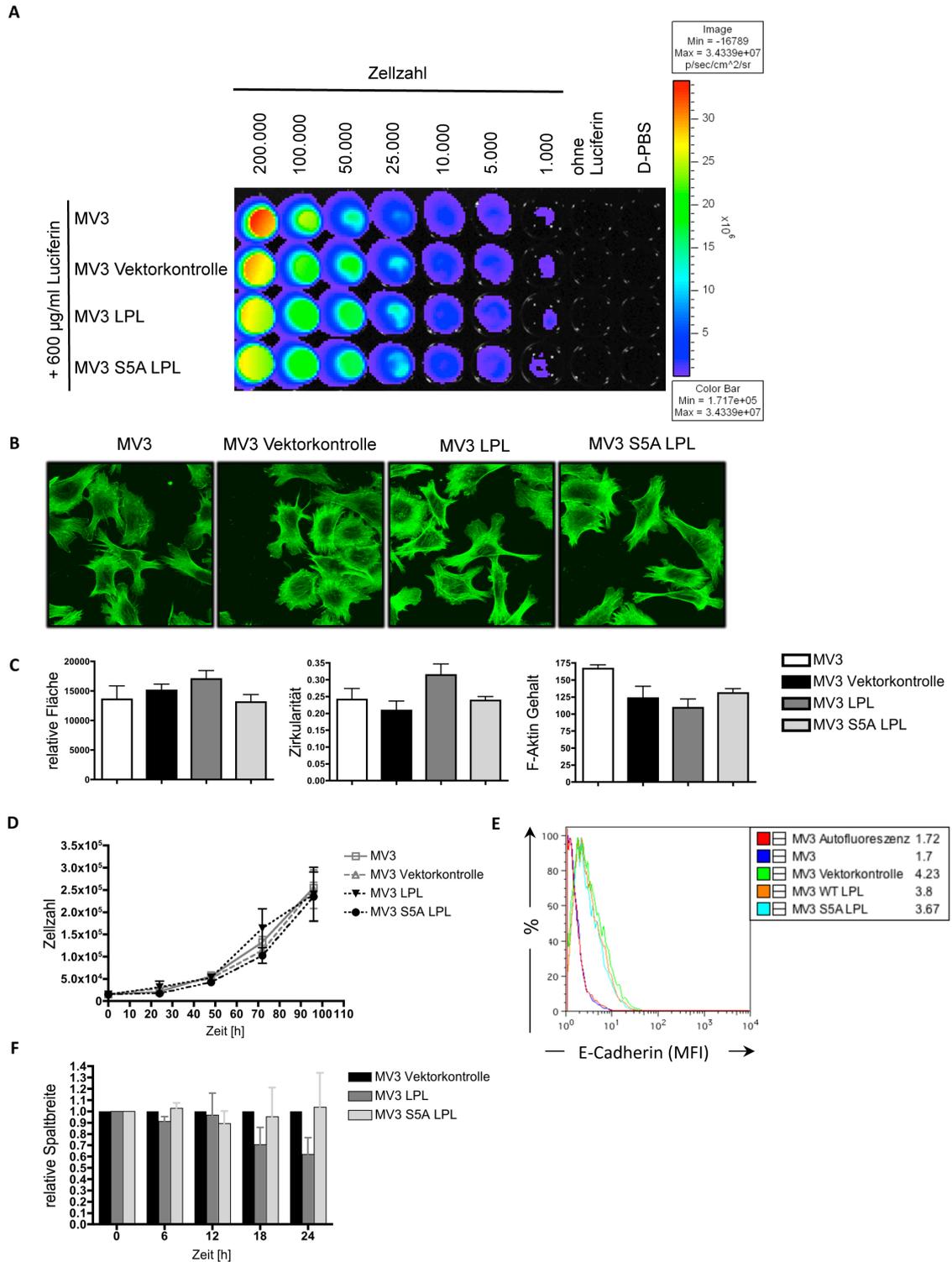
Darüber hinaus wurde auch die Morphologie der Zellen nach den Transfektionen untersucht (Abbildung IV-13B und C). Dazu wurden die Zellen auf Kollagenbeschichteten Objektträgern ausgesät, für 2 Stunden kultiviert und anschließend mit PFA fixiert und F-Aktin mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (AlexaFluor488) markiert. Neben der Bestimmung des F-Aktin Gehaltes der Zellen wurden als morphologische Kriterien die Größe und die Zirkularität der Zellen betrachtet. Ausgewertet wurden dabei mindestens 20 Zellen aus drei unabhängigen Versuchen, die einzeln vorlagen und deren gesamter Zellkörper gut erkennbar war. Die auf Kollagen adhärierenden Zellen zeigten eine teilweise ausgestreckte Form mit vielen Zellausläufern, welche einen besonders hohen F-Aktin Gehalt aufwiesen. Der Zellkern lag überwiegend zentriert vor. Die untersuchten Zelllinien wiesen keinen signifikanten Unterschied untereinander hinsichtlich ihrer Größe und Zirkularität auf. Auch der F-Aktin Gehalt änderte sich durch die Expression von L-Plastin nicht.

Des Weiteren wurden die Effekte einer L-Plastin Expression auf die Proliferation getestet (Abbildung IV-13D). Die Wachstumsraten der unterschiedlichen MV3 Zellen wurden dazu über 96 Stunden beobachtet. Dabei wurde alle 24 Stunden die Zellzahl bestimmt. Die Kenntnisse über die Teilungsraten der Zellen erlaubt später eine Interpretation möglicher Unterschiede in der Tumorgöße und der über die Versuchsdauer steigenden Tumormasse der Tiere. Ist das Proliferationsverhalten der Zellen durch L-Plastin verändert, kann sich dies auch auf den Metastasierungsstatus der Tiere auswirken. Die unterschiedlichen MV3 Zellen zeigten jedoch keinen Unterschied in ihrem Proliferationsverhalten.

Wie bereits für die Zelllinie PC3 untersucht, wurden auch die E-Cadherin Expression auf der Zelloberfläche der MV3 Zellen analysiert (Abbildung IV-13E). Eine

durchflusszytometrische Untersuchung bei der ein direkt markierter E-Cadherin Antikörper eingesetzt wurde, erbrachte dabei keinen erkennbaren Unterschied in der E-Cadherin Expression der unterschiedlichen MV3 Zellen.

Ein hinsichtlich der Metastasierung wichtiges Kriterium von Zellen ist deren Fähigkeit zu wandern. Ist das Migrationspotential der Zellen verändert, dann ist auch mit einem Unterschied in der Metastasierungsstärke dieser Zellen zu rechnen. Um dies zu testen wurde zunächst wiederum die zweidimensionale Migration der Zellen im Wundheilungsexperiment analysiert (Abbildung IV-13F). Verglichen wurden hierbei die Zelllinien MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit den vorhandenen Spalt zu schließen festgestellt werden. Jedoch, war ein Trend zu erkennen, wonach Zellen die Wildtyp L-Plastin exprimierten einen geringen Vorteil hatten. Dies galt jedoch nicht für Zellen, die unphosphorylierbares L-Plastin exprimierten. Dabei ist festzuhalten, dass diese Beobachtung formal statistisch nicht signifikant war.



**Abbildung IV-13: Charakterisierung der L-Plastin exprimierenden MV3 Zelllinien. (A) L-Plastin Expression hatte keinen Einfluss auf die Biolumineszenzaktivität.** Nachweis einer Luciferase-Expression verschiedener MV3 Klone nach Transfektion von L-Plastin Varianten. MV3, MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL (200.000-1.000 Zellen/Vertiefung). Nach Zugabe von Luciferin konnte die Photonemission der Ausgangszelllinie MV3 mit den transfizierten Zelllinien verglichen werden. Detektionsdauer: 5 min. **(B und C) Ektope Expression von L-Plastin hatte keinen Einfluss auf die Morphologie der MV3 Klone.** 150.000 Zellen (MV3, MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL, MV3 S5A LPL) wurden auf ein Kollagen (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtetes Deckgläschen ausgesät und mit Phalloidin AlexaFluor488 angefärbt. **(B) Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Zellen. (C) Graphische Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen.** Untersucht wurden die Fläche, die Zirkularität und der F-Aktin Gehalt der Zellen, wobei der Wert 1 eine kreisrunde Zelle beschreibt. **(D) Ektope Expression von L-Plastin hatte keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen.** 10.000 Zellen pro Vertiefung (MV3, MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL, MV3 S5A LPL) wurden in 24

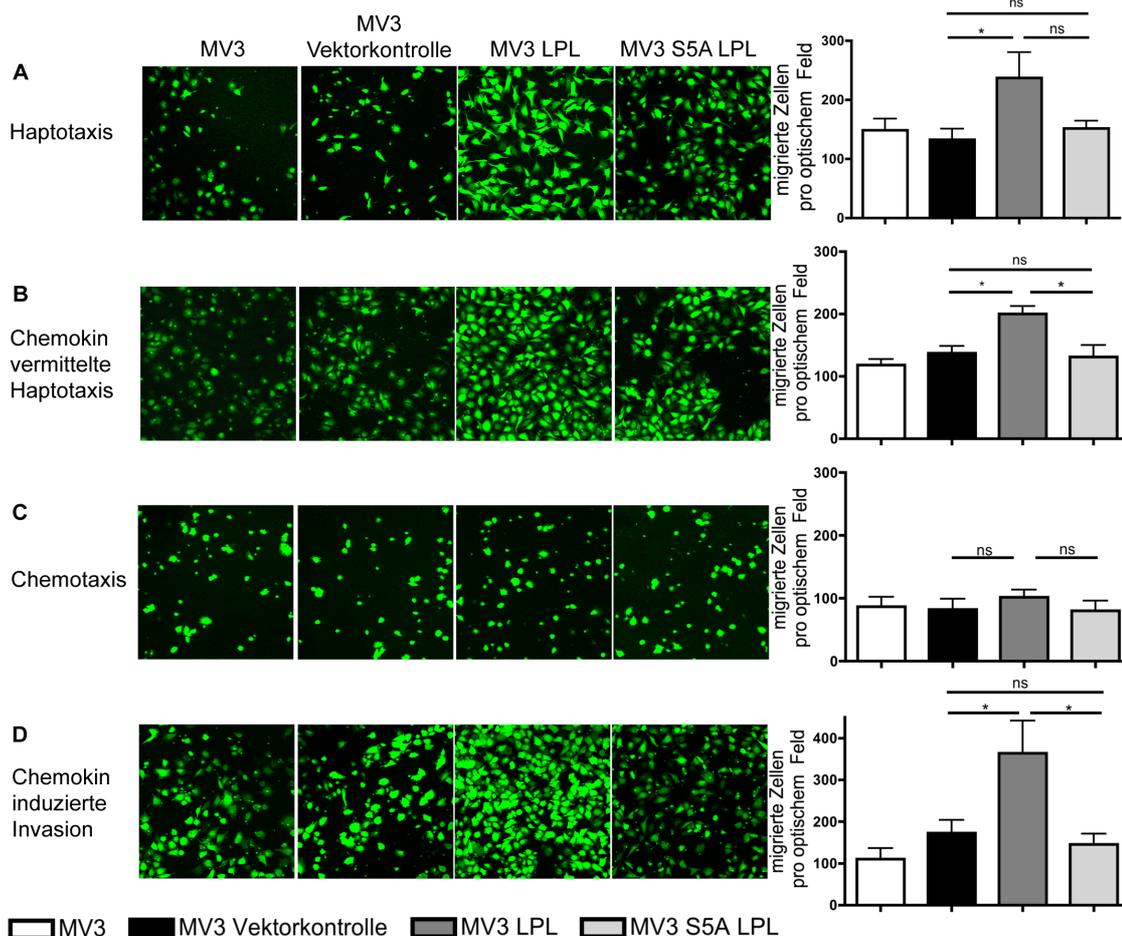
Lochplatten ausgesät und täglich die Zellzahl bestimmt (Neubauer Zählkammer). Abgebildet sind die Mittelwerte von 4 unabhängigen Versuchen und der jeweilige SEM. **(E) L-Plastin Expression führte zu keiner Veränderung der E-Cadherin Expression auf der Zelloberfläche.** Durchflusszytometrische Analyse der Ausgangszelllinie MV3 sowie der transfizierten Klone. Die Zellen wurden mit einem PE-konjugierten anti-E-Cadherin Antikörper inkubiert. Gezeigt ist die Überlagerung der Histogramme von MV3 Autofluoreszenz, MV3, MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL (MFI). **(F) Ektope Expression von L-Plastin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die zweidimensionale Migration der MV3 Zellen.** Die Detektion des Wanderverhaltens zum Schließen eines vorhandenen Spalts im Zellrasen wurde über 24 h mittels Videomikroskopie beobachtet. Die Größe der Ausgangswunde wurde jeweils gleich 1 gesetzt; Werte sind auf die Spaltgröße der MV3 Vektorkontroll-Zellen normiert. Die Punkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten und den jeweiligen SEM.

#### **IV.2.2 Die Phosphorylierbarkeit von L-Plastin ist entscheidend für eine verstärkte Migration und Invasion *in vitro***

Bereits in PC3 Zellen konnte bewiesen werden, dass die Expression von L-Plastin das migratorische Verhalten der Zellen fördert. Es war jedoch in diesem System nicht möglich, die Konsequenzen einer Phosphorylierbarkeit von L-Plastin zu erforschen. Die etablierten MV3 Zellen, die entweder Wildtyp L-Plastin oder die nicht-phosphorylierbare Mutante S5A L-Plastin exprimierten, erlaubten jetzt hingegen auch, den Einfluss der Phosphorylierung von L-Plastin auf die metastasierenden Eigenschaften der Zellen zu untersuchen. Für MV3 Zellen konnte bereits die Wirkung einer transienten L-Plastin Expression auf das migratorische und invasive Verhalten von unserer Arbeitsgruppe publiziert werden (Klemke et al., 2007). Zunächst musste geprüft werden, ob diese Ergebnisse auch auf das hier verwendete System mit stabilen Klonen zutrafen. Dabei kamen erneut die bereits für die Zelllinie PC3 beschriebenen Transwellsysteme zum Einsatz (s. Kapitel IV.1.4). Zusätzlich zu den Untersuchungen hinsichtlich der haptotaktischen und chemotaktischen Migration der Zellen wurden sogenannte Invasionstests durchgeführt. Dabei waren die Transwelleinsätze mit einer Schicht aus Matrigel überzogen. Die auf das Matrigel ausgesäten Zellen mussten, um das untere Kompartiment der Transwelleinsätze zu erreichen, die Matrigelschicht durchwandern. Matrigel ist eine galertartige Proteinmischung, die von murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkomzellen sezerniert wird. Dieses experimentelle System stellt somit die *in vivo* Situation einer Invasion von Zellen nach, wie man sie bei der Extravasation oder der Wanderung von Zellen durch organisches Gewebe vorfindet. Als Chemokin diente bei diesen Versuchen mit 10 % FCS angereichertes Kulturmedium im unteren Kompartiment. Die durchgeführten Analysen konnten die Ergebnisse aus der 2007 veröffentlichten Studie bestätigen. L-Plastin exprimierende humane Melanomzellen wiesen eine verstärkte haptotaktische, aber keine verstärkte chemotaktische, Migration auf

(Abbildung IV-14A). Zur Analyse der haptotaktischen Kapazität der Zellen wurde erneut die Unterseite der Filtereinsätze mit Kollagen beschichtet. Dabei war die verbesserte haptotaktische Migration nach Expression von Wildtyp L-Plastin deutlicher sichtbar als nach Expression von nicht-phosphorylierbarem L-Plastin. Der Unterschied zwischen der Anzahl an migrierten Zellen zwischen den Zelllinie MV3 LPL und MV3 S5A LPL erwies sich allerdings bei der statistischen Auswertung der Resultate als nicht signifikant. Betrachtet man die Chemokin-vermittelte haptotaktische Wanderung der Zellen, bei der neben dem haptotaktischen auch ein chemotaktischer Reiz (FCS) gesetzt wurde, führte eine L-Plastin Expression zu einem signifikanten Anstieg der migrierten Zellen (Abbildung IV-14B). Zellen mit der S5A L-Plastin Mutante hingegen zeigte unter diesen experimentellen Bedingungen keine veränderte Wanderungseigenschaft im Vergleich zur Ausgangszelllinie oder zu Zellen die mit der Vektorkontrolle transfiziert waren. Für die Fähigkeit zur Chemokin-vermittelten Haptotaxis war die Phosphorylierungsstelle somit essentiell. Hingegen konnte die reine Chemotaxis von MV3 Zellen durch die Expression von L-Plastin nicht verändert werden. Auch das Vorhandensein der Phosphorylierungsstelle hatte keinen Effekt auf die chemotaktische Migration der Zellen (Abbildung IV-14C). Untersuchungen zum invasiven Verhalten der MV3 Zellen zeigten eine Steigerung der Anzahl an invadierten Zellen in Abhängigkeit einer L-Plastin Expression (Abbildung IV-14D). Dabei war das Vorhandensein der Phosphorylierungsstelle Ser5 erneut entscheidend, denn die Expression der S5A L-Plastin Mutante führte zu keiner verstärkten invasiven Kapazität der Zellen.

Nach diesen eindeutigen *in vitro* Beweisen auf die Förderung von Migration und Invasion durch eine L-Plastin Expression und der entscheidenden Rolle der Phosphorylierungsmöglichkeit des Proteins, konnte dieses experimentelle System nun in die Maus transferiert und die Auswirkungen auf das Tumorwachstum und die Metastasierung analysiert werden.



**Abbildung IV-14: Transwellassay zur Untersuchung der Tumorzell-Migration und -Invasion von MV3 Klonen.** (A) Haptotaxis (B) Chemokin-vermittelte Haptotaxis (C) Chemotaxis und (D) Chemokin induzierte Invasion durch ein Matrigel. Nach Beschichtung der Unterseite der Filtereinsätze mit (A) (B) Kollagen (20 µg/ml Kollagen in 0,02 N Essigsäure) bzw. Einsatz einer Matrigelschicht oberhalb des Filters (D) wurden jeweils 50.000 CFDA gefärbte Zellen (MV3, MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL) in das obere Kompartiment der Transwelleneinsätze gegeben und für (A) (B) (C) 3 h und (D) 16 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Chemoattraktant diente in (B) (C) (D) im unteren Kompartiment 10 % FCS. Anschließend wurden die Zellen auf der Unterseite des Filters konfokalmikroskopisch dokumentiert. Auf der rechten Seite sind die dazugehörigen statistischen Auswertungen gezeigt. Ausgezählt wurden jeweils 4 optische Felder. Angegeben sind die Mittelwerte der transmigrierten Zellen aus sechs unabhängigen Versuchen, die Balken geben den SEM an mit \*= $p < 0,05$ .

### IV.2.3 Die Expression von phosphorylierbarem L-Plastin führt nach intrakardialer Injektion von Tumorzellen zu einer verstärkten Metastasierung *in vivo*

Die Expression von L-Plastin in PC3 Tumorzellen fördert deren Metastasierung. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden. Die geschilderten Daten der MV3 Zellen bestätigten zudem die maßgebliche Rolle der Phosphorylierbarkeit von L-Plastin für die Zellmigration, bisher jedoch nur *in vitro*. Entsprechend sollte der Faktor der Phosphorylierung umgehend auch *in vivo* überprüft werden. Dazu wurde zunächst ein

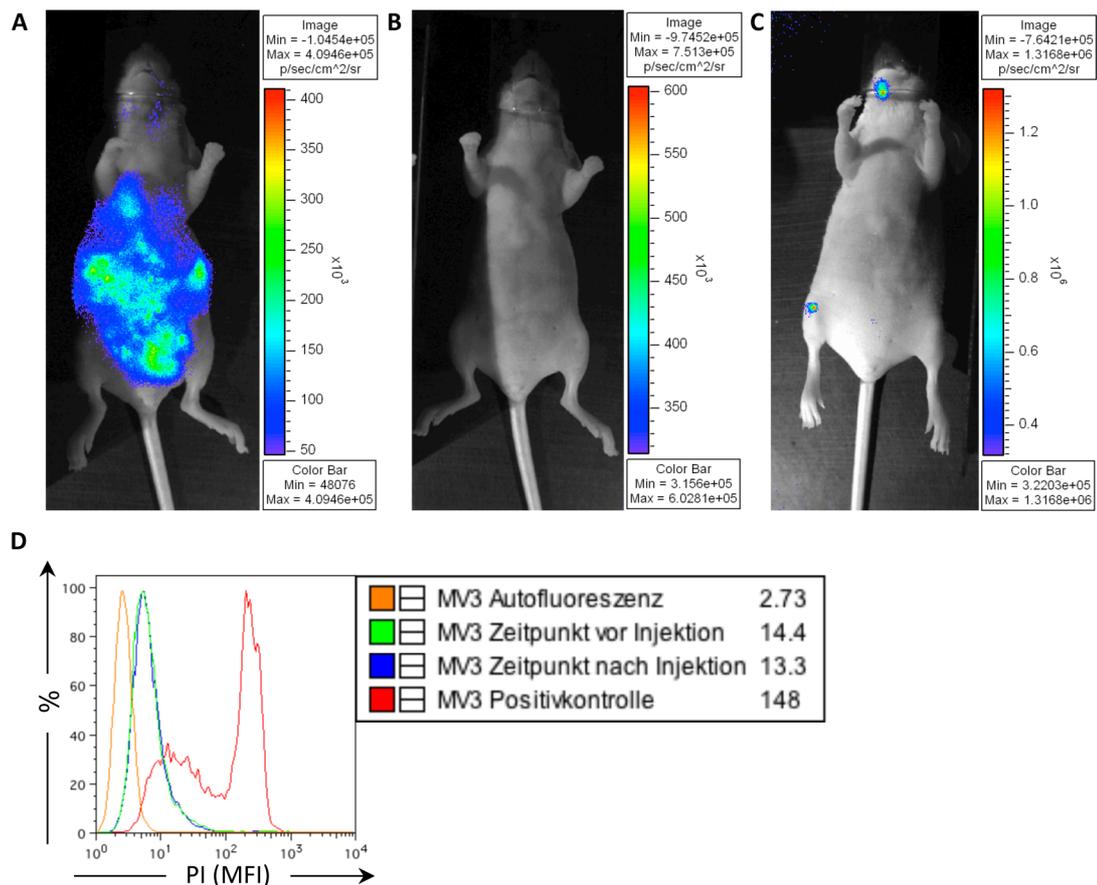
Modell zur Untersuchung des Primärtumorwachstums nach subkutaner Applikation von MV3 Zellen in immunsupprimierte Balb/c nude Mäuse verwendet. Dieses System wurde bereits einige Male in der Literatur beschrieben und sollte neben des Wachstums eines Primärtumors auch zur Ausbildung von Lungenmetastasen führen (Hofmann et al., 1999; Thies et al., 2007). Die subkutane Injektion von  $2,5 \times 10^5$  Zellen (diese Zellzahl wurde aus der Literatur entnommen) in den Oberschenkel der Tiere resultierte jedoch in einem so rasanten Wachstum der Tumore, dass ab Tag 35 bereits Tiere aus einzelnen Versuchsgruppen abgetötet werden mussten, da die nach Tierantrag (G168/09) geltenden Abbruchkriterien bezüglich der Maximalgröße des Primärtumors ( $\varnothing$  1,5 cm) erreicht waren (Daten nicht gezeigt). Hinzu kam eine hohe Intra- sowie Intertestvarianz der einzelnen Versuchsgruppen. Zudem konnte, im Widerspruch zu einigen Literaturverweisen, keine Metastasierung ausgehend vom Primärtumor in andere Organe beobachtet werden. Da dieses experimentelle System in diesem Zusammenhang nicht die gewollten Erkenntnisse zur Beeinflussung der L-Plastin Expression und Phosphorylierung auf die Metastasierung lieferte, wurde in einem nächsten Schritt auf die intrakardiale Applikation von MV3 Zellen gewechselt. Dieses System hatte sich bereits für die Zelllinie PC3 bewährt.

#### IV.2.3.1.1 Verifizierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion

Die intrakardiale Injektion von Tumorzellen in Mäuse ist für eine Reihe von Zelllinien, wie auch für die bereits in dieser Arbeit verwendete PC3 Zelllinie, beschrieben. Dieser experimentelle Ansatz erlaubt die Untersuchung der metastatischen Kaskade von Tumorzellen. Es können die Prozesse der Extravasation, Migration, Invasion und Adhäsion der Zellen bis zur vollständigen Etablierung einer Metastase analysiert werden. Für die humane Melanomzelllinie MV3 war dieses System bisher jedoch noch nicht beschrieben. Daher musste die Methode zunächst etabliert werden und getestet werden, ob nach intrakardialer Injektion von MV3 Zellen in Mäuse Metastasen auswachsen. Verwendet wurden dazu immunsupprimierte Balb/c nude Mäuse. Zum Zeitpunkt der Injektion waren die Mäuse 5 Wochen alt und hatten ein Gewicht zwischen 12 und 16 Gramm. Da im Vergleich zur bereits verwendeten PC3 Zelllinie eine höhere Biolumineszenzaktivität der MV3 Zellen bekannt war (Abbildung IV-11A) und auch das Proliferationsverhalten der Zellen erhöht war, wurden für die intrakardialen Injektionen  $1 \times 10^5$  Zellen (zum Vergleich:  $1,5 \times 10^5$  Zellen für PC3) verwendet. Die Beobachtung der injizierten Zellen im Tier erfolgte über Biolumineszenzimagining. Zur Verifizierung der Methode wurden die Tiere 60 Minuten

nach Injektion, sowie 24 Stunden und im Anschluss zwei mal wöchentlich untersucht. Nach der Applikation der Tumorzellen waren diffus über den gesamten Körper der Maus verteilte Signale zu beobachten (Abbildung IV-15A). Diese Signale waren nach 24 Stunden völlig verschwunden (Abbildung IV-15B). Im weiteren Verlauf der Versuchsperiode waren langsam heranwachsende einzelne Tumorherde zu beobachten. Abgebildet ist der Zustand nach 3 Wochen (Abbildung IV-15C). Zur intrakardialen Injektion ist eine aufwendige und langwierige Vorbereitung der Zellen und der Tiere notwendig. Um zu gewährleisten, dass die Tumorzellen über die Dauer des Experiments nicht an Vitalität verlieren und es eventuell zur Injektion toter Zellen kommt, wurde die Vitalität der injizierten Tumorzellen nach Fertigstellung der Vorbereitungen und nach Injektion der jeweils pro Versuch letzten Injektion analysiert. Um den Zeitraum der Lagerung der fertig zur Injektion präparierten Zellen auf maximal zwei Stunden zu beschränken, wurden zudem maximal 10 Tiere in direkter Folge mit gleichzeitig vorbereiteten Zellen injiziert. Die Bestimmung der Vitalität der Zellen erfolgte mittels einer Propidiumiodid Färbung. Propidiumiodid ist ein DNA markierender Farbstoff, der jedoch nur in Zellen mit permeabilisierter Membran eindringen kann. Dadurch ist eine Unterscheidung zwischen lebendigen und toten Zellen möglich. Als Positivkontrolle dienten durch Ethanol abgetötete Zellen. Die Vitalität der MV3 Zellen über die gesamte Versuchsdauer war nicht beeinträchtigt (Abbildung IV-15D). Damit konnte sichergestellt werden, dass alle injizierten Zellen lebten und sich auch innerhalb der Gruppen die Vitalitätsrate nicht veränderte. Diese Kontrolle wurde für alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen und Experimente durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Es konnte somit eine Methode zur Untersuchung der Metastasierungseigenschaften von MV3 Zellen nach intrakardialer Injektion in die Maus entwickelt werden. Dabei konnte eine Verteilung der Zellen im gesamten Körper, eine konstante Menge an applizierten Zellen und eine erfolgreiche Induktion der Metastasierung bestätigt werden. Der Verlauf der Streuung und Proliferation der Tumorzellen im Tier konnte erfolgreich über einen Zeitraum von 6 Wochen mittels Biolumineszenz verfolgt werden.

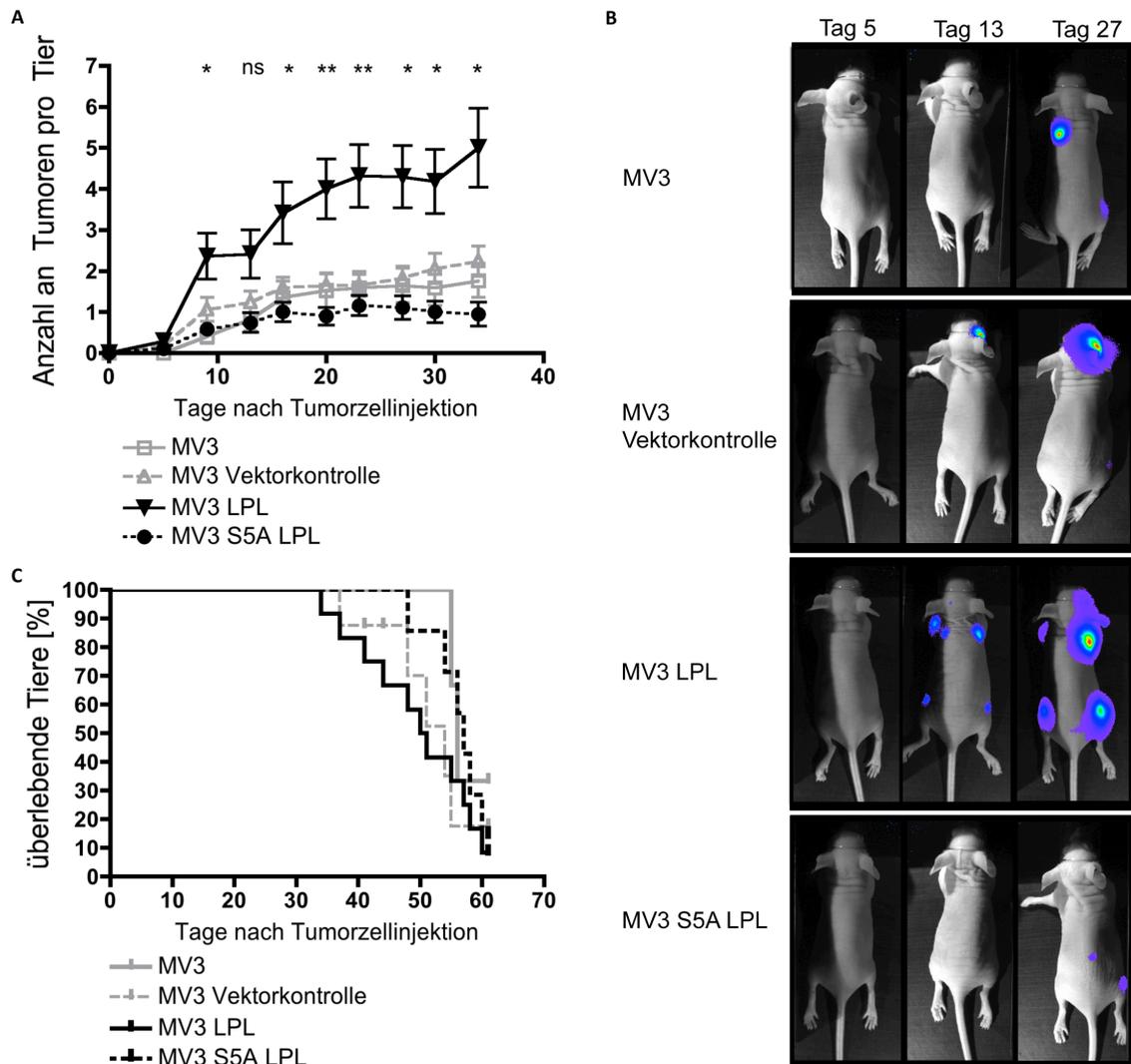


**Abbildung IV-15: Evaluierung einer erfolgreichen intrakardialen Injektion von Tumorzellen mittels Biolumineszenzbildgebung.**  $1 \times 10^5$  Luciferase positive Tumorzellen (MV3) wurden in  $100 \mu\text{l}$  PBS in den linken Herzventrikel 5 Wochen alter immundefizienter Balb/c Mäuse injiziert. **(A)** 60 Minuten im Anschluss an die Applikation konnte mittels Biolumineszenzbildgebung nach intraperitonealer Luciferin Injektion ( $15 \text{ mg/ml}$ ;  $100 \mu\text{l}/10 \text{ g}$  Maus) eine diffus über den gesamten Körper der Maus verteilte Photonenanreicherung detektiert werden. **(B)** 24 Stunden nach der Tumorzellapplikation konnte in demselben Tier kein Signal detektiert werden. **(C)** Nach 3 Wochen waren differenzierte einzelne Photonenanreicherungen zu erkennen, die einzelne Tumorherde (Metastasen) darstellen. **(D) Die Vitalität der zur intrakardialen Injektion in die Mäuse vorbereiteten Tumorzellen nimmt über die Dauer des Eingriffs nicht ab.** Zusätzliche Ansätze der zur Injektion vorbereiteten Zellen wurden zum Zeitpunkt vor der Injektion sowie zum Zeitpunkt nach aller stattgefundenen Injektionen mit Propidiumiodid (PI) ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Positivkontrolle dienten mit Ethanol abgetötete Zellen. Gezeigt sind die Überlagerung der Histogramme der Propidiumiodid-positiven Zellen. In der Legende angegeben ist der MFI.

#### IV.2.3.1.2 Expression von phosphorylierbarem L-Plastin in MV3 Zellen erhöht die Metastasierung nach intrakardialer Tumorzellinjektion in Mäuse

Nach der erfolgreichen Etablierung der intrakardialen Injektion von MV3 Zellen wurde diese Methode genutzt, um die Metastasierungseigenschaften von L-Plastin exprimierenden MV3 Zellen und Zellen ohne L-Plastin Expression zu vergleichen. Ein weiteres Augenmerk wurde auf die metastatische Kapazität von MV3 Zellen gelegt, die S5A mutiertes L-Plastin exprimierten.  $1 \times 10^5$  Tumorzellen wurden in den linken Herzventrikel immunsupprimierter Balb/c nude Mäuse injiziert. Die Streuung der

Tumorzellen im Körper und deren Wachstum wurde mittels Biolumineszenz zweimal wöchentlich verfolgt (Abbildung IV-16A und B). Die Expression von Wildtyp L-Plastin in MV3 Zellen führte dabei zu einer signifikant verstärkten Metastasierung. Die Anzahl an detektierten Metastasen lag bei der Injektion von MV3 LPL zu Versuchsende bei ca. fünf pro Tier, wohingegen MV3 Zellen ohne L-Plastin in der Regel nur durchschnittlich zwei Metastasen entwickelten. Interessanterweise führten MV3 S5A LPL injizierte Zellen ebenfalls nur zur Ausbildung von durchschnittlich zwei Metastasen pro Maus und unterschieden sich somit nicht von der Streuaktivität von MV3 Zellen ohne L-Plastin Expression (MV3 bzw. MV3 Vektorkontrolle). Die Phosphorylierbarkeit von L-Plastin ist demnach *in vivo* ein entscheidender Faktor, der die Metastasierung von Tumorzellen beeinflusst. Das bestätigte sich auch bei Betrachtung der Überlebenskurven der Tiere (Abbildung IV-16C). War die Phosphorylierbarkeit des tumorzellspezifischen L-Plastins durch die Mutation an Ser5 verhindert (S5A), so war auch das Überleben der Tiere deutlich verlängert. Exprimierten die injizierten Tumorzellen hingegen Wildtyp L-Plastin, führte dies zu einer verstärkten Metastasierung und entsprechend auch zu einem verkürzten Überleben der Tiere nach Tumorzellinjektion. Während an Tag 42 nach Tumorzellinjektion bereits 50 % aller Versuchstiere der Gruppe MV3 LPL verstorben waren, lag die mediane Überlebenszeit der Tiere, deren injizierte Tumorzellen mutiertes, nicht-phosphorylierbares, L-Plastin exprimierten, bei 58 Tagen. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich auch für Tiere die mit MV3 Zellen ohne L-Plastin injiziert wurden (mediane Überlebenszeit: 58 Tage) bzw. Tiere die MV3 Zellen mit einem Kontrollvektor injiziert bekamen (mediane Überlebenszeit: 57 Tage). Interessant war weiterhin zu beobachten, dass nur 64 % aller Tiere der Gruppe S5A LPL Tumore entwickelten. Dies war der geringste Anteil an tumortragenden Tieren in einer Gruppe. Hingegen entwickelten 92,5 % aller Tiere denen MV3 LPL Zellen injiziert wurden Metastasen (MV3: 75%; MV3 Vektorkontrolle: 83,3%).

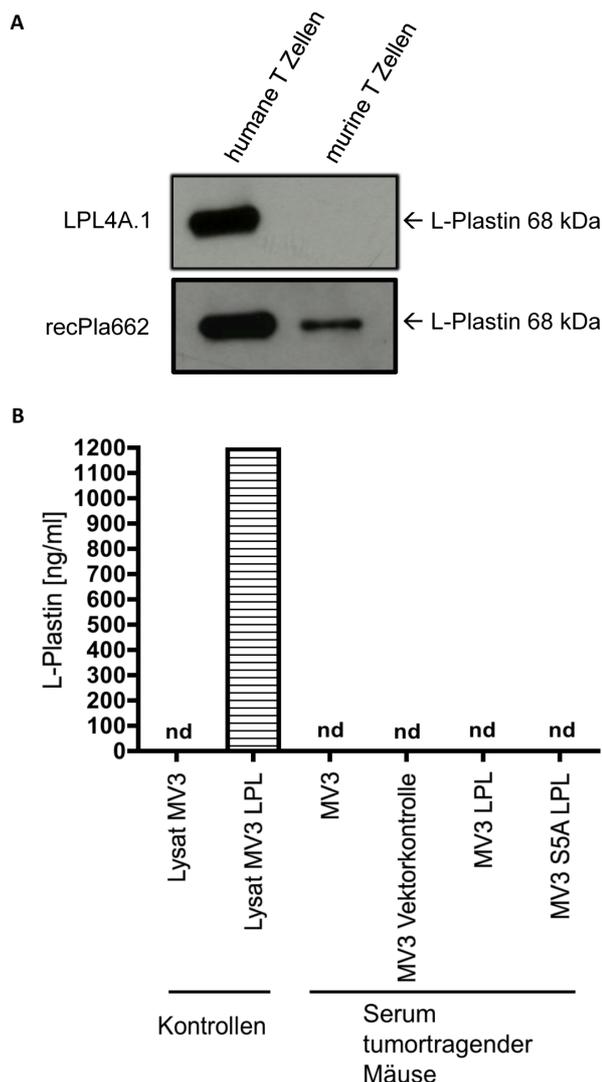


**Abbildung IV-16:** Expression von phosphorylierbarem L-Plastin in MV3 Zellen führte zu einer erhöhten Anzahl an Metastasen in Mäusen nach intrakardialer Injektion der Tumorzellen.  $1 \times 10^5$  Tumorzellen (MV3, MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL) in  $100 \mu\text{l}$  PBS wurden jeweils in den linken Herzventrikel 5 Wochen alter weiblicher immundefizienter Balb/c Mäuse injiziert. Die Anzahl der auswachsenden Tumore (Metastasen) wurde zweimal wöchentlich mittels Biolumineszenzbildgebung detektiert. **(A)** Statistische Auswertung der Anzahl der Tumore pro Tier über einen Zeitraum von 34 Tagen ( $n=12$  für die Gruppen MV3 und MV3 Vektorkontrolle und  $n=13$  für die Gruppen MV3 LPL und MV3 S5A LPL). Angegeben sind die Mittelwerte und die entsprechenden SEM mit  $*=p<0,05$  und  $**=p<0,01$  (für MV3 LPL vs. MV3 Vektorkontrolle bzw. MV3 S5A LPL) dreier unabhängiger Versuche. **(B)** Biolumineszenzaufnahmen von Beispieltieren an Tag 5, 13 und 27. **(C)** Kaplan-Meier Kurven des Überlebens der Tiere.

#### IV.2.3.2 Untersuchung des Mäuseserums auf von Tumorzellen abstammendes L-Plastin

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde der Nachweis von tumorzellenspezifischem L-Plastin im Serum von Krebspatienten als möglicher prognostischer Marker bei Darmkrebs diskutiert (Li and Zhao, 2011). Um diese aktuelle Arbeit zu kommentieren wurde auch hier das Serum tumortragender Mäuse mittels eines „enzyme-linked

*immunosorbent assay*“ (ELISA) auf humanes L-Plastin hin untersucht. Dazu wurden bei Tötung der Tiere das Gesamtblutvolumen entnommen, das Serum von den festen Bestandteilen des Blutes separiert und in einem selbst entwickelten ELISA gegen humanes L-Plastin untersucht. Hierfür war zunächst entscheidend sicherzustellen, dass der verwendete humane L-Plastin Antikörper LPL4A.1 tatsächlich kein murines L-Plastin erkennt. Dazu wurde L-Plastin in den Lysaten humaner sowie muriner primärer T Zellen über Western Blot Analyse mit dem LPL4A.1 Antikörper, sowie zur Kontrolle mit dem L-Plastin Antiserum recPla662, detektiert. Die Detektion von humanem L-Plastin war sowohl mit dem monoklonalen LPL4A.1 Antikörper wie auch mit dem Antiserum gegen rekombinantes L-Plastin erfolgreich. Jedoch führte der LPL4A.1 Antikörper zu keinem Signal im murinen T Zell-Lysat (Abbildung IV-17A). Somit konnte die Spezifität von LPL4A.1 gegen humanes L-Plastin sichergestellt werden. Die Beschichtung der 96 well half-area Platten für den ELISA erfolgte demnach mit dem human spezifischen monoklonalen L-Plastin Antikörper. Das zu untersuchende Serum wurde über Nacht mit dem gebundenen Antikörper inkubiert. Der Nachweis einer möglichen Bindung von humanem L-Plastin im Serum erfolgte über das L-Plastin Antiserum. Die Detektion erfolgte biochemisch durch enzymatische Farbumschlagreaktion der an den Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase. Es konnte kein humanes L-Plastin im Serum der tumortragenden Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung IV-17B). Dies galt sowohl für Tiere die Tumorzellen appliziert bekamen die L-Plastin exprimierten, als auch für Tiere deren injizierte Tumorzellen keine L-Plastin Expression aufwiesen. Hingegen konnte in Lysaten der injizierten MV3 LPL Tumorzellen L-Plastin mit dem verwendeten ELISA Testsystem eindeutig detektiert werden.



**Abbildung IV-17: Humanes L-Plastin ist nicht im Serum tumortragender Mäuse nachweisbar. (A) Beweis der Spezifität des Antikörpers LPL4A.1 gegen humanes L-Plastin.** 360.000 humane sowie 200.000 murine T Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. L-Plastin wurde mit einem L-Plastin spezifischen Antikörper (LPL4A.1) markiert und anschließend mittels eines Sekundärantikörpers detektiert (anti Maus HRP). Im Anschluss erfolgte eine zweite Markierung der Membran mit dem rekombinanten Antiserum recPla662 und eine Detektion von L-Plastin mittels eines Sekundärantikörpers (anti Kaninchen HRP). **(B) Humanes L-Plastin konnte nicht im Serum tumortragender Mäuse nachgewiesen werden.**  $1 \times 10^5$  Tumorzellen (MV3, MV3 Vektorkontrolle, MV3 LPL und MV3 S5A LPL) in 100  $\mu$ l PBS wurden jeweils in den linken Herzventrikel 5 Wochen alter weiblicher immundefizienter Balb/c Mäuse injiziert und Metastasen auswachen gelassen. Nach Versuchsende wurden die Tiere abgetötet, das Gesamtblutvolumen entnommen und das Serum von den zellulären Bestandteilen getrennt. Die Beschichtung der 96 well half-area Platten erfolgte mit einem human spezifischen monoklonalen L-Plastin Antikörper (LPL4A.1). Das zu untersuchende Serum wurde über Nacht mit dem gebundenen Antikörper inkubiert. Der Nachweis einer möglichen Bindung von L-Plastin Peptiden im Serum erfolgte über ein L-Plastin Antiserum. Die Detektion einer möglichen Bindungsreaktion erfolgte über eine Farbumschlagsreaktion des Substrats OPD (nd = nicht detektierbar).

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen die Beteiligung von L-Plastin an den Mechanismen der Tumormetastasierung funktionell *in vivo* zu beweisen. Wie bereits mit der Zelllinie PC3 nachgewiesen werden konnte, führt die Expression von L-Plastin in Tumorzellen zu einer verstärkten Metastasierung. Die Arbeiten mit der Zelllinie MV3 zeigen eindeutig, dass jedoch nicht nur die Expression von L-Plastin, sondern auch dessen Phosphorylierungsstatus zu beachten ist. So konnte für das humane Melanom eine Abhängigkeit der Metastasierung von der Phosphorylierbarkeit von L-Plastin beschrieben werden.

## V Diskussion

Krebs ist eine tödliche Erkrankung, bei der 90 % aller Todesfälle durch die Metastasierung eines Primärtumors verursacht werden (Fidler, 2002). Die Metastasierung ist ein extrem komplexer Vorgang, dessen Teilschritte mittlerweile zwar detailliert beschrieben werden konnten (Hanahan and Weinberg, 2011), deren molekulare Grundlage jedoch noch überwiegend unklar ist. Die Aufdeckung der molekularen Mechanismen der Metastasierung stellt die größte und wichtigste Herausforderung dar, um eine erfolgreichere Behandlung von Krebspatienten gewähren zu können. In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass die ektope Expression und die Phosphorylierung des Aktin bündelnden Proteins L-Plastin die Metastasierung von nicht-hämatopoetischen Tumoren verstärkt.

Die ektope Expression von L-Plastin, das ehemals als Leukozyten-spezifisches Protein beschrieben wurde, konnte in einer Vielzahl von Tumorzellen festgestellt werden (Park et al., 1994). Über den Einfluss von L-Plastin auf Prozesse der Metastasierung wird bereits seit einiger Zeit diskutiert. *In vitro* konnte die Beteiligung von L-Plastin an Prozessen der Migration und Invasion von Tumorzellen beschrieben werden (Klemke et al., 2007; Zheng et al., 1999). Alle bisherigen Daten aus *in vivo* Studien mit Patientenmaterial beruhen jedoch ausschließlich auf Korrelationsanalysen, die nie einen direkten Zusammenhang der L-Plastin Expression mit der Tumormetastasierung beweisen konnten. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Stärke der Expression von L-Plastin mit dem metastatischen Phänotyp von klinischen Darmkrebsproben ansteigender Progressionsstufen korrelierte (Otsuka et al., 2001). Eine Assoziation zwischen der L-Plastin Expression und wichtigen klinisch-pathologischen Eigenschaften wie Tumorgrad, Krankheitsstadium und Tumorgröße konnte auch für Blasenkrebs mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden (Harris et al., 2008). Eine weitere Arbeit beschrieb eine Expression von L-Plastin in myoepithelialen Brustzellen, jedoch bestand offensichtlich keine Korrelation zwischen der L-Plastin Expression und dem Stadium des Brustkrebses (Lapillonne et al., 2000). *In vivo* fehlte daher bisher ein funktioneller Beweis für die Beteiligung von L-Plastin an den Mechanismen der Tumormetastasierung und/oder des Tumorwachstums.

Wichtig ist hierbei auch, dass bei allen bisher durchgeführten Studien posttranslationale Modifikationen des Proteins nie beachtet wurden. So wurde lange die Phosphorylierung des Proteins nicht berücksichtigt, die eine mögliche Erklärung dieser zunächst widersprüchlichen Daten liefern könnte. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten den Phosphorylierungsstatus von L-Plastin als wichtigen

Regulator in der Beeinflussung der Migration und Invasion von Tumorzellen *in vitro* definieren (Klemke et al., 2007). *In vivo* jedoch fehlten auch hier Befunde, wodurch die Relevanz der Phosphorylierung von L-Plastin auf die Tumorzellmetastasierung bis zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt war.

Demnach lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf zwei Fragestellungen: Beeinflusst die Expression von L-Plastin in Tumorzellen deren metastatisches Verhalten *in vivo* und welche Aufgabe übernimmt in diesem Zusammenhang die Phosphorylierung von L-Plastin? Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurde eine humane Prostatakarzinomzelllinie und eine humane Melanomzelllinie als Modell genutzt, um die funktionellen Konsequenzen einer L-Plastin Expression und Phosphorylierung auf die Metastasierung systematisch zu untersuchen. Dabei konnte in einem *in vivo* Xenotransplantations-Metastasierungsmodell erstmals bewiesen werden, dass nicht nur die Expression von L-Plastin sondern vor allem dessen Phosphorylierung an Ser5 die Tumorzellmetastasierung verstärkt.

## **V.1 Die Auswirkungen der Expression von L-Plastin auf das Verhalten von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo***

Um die funktionellen Konsequenzen einer ektopten L-Plastin Expression auf das Metastasierungsverhalten zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit auf der einen Seite die L-Plastin negative humane Melanomzelllinie MV3 verwendet. Dabei wurde die L-Plastin cDNA unter Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors stabil in das Genom der MV3 Zellen inseriert. Zur Untermauerung der Ergebnisse, und um zu testen welche Aufgaben endogenem L-Plastin im Zusammenhang mit dem Metastasierungsverhalten von Zellen zukommen, diente ein zweites System, in dem die endogene L-Plastin Expression über eine shRNA herunterreguliert wurde. Dazu wurde die humane Prostatakarzinomzelllinie PC3 verwendet. Die Infektion der Zellen mit lentiviralen Partikeln, die eine L-Plastin spezifische shRNA beinhalten, führte zu einer wirkungsvollen Reduktion des endogenen L-Plastins. Es konnte mit Hilfe dieser experimentellen Systeme anhand von *in vitro* Transwellexperimenten sowie von *in vivo* Maus Xenograft Metastasierungsstudien eindeutig gezeigt werden, dass eine Expression von L-Plastin die Metastasierung von Tumorzellen fördert.

### **V.1.1 Die Expression von L-Plastin verstärkt die Migration und Invasion von Tumorzellen *in vitro***

Zu Beginn der Arbeiten wurde das migratorische und invasive Verhalten der zwei verwendeten Zellsysteme in Abhängigkeit einer L-Plastin Expression charakterisiert. L-Plastin exprimierende Zellen migrierten in einem *in vitro* Transwellassay schneller als Zellen ohne, oder mit deutlich verringerter, L-Plastin Expression (Abbildung IV-7, Abbildung IV-14). Hierbei gilt allerdings zu beachten, dass es entscheidende Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten der Migration gab. Tumorzellen reagieren während ihres gerichteten metastatischen Weges auf haptotaktische Signale. Die haptotaktische Migration von MV3 Zellen war abhängig von der L-Plastin Expression. Dies galt jedoch nicht für die chemotaktische Migration. Diese Ergebnisse ergaben sich sowohl in stabil transfizierten MV3 Zellen (diese Arbeit) sowie in transient L-Plastin exprimierenden MV3 Zellen (Klemke et al., 2007). Interessanterweise wiesen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PC3 Zellen jedoch keinen L-Plastin abhängigen Mechanismus der haptotaktischen Migration auf. Ausschließlich die Kombination von Kollagen als haptotaktischem Reiz und der chemotaktischen Anlockung der Zellen durch SDF1 $\alpha$  führte zu einer verstärkten Chemokin-vermittelten Haptotaxis in Abhängigkeit einer L-Plastin Expression. Im Kontrast dazu stehen Resultate aus PC3 Zellen, bei denen mit Ascorbinsäure versetztes NIH3T3 konditioniertes Medium zu einer veränderten chemotaktischen Migration in Abhängigkeit von L-Plastin führten (Zheng et al., 1999). Dieses Ergebnis stammt jedoch von einem anderen als in dieser Arbeit verwendeten PC3 Klon und konnte in der hiesigen Studie nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen zur Invasivität von Tumorzellen mit Hilfe eines Matrigel-Transwellassays wiesen auch Differenzen im invasiven Verhalten von Zellen mit oder ohne L-Plastin Expression auf. Eine ektopische Expression von L-Plastin in MV3 Zellen führte dabei *in vitro* zu einer signifikant erhöhten Anzahl an transmigrierten Zellen (Abbildung IV-14).

### **V.1.2 Die Expression von L-Plastin verstärkt das Primärtumorwachstum und die Metastasierung von Tumorzellen *in vivo***

Zur Untersuchung des metastatischen Verhaltens von Tumorzellen in Abhängigkeit von L-Plastin wurde mit einem Xenograft-Mausmodell gearbeitet. Die Arbeit mit humanen Tumorzelllinien erforderte die Verwendung von immundefizienten Tieren, da

ansonsten eine Abstoßung der humanen Zellen durch das Immunsystem der Mäuse erfolgen würde. Dies beinhaltet gleichzeitig, dass die Auswirkungen der L-Plastin Expression auf die Migration und Invasion hier unabhängig von der Abwehr der Tumorzellen durch das adaptive Immunsystem untersucht wurde. Ein Vorteil findet sich zudem im Fehlen einer Körperbehaarung dieser immundefizienten Tiere, wodurch die nicht invasive Tumorkontrolle mittels Biolumineszenzbildgebung ermöglicht wurde. Um eine möglichst exakte Aussage über die Auswirkung einer L-Plastin Expression auf die Metastasierung treffen zu können, wurden zwei unterschiedliche experimentelle Systeme gewählt. Die subkutane Applikation der Tumorzellen lieferte vor allem Erkenntnisse über die Adhäsion der Zellen am umgebenden Gewebe sowie deren Kolonialisierung und Proliferation. Der Ansatz der intrakardialen Injektion von Tumorzellen in die Maus erweiterte das Spektrum der erforschbaren Prozesse und ermöglichte die Untersuchung der Vorgänge der Wanderung durch den Blutstrom, der Extravasation, der Migration, der Invasion und der Ansiedlung und Etablierung einer Metastase an einem neuen Ort.

#### *V.1.2.1 Eine reduzierte L-Plastin Expression vermindert die Größe des Primärtumors*

Bei einer subkutanen Injektion von PC3 Zellen unterdrückte die shRNA vermittelte Reduktion von L-Plastin das Primärtumorwachstum ([Abbildung IV-8](#)). Wichtig ist hierbei zu beachten, dass die *in vitro* Proliferation dieser Zellen nicht durch eine verminderte L-Plastin Expression beeinträchtigt war ([Abbildung IV-4](#)). Allgemein ist zu bedenken, dass Untersuchungen zur Proliferation *in vitro* die Umgebungssituation von Tumorzellen in einer *in vivo* Umgebung und entsprechende Einflüsse nicht mit berücksichtigen können. So bleibt zu spekulieren, ob sich die in den hier durchgeführten *in vivo* Studien ergebenden geringeren Größen der Tumore mit verringertem L-Plastin Gehalt eventuell durch Substrat-vermittelte Apoptosesignale erklären lassen. Wahrscheinlicher jedoch ist noch, dass der Grund für die unterschiedliche Tumorgöße gar nicht in der Proliferation der injizierten Tumorzellen lag, sondern in deren initialen Etablierung im Gewebe liegt. Entscheidend ist danach, wie vielen injizierten Tumorzellen die lokale Verankerung an Zellen des umliegenden Gewebes und die anschließende Proliferation gelingt. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Ausgangszahl an erfolgreich angesiedelten Zellen kann im weiteren Verlauf des Tumorwachstums, trotz gleicher Proliferationsrate der Zellen, die verringerte Primärtumorgöße zur Folge haben. Das stimmt überein mit dem Fund einer anderen Arbeitsgruppe, die eine Hemmung des Wachstums und der Invasivität

von intraperitoneal injizierten PC3 Zellen durch die Expression von antisense L-Plastin beschrieben (Zheng et al., 1999).

#### *V.1.2.2 L-Plastin verstärkt die Metastasierung von Tumorzellen*

Die intrakardiale Applikation von Tumorzellen stellt die hämatogene Verbreitung von Krebszellen nach und erlaubt eine Analyse des Prozesses der metastatischen Kolonialisierung an verschiedenen Stellen. Eine verminderte L-Plastin Expression führte in der L-Plastin positiven Tumorzelllinie PC3 zu einer reduzierten Metastasierung (Abbildung IV-10). Dementsprechend führte eine ektopische Expression von Wildtyp L-Plastin in MV3 Zellen zu einer verstärkten Metastasierung (Abbildung IV-16). Nach intrakardialer Injektion von PC3 und MV3 Zellen etablierten sich signifikant weniger Tumore bei geringerer oder fehlender L-Plastin Expression. Wie an den Experimenten zur Etablierung der Methode der intrakardialen Injektion zu beobachten war, starben viele der injizierten Tumorzellen nach Injektion innerhalb der ersten 24 Stunden ab (Abbildung IV-9, Abbildung IV-15). Eine ähnliche natürliche Selektion findet man ebenso in der Situation im Patienten. Bei der Metastasierung eines Primärtumors gelingt es nur einem kleinen Prozentsatz der sich lösenden Tumorzellen an einem neuen Ort eine Metastase zu entwickeln. Eine Vielzahl der Zellen ist in der Adhäsion und Kolonialisierung an einer neuen Stelle im Gewebe nicht erfolgreich und überlebt diesen Prozess nicht (Patel et al., 2011). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen des Primärtumorwachstums nach subkutaner Applikation der Tumorzellen. Entscheidend war, wie vielen Zellen die sofortige Adhäsion am Substrat, die Kolonialisierung im Gewebe, bzw. die Auswanderung aus der Blutbahn gelang. Die Extravasation aus der Blutbahn stellt dabei den für die metastasierenden Tumorzellen schwierigsten Schritt dar. Um im Blutstrom überleben zu können, müssen die Tumorzellen extrem anpassungsfähig sein und sich auf die dort herrschenden Bedingungen einstellen. Das Mitfließen im Strom stellt zudem hohe Ansprüche an die Stabilität der Zellen. Dies ist ein Punkt, an dem das Aktin-Zytoskelett sowie Aktin bündelnde Proteine eine entscheidende Rolle übernehmen. Ebenso wie für die Verankerung der Tumorzellen an der Endothelschicht der vaskulären Gefäße. Um den herrschenden Scher- und Zugkräften standhalten zu können, wird ein kräftiges Zytoskelett benötigt, das auf schnell wechselnde Bedingungen reagieren kann. Diese Reorganierungen sowie die Adhärenz von Zellen am umliegenden Gewebe werden von Aktin bündelnden Proteinen, wie L-Plastin, übernommen.

Ein interessanter Aspekt ergab sich des Weiteren bei der Betrachtung der Größe der sich entwickelnden Metastasen nach intrakardialer Injektion der Tumorzellen. Die Größe der einzelnen sich entwickelnden Metastasen zwischen den Versuchsgruppen mit (PC3 bzw. MV3 LPL) oder ohne L-Plastin Expression (PC3 LPL shRNA bzw. MV3) unterschied sich dabei nicht. Allein die Anzahl auswachsender Metastasen differierte in Bezug auf eine L-Plastin Expression der injizierten Tumorzellen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass eine verminderte L-Plastin Expression primär die frühen Schritte der Metastasierung, wie die Extravasation oder die Adhäsion und Einnistung an einer neuen Stelle, beeinflusst. Einer der Hauptmetastasierungsorte von Prostatakarzinomzellen ist das Skelettsystem. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PC3 Zellen stammen aus einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms. Es konnten nach intrakardialer Injektion von Prostatakarzinomzellen ausschließlich Metastasen in den Knochen detektiert werden. Verschiedene andere Organe, die als mögliche Metastasierungsstellen nach intrakardialer Injektion von PC3 Zellen beschrieben wurden (Chu et al., 2008), waren nicht von Tumorzellen befallen. Die Etablierung von Tumorzellen in einem neuen Gewebe setzt zudem eine Interaktion zwischen metastasierenden Krebszellen und Organ-spezifischen Endothelzellen voraus. Die zirkulierenden PC3 Zellen müssen demnach zunächst an Blutgefäße adhären und durch die Endothelschicht migrieren, bevor sie sich in der Knochenumgebung ansiedeln können (Lehr and Pienta, 1998; Sikes et al., 2004). Für diese Prozesse sind Integrine (Tantivejkul et al., 2004), Adhäsionsmoleküle wie Cadherine und auch CXCR4, ein weiteres Membranprotein das auch auf PC3 Zellen exprimiert wird (Taichman et al., 2002), entscheidend. CXCR4 agiert als Chemokinrezeptor von SDF1 $\alpha$ . Für Prostatakarzinomzellen ist der CXCR4/SDF1 $\alpha$  Signalweg bei der Metastasierung beschrieben. SDF1 $\alpha$  wird unter anderem von Osteoblasten exprimiert (Taichman et al., 2002) und eine Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit SDF1 $\alpha$  erhöhte deren Adhäsion an verschiedene Osteosarkome und Knochenmarksendothelien *in vitro* (Taichman et al., 2002). Wohingegen vaskuläre Endothelien anderer Gewebe kein SDF1 $\alpha$  sekretieren (Imai et al., 1999). Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen der *in vitro* Transwellstudien zur chemotaktischen Migration von PC3 Zellen. Einzig SDF1 $\alpha$  konnte als adäquates Chemokin der hier verwendeten PC3 Zellen beschrieben werden und führte zu einer Verstärkung der Migration in Abhängigkeit von L-Plastin (Abbildung IV-7). Die Vermutung liegt somit nahe, dass L-Plastin einer von vielen Faktoren ist, der in den „*homing*“ Prozess von Krebszellen zum Knochen beteiligt ist. L-Plastin hat als Aktin bündelndes Protein Einfluss auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, und somit auch auf eine Integrinverankerung in der Zellmembran.

Für Leukozyten ist die Rolle der L-Plastin vermittelten Integrin-Funktion bereits beschrieben (Jones et al., 1998). So regulierte L-Plastin zum Beispiel die Akkumulation des Lymphozyten-Integrins LFA1 in der immunologischen Synapse zwischen T Zelle und Antigen präsentierender Zelle (Wabnitz et al., 2010). Auch wenn L-Plastin Knockout Mäuse keinen Defekt in der Adhäsion von PMNs aufwiesen, könnte L-Plastin möglicherweise redundante Kapazität mit anderen Integrin-regulierenden Proteinen in Leukozyten teilen (Langereis et al., 2009; Wang et al., 2001). Für Tumorzellen jedoch konnte nach ektopter Expression von L-Plastin kein verändertes Adhäsionspotential beobachtet werden, ebenso führte ein siRNA vermittelter L-Plastin Knockdown in der L-Plastin positiven Melanomzelllinie IF6 zu keiner Beeinflussung der Adhäsion auf Substraten für  $\beta$ 1-Integrine (Klemke et al., 2007). Daher kann über die Beeinflussung von postadhäsiven Integrin-vermittelten Signalereignissen diskutiert werden, die zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führen.

## **V.2 Die Phosphorylierung von L-Plastin ist entscheidend für die Funktion des Proteins bei der Tumorzellmetastasierung**

Mit den hier präsentierten Daten konnte ein eindeutiger Beweis für den Einfluss einer L-Plastin Expression auf die Tumorzellmetastasierung *in vivo* erbracht werden. Jedoch sind nicht alle in der Literatur vorliegenden Daten einzig mit dem Vorkommen oder dem Fehlen einer L-Plastin Expression zu erklären. Worin liegen die unterschiedlichen Effekte einer endogenen und einer ektopten L-Plastin Expression auf die Migration und Invasion von Tumorzellen? Warum kann die L-Plastin Expression in verschiedenen Tumorarten, wie z.B. Blasenkrebs, mit der Invasion und dem Tumorstadium korreliert werden (Harris et al., 2008), bei anderen Tumortypen, wie dem malignen Melanom, jedoch nicht (Klemke et al., 2007)? Eine mögliche Erklärung dieser differenzierten Verhaltensmuster sind weitere beteiligte Faktoren, die die Funktion von L-Plastin beeinflussen.

Ein solcher Faktor ist die Möglichkeit der L-Plastin Phosphorylierung. Die Regulation von L-Plastin über dessen Phosphorylierung wurde für unterschiedliche Leukozyten beschrieben. So konnte in einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems die Phosphorylierung von L-Plastin durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden (Anderson et al., 1985; Henning et al., 1994; Matsushima et al., 1988; Paclet et al., 2004; Shinomiya et al., 2003). Kenntnisse zu den Vorgängen in Tumorzellen liegen kaum vor. Die Phosphorylierung ist nur für L-Plastin, nicht jedoch für die Isoformen T- oder I-Plastin beschrieben (Lin et al., 1998). Es stellt sich die Frage worin der Grund

der Phosphorylierung von L- jedoch nicht von T- und I-Plastin liegt und worauf sich diese Modifikation evolutionär begründet? Zellen die T- und I-Plastin exprimieren, weisen eine sehr geringe bis nahezu keine Mobilität auf. So sind die Zellen von Geweben ortsgebunden, auch die Bürstensaum-Microvilli, in denen I-Plastin spezifisch exprimiert wird, stellen sehr stabile Strukturen dar. Hingegen ist die Situation für L-Plastin in den hochmobilen Zellen des Immunsystems sehr variabel. Sowohl die Signalkaskade einer Immunzellaktivierung, in die L-Plastin eingebunden ist, als auch die Migration von Immunzellen, für die L-Plastin wichtig ist, sind schnelle Prozesse. Es macht daher Sinn, dass sich ein System entwickelt hat, um auf diese schnellen Wechsel des Aktivitätsstatus zu reagieren. Eine aktive Wanderung findet auch bei Tumorzellen während deren Metastasierung statt.

### **V.2.1 Phosphoryliertes L-Plastin verstärkt die Migration und Invasion von Tumorzellen *in vitro***

Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die L-Plastin Funktion in Bezug auf das metastatische Verhalten von Tumorzellen zu analysieren, wurden eine Wildtyp L-Plastin Variante sowie eine nicht-phosphorylierbare mutierte Variante (S5A LPL) von L-Plastin in MV3 Zellen transfiziert. Eine Stimulation der Zellen mit PMA führte zu einer Phosphorylierung eines Teils des ekto exprimierten L-Plastins. Die Mutation am Serinrest 5 hingegen verhinderte eine Phosphorylierung von L-Plastin (Abbildung IV-12).

Die zunächst durchgeführten *in vitro* Experimente lieferten den ersten Beweis für die Notwendigkeit der Phosphorylierung des Proteins, um die Migration und Invasion der Zellen zu beeinflussen. Während die Expression von ekto exprimiertem Wildtyp L-Plastin in MV3 Zellen das haptotaktische sowie das Chemokin-vermittelte haptotaktische Migrationsverhalten der Zellen *in vitro* verstärkte, führte die Expression von nicht-phosphorylierbarem L-Plastin zu keiner verstärkten Migration (Abbildung IV-14). Auf die reine Chemotaxis der Zellen hatte die Phosphorylierung, genauso wie auch die Expression von L-Plastin keinen Einfluss. Auch die Invasion von Melanomzellen durch eine Matrigelschicht konnte durch die Expression von phosphorylierbarem L-Plastin nicht jedoch von nicht-phosphoryliertem L-Plastin deutlich verstärkt werden (Abbildung IV-14). Damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine einfache Punktmutation (S5A LPL), die die Phosphorylierung von L-Plastin verhindert, die L-Plastin abhängige verstärkte Migration der Zellen unterbindet.

Für die Zelllinie PC3 konnte weder eine spontane, noch eine Phosphorylierung nach Stimulation mit unterschiedlichsten Agentien mit den verwendeten Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch SDF1 $\alpha$ , welches die PC3 Zellen zu einer verstärkten Migration anregte, führte *in vitro* zu keiner nachweisbaren Veränderung des im Ausgangszustand unphosphoryliert vorliegenden L-Plastins. Dabei wurden verschiedene Zeit- und Konzentrationskinetiken durchgeführt. Auch andere Stimuli, wie konditioniertes Medium, Forskolin oder PMA hatten keine Auswirkung auf die Phosphorylierung. Gleichwie, die Phosphorylierbarkeit von L-Plastin in PC3 Zellen kann damit nicht ausgeschlossen werden. Vielleicht reichen lösliche Stimuli nicht aus, um eine Phosphorylierung zu bewirken. Dies würde mit der Beobachtung übereinstimmen, dass es nur als Antwort auf eine Kombination aus einem haptotaktischen und chemotaktischen Signal zu einer verstärkten Migration der PC3 Zellen in Abhängigkeit von L-Plastin kam (Abbildung IV-7). Anhand der Unterschiede in der Haptotaxis und Chemokin-vermittelten Haptotaxis ergibt sich ein weiterer möglicher Grund für die nicht nachweisbare Phosphorylierung in PC3 Zellen.

## **V.2.2 Phosphoryliertes L-Plastin verstärkt die Metastasierung von Tumorzellen *in vivo***

Die Wichtigkeit der Phosphorylierung von L-Plastin für das migratorische und invasive Verhalten der Zellen, die durch die *in vitro* Transwelleexperimente beschrieben werden konnte (Abbildung IV-14), bestätigte sich auch in den *in vivo* Untersuchungen zur Metastasierung der Tumorzellen im Xenograft Mausmodell. Die ektope Expression von Wildtyp L-Plastin in der humanen Melanomzelllinie MV3 verstärkte die Metastasierung *in vivo*. Hingegen führte die Expression einer nicht-phosphorylierbaren L-Plastin Variante zu keiner verstärkten Metastasierung nach intrakardialer Injektion der Tumorzellen in die Maus (Abbildung IV-16). Daraus lässt sich ableiten, dass eine verstärkte Auswanderung der Zellen aus dem Gefäßsystem und die Ansiedlung und Auswachsung einer Metastase *in vivo* nicht nur von einer Expression von L-Plastin abhängig sind, sondern dass die Phosphorylierung des Proteins entscheidend ist. Betrachtet man die Ergebnisse der PC3 Zellen, deren endogenes L-Plastin in einem unphosphorylierten Grundzustand vorliegt, würde man auch hier eine induzierbare Phosphorylierung von L-Plastin vermuten. In den *in vivo* Versuchen zur Metastasierungsfähigkeit der PC3 Zellen nach intrakardialer Injektion in die Maus konnte die Anzahl an Tumoren pro Tier durch die Expression einer L-Plastin shRNA reduziert werden. Somit sollte, wenn man die Ergebnisse mit der MV3 Zelllinie

vergleicht, das endogen exprimierte L-Plastin zumindest teilweise phosphoryliert werden, da aus den Ergebnissen der MV3 Zellen bekannt ist, dass nur eine Phosphorylierung von L-Plastin zu einer verstärkten Metastasierung führt. Dies legt die Vermutung nahe, dass PC3 Zellen in der *in vivo* Situation mit Faktoren in Kontakt kommen, die zu einer Phosphorylierung von L-Plastin führen. *In vivo* finden Zellen eine Umgebung mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Einflüssen vor, die *in vitro* nicht vollständig rekonstruiert werden kann. Somit könnten die Interaktionen mit anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix, Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Cytokinen oder intrinsischen Veränderungen der Zellen als Reaktion auf die Umgebung, zu einer Phosphorylierung führen. Für die murinen Melanomzellklone B16F1 und B16F10 konnte unsere Arbeitsgruppe sogar bereits eine verstärkte Phosphorylierung in Abhängigkeit des Metastasierungspotentials zeigen. Das endogene L-Plastin des metastasierenden Klons B16F10 lag im Vergleich zum nicht-metastasierenden Klon B16F1 teilweise phosphoryliert vor (Klemke et al., 2007). Desto mehr zeigt sich die Notwendigkeit bei allen experimentellen Ansätzen, die die Rolle von L-Plastin untersuchen, den Phosphorylierungsstatus von L-Plastin zu berücksichtigen. Somit sind die Ergebnisse und Schlussfolgerungen aller Studien, die diesen Faktor nicht analysiert haben, unter Einbezug dieses Aspektes erneut zu betrachten.

### **V.3 Über welchen Mechanismus übt L-Plastin seinen Einfluss auf das metastatische Verhalten von Tumorzellen aus?**

#### **V.3.1 Einfluss von L-Plastin auf E-Cadherin**

Die zellulären und molekularen Veränderungen, durch die Tumorzellen ihren invasiven und metastasierenden Charakter entwickeln, werden unter anderem als die endotheliale zur mesenchymalen Transition (EMT) bezeichnet. Ein Kriterium in diesem Prozess ist die Reduktion der Kontaktinhibition. Die Zellkontakte werden über Zelladhäsionsmoleküle, die Cadherine, vermittelt. Ein Verlust der E-Cadherin Präsentation auf der Plasmamembran kann den EMT Prozess initiieren (Christofori and Semb, 1999). Eine Expression von E-Cadherin hingegen supprimiert die Invasivität von Tumorzellen (Frixen et al., 1991; Perl et al., 1998; Vleminckx et al., 1991). Es wurde berichtet, dass Cadherine eine Verankerung an dem Aktin basierenden Zytoskelett benötigen um Zell-Zell Adhäsionen zu vermitteln (Nagafuchi et al., 1991; Tsukita, 1992). Da L-Plastin Zytoskelettstrukturen modulieren kann, könnte

es zu Änderungen führen, die eine Zell-Zell Adhäsion oder die Interaktionen zur extrazellulären Matrix über Integrine unterbinden.

Über eine Verbindung der E-Cadherin Expression und dem Invasionsverhalten von Prostatakarzinomen wurde in einigen Studien berichtet. E-Cadherin wird in hohem Maße in normalem Prostatagewebe exprimiert, in niedrigeren Mengen auf „*low-grade*“ (gut differenzierten) Tumoren und nur noch mit einem sehr geringen Level auf „*high grade*“ (gering differenzierten) Prostatakarzinomen (Umbas et al., 1992). Des Weiteren korrelierte der Verlust einer E-Cadherin Expression mit der Invasivität von Prostatakarzinomzellen (Kuniyasu et al., 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten PC3 Zellen zeigten bei intrakardialer Injektion in die Maus eine verminderte Metastasierung und Invasivität bei reduzierter L-Plastin Expression. Diese Zellen mit verminderter Invasivität wiesen jedoch keinen Unterschied in der Oberflächenpräsentation von E-Cadherin auf im Vergleich zu Zellen mit gesteigerter L-Plastin Expression und gesteigerter Invasivität (Abbildung IV-4). Für die humane Melanomzelllinie MV3 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine Veränderung der E-Cadherin Expression als Reaktion auf eine L-Plastin Expression hin detektiert werden (Abbildung IV-13F).

Ein Effekt von L-Plastin auf die E-Cadherin Expression und den Metastasierungsstatus konnte für Darmkrebs gefunden werden. Eine Überexpression von L-Plastin in SW480 Zellen, einer Darmkrebszelllinie die aus einem Primärtumor entstammt, resultierte in einem Anstieg der Proliferationsrate und Invasivität der Zellen und einem Verlust der E-Cadherin Expression auf der Zellmembran. Die verringerte E-Cadherin Menge auf der Zellmembran konnte durch eine Endozytose des Proteins erklärt werden (Foran et al., 2006). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das L-Plastin Hefehomolog Sac6p eine endozytotische Funktion übernimmt und durch L-Plastin substituiert werden kann (Adams et al., 1995). Allerdings muss hier beachtet werden, dass es sich bei der Zelllinie SW480 im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien PC3 und MV3 um eine Zelllinie handelt die aus einem Primärtumor generiert wurde, und nicht von Metastasen abstammt. Die L-Plastin unabhängige E-Cadherin Expression der PC3 und MV3 Zellen könnte daher damit zu erklären sein, dass diese *per se* metastasierenden Zelllinien bereits mit anderen Faktoren auf die gesteigerte Metastasierung reagiert haben und sich im Nachhinein *ex vivo* der E-Cadherin Gehalt nicht mehr ändert.

### V.3.2 Auswirkungen der Phosphorylierung von L-Plastin

Was jedoch bewirkt die Phosphorylierung auf molekularer Basis, wodurch es zu einer verstärkten Invasion und Metastasierung der Zellen kommt? Verstärkt die Phosphorylierung die Funktionen von L-Plastin, wie die Aktinbündelung, oder bewirkt sie weitere sekundäre Effekte, die die metastatischen Kapazitäten wiederum fördern? Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von L-Plastin am Ser5 die Rekrutierung von L-Plastin zum Aktinzytoskelett reguliert (Messier et al., 1993). Bei einer Studie, bei der die Aminosäure Serin an Position 5 gegen Alanin (S5A = nicht-phosphorylierbares L-Plastin) bzw. Glutamin (S5E = konstitutiv phosphoryliertes L-Plastin) ausgetauscht wurde, wurden die Effekte der Phosphorylierung in Vero-Zellen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung die Translokation von L-Plastin zu F-Aktin reichen Strukturen und Regionen einer schnellen Aktinassemblierung verstärkte. Die Phosphorylierung von L-Plastin verstärkte dessen Assoziationsrate zu F-Aktin und reduzierte die Konzentration an freiem L-Plastin (Janji et al., 2006). Dies stärkt das Aktinzytoskelett, was für die festigende Funktion der Zellen bei der Extravasation und dem Überleben der Zellen im Blutstrom entscheidend ist. L-Plastin kontrollierte auch den Aktinumbau und modulierte diesen Prozess durch seine Phosphorylierung in MCF-7 Brustkrebszellen. PMA induzierte die Translokation von L-Plastin zu *de novo* Aktinpolymerisierungsstellen, was durch eine Phosphorylierung verstärkt wurde (Al Tanoury et al., 2010). Diese unterschiedliche Bindungsaffinität von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem L-Plastin zu Aktin könnte durch eine phosphorylierungsbedingte Konformationsänderung zustande kommen. Auch Wirkmechanismen in denen das Aktinzytoskelett nur indirekt beteiligt ist könnten für die phosphorylierungsabhängige verstärkte Invasion von L-Plastin exprimierenden Zellen verantwortlich sein. In MCF-7 Zellen vermittelte L-Plastin in Abhängigkeit einer Phosphorylierung an Ser5 eine Resistenz gegen den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Janji et al., 2010). Die Phosphorylierung spielte auch eine Rolle in der Adhäsion der Zellen. Integrine interagierten über die Assoziation ihrer zytoplasmatischen Schwänze mit den Aktin bindenden Proteinen, wie L-Plastin, mit dem Aktinzytoskelett. Eine Lösung der Integrine von ihrer Verankerung im Zytoskelett führte zur Aktivierung der Adhäsion. Eine Aktivierung der  $\alpha_M\beta_2$  Integrine konnte in polymorphnukleären Zellen mit einer L-Plastin Phosphorylierung korreliert werden. (Jones et al., 1998). Für Neutrophile konnte eine Beteiligung der Expression und der Phosphorylierung von L-Plastin in der Integrin vermittelten Adhäsion beschrieben werden (Chen et al., 2003).

Welche Kinase die Phosphorylierung von L-Plastin katalysiert ist bisweilen nicht eindeutig geklärt. Einige Studien aus Leukozyten berichten von einer Beteiligung der PKA in Abhängigkeit des verwendeten Stimulus (Matsushima et al., 1987; Wang and Brown, 1999). Eindeutiger sind jedoch die Hinweise für eine PKC-abhängige Phosphorylierung von L-Plastin. Hierfür sprechen aktuelle Daten aus T Zellen und Tumorzellen. Die verantwortliche Isoform unterscheidet sich dabei zwischen den verschiedenen Zelltypen. Für T Zellen wurde die PKC $\zeta$  beschrieben (Al Tanoury et al., 2010; Freeley et al., 2012). Arbeiten mit der Brustkrebszelllinie MCF7 wiesen auf PKC $\delta$  als verantwortliches Enzym hin (Al Tanoury et al., 2010; Freeley et al., 2012). Auch die in dieser Arbeit beschriebene Phosphorylierung von L-Plastin in der humanen Melanomzelllinie MV3 nach PMA Stimulation spricht für eine Beteiligung der PKC.

### V.3.3 Effekte der L-Plastin Expression auf die Gesamtgenexpression

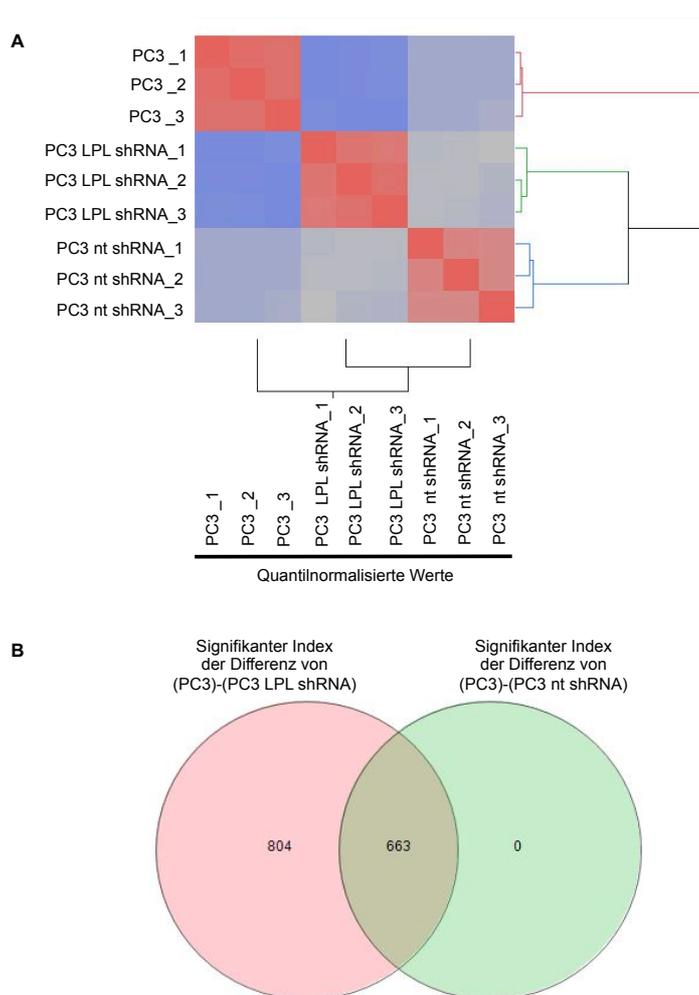
Die Expression von L-Plastin könnte weiterhin Einfluss auf die Genexpression anderer Proteine und somit einen indirekten Effekt auf die Metastasierung haben. Eine Wirkweise auf transkriptioneller Ebene verändert das Genexpressionsprofil der Zellen und deren Proteom. So könnte L-Plastin aktivierende Signale zur Transkription von Onkogenen auslösen oder selbst in der Signalkaskade agieren. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde bereits ein erstes Genexpressionsprofil von Prostatakarzinomzellen in Abhängigkeit einer L-Plastin Expression erstellt. Daraus haben sich vielversprechend Kandidaten ergeben, die durch L-Plastin differentiell exprimiert wurden und auf die Prozesse der Metastasierung wirken könnten ([Abbildung V-1](#)). Untersucht wurden Triplikate der Zelllinien PC3, PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA. Dabei wurde das humane GeneChip<sup>®</sup> Gene 1.0 ST V1 Array System der Firma Affymetrix verwendet. Zur Qualitätskontrolle des durchgeführten Experiments wurde zunächst ein Heat Map der einzelnen Proben erstellt ([Abbildung V-1A](#)). Daraus war zu erkennen, dass die Gruppen in sich eine homogene Genexpression aufwiesen, was auf einen geringen Fehler innerhalb der Triplikate hindeutete. Anhand des Dendrogramms konnte zusätzlich auch eine Aussage über die generelle Unterschiedlichkeit der Genexpressionsdaten zwischen den verwendeten Zelllinien getroffen werden. Alle untersuchten Proben einer Gruppe wiesen Unterschiede zueinander auf.

Der Qualitätskontrolle schloss sich eine Normalisierung der Daten und eine Hintergrundkorrektur an, woraufhin ein statistischer Vergleich der Expression aller auf dem Chip befindlicher Gene zwischen den untersuchten Zelllinie durchgeführt wurde.

Verglichen wurden die p-Werte aller Gene zwischen den einzelnen Gruppen. Durch die Berechnung eines Multitests konnten falsch positive Werte herausgefiltert werden. Da es sich durch die Verwendung von Zelllinien um technische Replikate handelte, waren die Varianzen der Proben sehr gering. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt ein „fold change“ gesetzt, der die relevanten Expressionsdifferenzen eingrenzte. Zur weiteren Analyse und Sortierung der Daten wurde ein Venn Diagramm erstellt um die signifikant differentiell exprimierten Gene den einzelnen Gruppen zuordnen zu können (Abbildung V-1B).

Es konnten 1467 Gene identifiziert werden, die zwischen den Gruppen Unterschiede in der Expressionsstärke aufwiesen. Davon waren 804 Gene unterschiedlich stark exprimiert verglich man die Zelllinien PC3 vs. PC3 LPL shRNA wohingegen sich die Gruppen PC3 und PC3 nt shRNA hinsichtlich dieser Gene nicht unterschieden. Die Schnittmenge von 663 differentiell exprimierten Genen die auch die Zelllinie PC3 nt shRNA betreffen könnte auf Effekte der lentiviralen Infektion auf die Zellen zurückzuführen sein. Zur detaillierteren Betrachtung signifikant differentiell exprimierter Gene und möglichen Identifikation von betroffenen Gengruppen wurden Pathway Analysen auf Grundlage der KEGG Datenbank durchgeführt.

Es konnten nicht nur einzelne differentiell exprimierte Gene beschrieben werden, sondern auch Zusammenhänge und Beeinflussungen von Genverbunden innerhalb dieser Gene identifiziert werden. So zeigte die Expression von L-Plastin deutliche Einflüsse auf die Expressionsprofile von Genen, die dem Zellzyklus-Pathway angehören. Ebenso waren Gene der Signalkaskaden der homologen Rekombination und der oozytische Meiose verändert. Es sind jedoch weitere funktionelle Untersuchungen notwendig, um diese Kandidaten als entscheidende Faktoren zu bestätigen und einen funktionellen Zusammenhang mit der Regulation der Metastasierung von Tumorzellen herzustellen. Dies könnte zudem Aufschluss darüber geben, über welche molekularen Mechanismen die Phosphorylierung von L-Plastin reguliert wird, und ihrerseits wirkt, um somit weitere Erkenntnisse zu erarbeiten, die den Einsatz eines auf L-Plastin basierenden Krebstherapeutikums vorantreiben.



**Abbildung V-1: Analyse der Genexpressionsdaten der Zelllinie PC3, PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA. (A)** Heat Map Darstellung wies auf eine hohe Qualität der Analyse hin. Die Qualitätskontrolle zeigte eine homogene Genexpression innerhalb der Triplikate der zu vergleichenden Zelllinien. Das Dendrogramm deutete auf die Unterschiedlichkeit zwischen den einzelnen Zelllinien hin. **(B)** Venn Diagramm Darstellung der Anzahl an differentiell exprimierten Genen zwischen den Zelllinien PC3, PC3 nt shRNA und PC3 LPL shRNA. 1467 Gene zeigten einen Unterschied in der Expressionsstärke zwischen den Zelllinien PC3 und PC3 LPL shRNA, wobei 663 dieser Gene auch eine signifikant differentielle Expression aufwies verglich man die Zelllinie PC3 mit der Zelllinie PC3 nt shRNA.

#### **V.4 L-Plastin als diagnostisches und therapeutisches Mittel**

Es konnte mit dieser Arbeit erstmals ein funktioneller Beweis für die Beteiligung von L-Plastin an metastatischen Vorgängen erbracht werden und mit der entscheidenden Rolle der Phosphorylierung von L-Plastin auch ein neues Ziel therapeutischer Eingriffe zur Reduktion der Metastasierung definiert werden. L-Plastin wurde bereits einige Male als Biomarker für verschiedene Tumorerkrankungen beschrieben. Als Tumormarker wurde L-Plastin bei einer malignen Erkrankung des Plexus choroideus (Hasselblatt et al., 2006), bei Blasenkrebs (Harris et al., 2008) und Darmkrebs (Ang and Nice, 2010) eingesetzt. Die bisherigen Erkenntnisse ließen jedoch einen klaren kausalen Zusammenhang sowie eine mögliche molekulare Erklärung für die Wirkweise von L-Plastin auf die Verstärkung der Metastasierung offen und berücksichtigen den Phosphorylierungsstatus nicht. Es ist jedoch nach den hier gezeigten neuen

Erkenntnissen zur fundamentalen Rolle der Phosphorylierung des Proteins entscheidend, für neue Ansätze die Verwendung eines Phospho-L-Plastin spezifischen Antikörpers als Tumormarker zu verwenden. Des Weiteren wurde auch der Nachweis von L-Plastin im Serum von Patienten als diagnostisches Mittel diskutiert (Li and Zhao, 2011). Dabei ist bei Patienten die Differenzierung zwischen tumorzellspezifischem L-Plastin oder L-Plastin aus Leukozyten sehr schwierig und konnte in der publizierten Studie nicht zur vollkommenen Zufriedenheit geklärt werden. Um diese aktuelle Arbeit zu kommentieren wurde auch in dieser Arbeit das Serum tumortragender Mäuse mittels eines ELISA auf humanes (aus den Tumorzellen stammendes) L-Plastin hin untersucht. Es konnte kein L-Plastin im Serum von tumortragenden Tieren nachgewiesen werden (Abbildung IV-17). Dabei ist in dem hier verwendeten Xenograft-Modell eine Verwechslung oder gleichzeitige Detektion von murinem (aus Rest-Lymphozyten) und humanem (aus Tumorzellen) L-Plastin ausgeschlossen.

Die Blockierung von L-Plastin oder auch dessen Phosphorylierung ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz. Eine Möglichkeit bietet sich in diesem Zusammenhang durch die adenovirale Verabreichung der hier verwendeten L-Plastin spezifischen shRNA. Deren Einsatz als therapeutisches Mittel könnte ein weiterer Schritt in die Zukunft sein, der jedoch noch zusätzlicher Untersuchungen bedarf. Ein zelltypspezifischer Knock-down von L-Plastin sowie eine Hemmung der Phosphorylierung würden nach den durch diese Arbeit vorliegenden Erkenntnissen die Metastasierung von Tumorzellen stark reduzieren, was sich auch positiv auf das Überleben der Patienten auswirken würde.

## VI Zusammenfassung

Die Migration und Metastasierung von Tumorzellen benötigt eine dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts. L-Plastin, ursprünglich als Leukozyten-spezifisches Protein beschrieben, bündelt F-Aktin in einer, über die Ser5-Phosphorylierung, regulierten Reaktion. Interessanterweise wurde die Expression von L-Plastin auch für nicht-hämatopoetische, maligne Tumoren beschrieben. Jedoch waren die funktionellen Konsequenzen der L-Plastin Expression und Phosphorylierung in Tumoren *in vivo* unbekannt.

Hier wurde die Funktion von L-Plastin in humanen Melanomzellen (MV3) und Prostatakarzinomzellen (PC3) untersucht. Zur Untersuchung des metastatischen Potentials der Zellen in Abhängigkeit von L-Plastin wurde ein Xenograft-Mausmodell etabliert, bei dem die Tumorzellen i.k. injiziert wurden. Die ektope Expression von L-Plastin in der L-Plastin negativen MV3 Zellen verursachte einen Anstieg der Metastasierung *in vivo*. Eine shRNA vermittelte Reduktion von endogenem L-Plastin, in L-Plastin positiven PC3 Zellen, führte zu einer reduzierten Metastasierung der Zellen *in vivo*. Zur Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung auf die Tumorzellmetastasierung wurde Wildtyp (LPL) oder mutiertes, nicht-phosphorylierbares (S5A LPL) L-Plastin in MV3 Zellen exprimiert. Dabei führte nur das phosphorylierbare, wildtypische Protein zu einer erhöhten Metastasierung der Tumorzellen *in vivo*. Die Phosphorylierung von L-Plastin verbesserte danach die einzelnen Schritte der Tumorzellmetastasierung wie die Extravasation und die Einnistung im Gewebe mit der Etablierung einer Metastase.

## VII Summary

Tumor cell migration and metastasis require dynamic rearrangements of the actin cytoskeleton. L-plastin, originally described as a leukocyte specific protein, acts as an F-actin cross-linking protein regulated by its phosphorylation on Ser5. Interestingly, L-plastin was found to be aberrantly expressed in several non-hematopoietic malignant tumors. However, the functional consequences of L-plastin expression and phosphorylation in tumors *in vivo* were unknown.

We investigated the function of L-plastin in human melanoma cells (MV3) and human prostate cancer cells (PC3). A xenograft mouse model was used to investigate the metastatic potential of the cells after i.c. injection. Ectopic expression of L-plastin in the L-plastin negative melanoma cell line MV3 caused an increase in metastasis *in vivo*. Vice versa, an shRNA mediated knock-down of endogenous L-plastin in the L-plastin positive PC3 cells led to reduced tumor cell metastasis *in vivo*. To investigate the effect of the phosphorylation state of L-plastin on tumor cell metastasis, wildtype L-plastin (LPL) or a mutated, non-phosphorylatable L-plastin protein (S5A LPL), were expressed in MV3 cells. Interestingly, only cells expressing the phosphorylatable L-plastin protein showed an enhanced metastatic activity as indicated by an increased number of tumors in the animals. These data show that the phosphorylation of L-plastin is critical for the enhanced metastatic activity of tumor cells *in vivo*, by supporting the extravasation of tumor cells and the establishment of a metastasis in a new place.

## VIII Literaturverzeichnis

- Adams, A.E., W. Shen, C.S. Lin, J. Leavitt, and P. Matsudaira. 1995. Isoform-specific complementation of the yeast *sac6* null mutation by human fimbrin. *Mol Cell Biol* 15:69-75.
- Al Tanoury, Z., E. Schaffner-Reckinger, A. Halavaty, C. Hoffmann, M. Moes, E. Hadzic, M. Catillon, M. Yatskou, and E. Friederich. 2010. Quantitative kinetic study of the actin-bundling protein L-plastin and of its impact on actin turn-over. *PLoS One* 5:e9210.
- Altmeyer, P.D., T.H.; Hartwig, R. 2010. Enzyklopädie Dermatologie. *Springer Verlag*
- Anderson, N.L., M.A. Gemmell, P.M. Coussens, S. Murao, and E. Huberman. 1985. Specific protein phosphorylation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells susceptible or resistant to induction of cell differentiation by phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Res* 45:4955-4962.
- Ang, C.S., and E.C. Nice. 2010. Targeted in-gel MRM: a hypothesis driven approach for colorectal cancer biomarker discovery in human feces. *J Proteome Res* 9:4346-4355.
- Aplin, A.E., A. Howe, S.K. Alahari, and R.L. Juliano. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263.
- Arya, M., H.R. Patel, C. McGurk, R. Tatoud, H. Klocker, J. Masters, and M. Williamson. 2004. The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *J Exp Ther Oncol* 4:291-303.
- Ayscough, K.R. 1998. In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10:102-111.
- Ayscough, K.R., and D.G. Drubin. 1996. ACTIN: general principles from studies in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:129-160.
- Bahnsen, U. 2006. Böse Brüder - In der Krebsforschung bahnt sich ein Umbruch an: Entstehen Tumoren aus Stammzellen? *Die Zeit* Nr. 48:
- Bañuelos S, S.M., Djinović Carugo K. 1998. Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. *Structure* Nov 15;6(11):1419-1431.
- Bartles, J.R. 2000. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol* 12:72-78.
- Behrens, J., K.M. Weidner, U.H. Frixen, J.H. Schipper, M. Sachs, N. Arakaki, Y. Daikuhara, and W. Birchmeier. 1991. The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. *Exs* 59:109-126.
- Blood, C.H., and B.R. Zetter. 1990. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1032:89-118.
- Böcker, W.D., H.; Heitz, PhU. 2001. Prostata. *Pathologie* 834-838.
- Bogenrieder, T., and M. Herlyn. 2003. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 22:6524-6536.
- Boldt, K., W. Rist, S.M. Weiss, A. Weith, and M.C. Lenter. 2006. FPRL-1 induces modifications of migration-associated proteins in human neutrophils. *Proteomics* 6:4790-4799.
- Bonnet, D., and J.E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730-737.
- Bretscher, A., and K. Weber. 1980. Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. *J Cell Biol* 86:335-340.

- Briganti, A., J.R. Karnes, L.F. Da Pozzo, C. Cozzarini, A. Gallina, N. Suardi, M. Bianchi, M. Freschi, C. Doglioni, F. Fazio, P. Rigatti, F. Montorsi, and M.L. Blute. 2009. Two positive nodes represent a significant cut-off value for cancer specific survival in patients with node positive prostate cancer. A new proposal based on a two-institution experience on 703 consecutive N+ patients treated with radical prostatectomy, extended pelvic lymph node dissection and adjuvant therapy. *Eur Urol* 55:261-270.
- Brooks, P.C., A.M. Montgomery, M. Rosenfeld, R.A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, and D.A. Cheresh. 1994. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-1164.
- Brooks, S.A., H.J. Lomax-Browne, T.M. Carter, C.E. Kinch, and D.M. Hall. 2010. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* 112:3-25.
- Bubendorf, L., A. Schopfer, U. Wagner, G. Sauter, H. Moch, N. Willi, T.C. Gasser, and M.J. Mihatsch. 2000. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* 31:578-583.
- Buijs, J.T., C.A. Rentsch, G. van der Horst, P.G. van Overveld, A. Wetterwald, R. Schwaninger, N.V. Henriquez, P. Ten Dijke, F. Borovecki, R. Markwalder, G.N. Thalmann, S.E. Papapoulos, R.C. Pelger, S. Vukicevic, M.G. Cecchini, C.W. Lowik, and G. van der Pluijm. 2007a. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am J Pathol* 171:1047-1057.
- Buijs, J.T., C.A. Rentsch, G. van der Horst, P.G. van Overveld, A. Wetterwald, R. Schwaninger, N.V. Henriquez, P. Ten Dijke, F. Borovecki, R. Markwalder, G.N. Thalmann, S.E. Papapoulos, R.C. Pelger, S. Vukicevic, M.G. Cecchini, C.W. Lowik, and G. van der Pluijm. 2007b. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *The American journal of pathology* 171:1047-1057.
- Burkhard, F.C., and U.E. Studer. 2009. Regional lymph node staging in prostate cancer: prognostic and therapeutic implications. *Surg Oncol* 18:213-218.
- Buzaid, A.C., and C.M. Anderson. 2000. The changing prognosis of melanoma. *Curr Oncol Rep* 2:322-328.
- Cai, T., G. Nesi, and R. Bartoletti. 2009. Re: Alberto Briganti, Umberto Capitanio, Felix K.-H. Chun, et al. Impact of surgical volume on the rate of lymph node metastases in patients undergoing radical prostatectomy and extended pelvic lymph node dissection for clinically localized prostate cancer. *Eur Urol* 2008;54:794-804. *Eur Urol* 55:e32-33; author reply e34-35.
- Calipers. <http://www.calipers.com/products/optical-imaging/ivis-imaging-system-100-series.htm>.
- Calvin, N.M., and P.C. Hanawalt. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170:2796-2801.
- Carlier, M.F., and D. Pantaloni. 1994. Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin beta 4 and profilin. *Semin Cell Biol* 5:183-191.
- Cavallaro, U., and G. Christofori. 2001. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta* 1552:39-45.
- Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2:563-572.
- Chen, H., A. Mocsai, H. Zhang, R.X. Ding, J.H. Morisaki, M. White, J.M. Rothfork, P. Heiser, E. Colucci-Guyon, C.A. Lowell, H.D. Gresham, P.M. Allen, and E.J. Brown. 2003. Role for plactin in host defense distinguishes integrin signaling from cell adhesion and spreading. *Immunity* 19:95-104.
- Cheng, D., J. Marner, and P.A. Rubenstein. 1999. Interaction in vivo and in vitro between the yeast fimbrin, SAC6P, and a polymerization-defective yeast actin (V266G and L267G). *J Biol Chem* 274:35873-35880.
- Chiang, A.C., and J. Massague. 2008. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med* 359:2814-2823.

- Christofori, G. 2006. New signals from the invasive front. *Nature* 441:444-450.
- Christofori, G., and H. Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24:73-76.
- Chu, K., C.J. Cheng, X. Ye, Y.C. Lee, A.J. Zurita, D.T. Chen, L.Y. Yu-Lee, S. Zhang, E.T. Yeh, M.C. Hu, C.J. Logothetis, and S.H. Lin. 2008. Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol Cancer Res* 6:1259-1267.
- Coffin, J.M. 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 176:143-164.
- Condeelis, J., and J.E. Segall. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 3:921-930.
- Crawford, H.C., and L.M. Matrisian. 1994. Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis* 14:234-245.
- Cunnick, G.H., W.G. Jiang, K.F. Gomez, and R.E. Mansel. 2002. Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol* 17:863-870.
- Da Pozzo, L.F., C. Cozzarini, A. Briganti, N. Suardi, A. Salonia, R. Bertini, A. Gallina, M. Bianchi, G.V. Fantini, A. Bolognesi, F. Fazio, F. Montorsi, and P. Rigatti. 2009. Long-term follow-up of patients with prostate cancer and nodal metastases treated by pelvic lymphadenectomy and radical prostatectomy: the positive impact of adjuvant radiotherapy. *Eur Urol* 55:1003-1011.
- Datta, K., M. Muders, H. Zhang, and D.J. Tindall. 2010. Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. *Future Oncol* 6:823-836.
- de Arruda MV, W.S., Lin CS, Leavitt J, Matsudaira P. 1990. Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol Sep*;111(3)::1096-1079.
- Delanote, V., B. Vanloo, M. Catillon, E. Friederich, J. Vandekerckhove, and J. Gettemans. 2010. An alpaca single-domain antibody blocks filopodia formation by obstructing L-plastin-mediated F-actin bundling. *Faseb J* 24:105-118.
- Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127-6145.
- Duffy, M.J. 1992. Inhibiting tissue invasion and metastasis as targets for cancer therapy. *Biotherapy* 4:45-52.
- Edward, M. 2001. Melanoma cell-derived factors stimulate glycosaminoglycan synthesis by fibroblasts cultured as monolayers and within contracted collagen lattices. *Br J Dermatol* 144:465-470.
- Eichinger, L., A.A. Noegel, and M. Schleicher. 1991. Domain structure in actin-binding proteins: expression and functional characterization of truncated severin. *J Cell Biol* 112:665-676.
- Eichinger, L., and M. Schleicher. 1992. Characterization of actin- and lipid-binding domains in severin, a Ca(2+)-dependent F-actin fragmenting protein. *Biochemistry* 31:4779-4787.
- Engers, R., and H.E. Gabbert. 2000. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:682-692.
- Estes, J.E., L.A. Selden, and L.C. Gershman. 1981. Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry* 20:708-712.
- Felding-Habermann, B., T.E. O'Toole, J.W. Smith, E. Fransvea, Z.M. Ruggeri, M.H. Ginsberg, P.E. Hughes, N. Pampori, S.J. Shattil, A. Saven, and B.M. Mueller. 2001. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1853-1858.
- Ferlay, J., H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D.M. Parkin. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917.
- Fidler, I.J. 2002. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 12:89-96.
- Fidler, I.J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3:453-458.

- Fink, A.M., S. Holle-Robatsch, N. Herzog, S. Mirzaei, K. Rappersberger, N. Lilgenau, W. Jurecka, and A. Steiner. 2004. Positron emission tomography is not useful in detecting metastasis in the sentinel lymph node in patients with primary malignant melanoma stage I and II. *Melanoma Res* 14:141-145.
- Foran, E., P. McWilliam, D. Kelleher, D.T. Croke, and A. Long. 2006. The leukocyte protein L-plastin induces proliferation, invasion and loss of E-cadherin expression in colon cancer cells. *Int J Cancer* 118:2098-2104.
- Freeley, M., F. O'Dowd, T. Paul, D. Kashanin, A. Davies, D. Kelleher, and A. Long. 2012. L-Plastin Regulates Polarization and Migration in Chemokine-Stimulated Human T Lymphocytes. *J Immunol*
- Friedl, P., and K. Wolf. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3:362-374.
- Friedl, P., and K. Wolf. 2008. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 68:7247-7249.
- Frixen, U.H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner, and W. Birchmeier. 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113:173-185.
- Galkin, V.E., A. Orlova, O. Cherepanova, M.C. Lebart, and E.H. Egelman. 2008. High-resolution cryo-EM structure of the F-actin-fimbrin/plastin ABD2 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1494-1498.
- Garbe, C., and D. Schadendorf. 2003. Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Onkologie* 26:241-246.
- Gershoni, J.M., and G.E. Palade. 1983. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 131:1-15.
- Gervasi, L., Mata, J.; Easley, JD.; Wilbanks, JH.; Seale-Hawkins, C.; Carlton CE. jr.; Scardino, PT. 1989. Prognostic significance of lymph nodal metastases in prostate cancer. *J Urol* Aug;142(2 Pt 1):332-336.
- Gettemans, J., Y. De Ville, J. Vandekerckhove, and E. Waelkens. 1992. Physarum actin is phosphorylated as the actin-fragmin complex at residues Thr203 and Thr202 by a specific 80 kDa kinase. *Embo J* 11:3185-3191.
- Giancotti, F.G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.
- Goldstein, D., J. Djeu, G. Latter, S. Burbeck, and J. Leavitt. 1985. Abundant synthesis of the transformation-induced protein of neoplastic human fibroblasts, plastin, in normal lymphocytes. *Cancer Res* 45:5643-5647.
- Grin-Jorgensen, C., A. Berke, and M. Grin. 1992. Ocular melanoma. *Dermatol Clin* 10:663-668.
- Gumbiner, B.M. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148:399-404.
- Gupta, G.P., and J. Massague. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-695.
- Hagi, A., H. Hirata, and H. Shinomiya. 2006. Analysis of a bacterial lipopolysaccharide-activated serine kinase that phosphorylates p65/L-plastin in macrophages. *Microbiol Immunol* 50:331-335.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
- Handschuh, G., S. Candidus, B. Luber, U. Reich, C. Schott, S. Oswald, H. Becke, P. Hutzler, W. Birchmeier, H. Hofler, and K.F. Becker. 1999. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18:4301-4312.
- Hanein, D., N. Volkmann, S. Goldsmith, A.M. Michon, W. Lehman, R. Craig, D. DeRosier, S. Almo, and P. Matsudaira. 1998. An atomic model of fimbrin binding to F-actin and its implications for filament crosslinking and regulation. *Nat Struct Biol* 5:787-792.

- Harris, L.D., J. De La Cerda, T. Tuziak, D. Rosen, L. Xiao, Y. Shen, A.L. Sabichi, B. Czerniak, and H.B. Grossman. 2008. Analysis of the expression of biomarkers in urinary bladder cancer using a tissue microarray. *Mol Carcinog* 47:678-685.
- Hartmann, H., M. Schleicher, and A.A. Noegel. 1990. Heterodimeric capping proteins constitute a highly conserved group of actin-binding proteins. *Dev Genet* 11:369-376.
- Hasselblatt, M., C. Bohm, L. Tatenhorst, V. Dinh, D. Newrzella, K. Keyvani, A. Jeibmann, H. Buerger, C.H. Rickert, and W. Paulus. 2006. Identification of novel diagnostic markers for choroid plexus tumors: a microarray-based approach. *Am J Surg Pathol* 30:66-74.
- Hauschild, A.R., F.; Lischner, S. 2003. Surgical Standards in the Primary Care of Melanoma Patients. *Onkologie* 26:218-222.
- Hautmann, S., E. Huland, and H. Huland. 1997. Intratumoral depot interleukin-2 therapy inhibits tumor growth in Dunning adenocarcinoma of the prostate implanted subcutaneously in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 123:614-618.
- Heidenreich, A., J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, M. Mason, V. Matveev, N. Mottet, H.P. Schmid, T. van der Kwast, T. Wiegel, and F. Zattoni. 2011. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol* 59:61-71.
- Helpap, B.R., H. 1998. Prostatakarzinom: Pathologie, Praxis und Klinik. *Berlin Heidelberg: Springer Verlag* 7-20.
- Henning, S.W., S.C. Meuer, and Y. Samstag. 1994. Serine phosphorylation of a 67-kDa protein in human T lymphocytes represents an accessory receptor-mediated signaling event. *J Immunol* 152:4808-4815.
- Herrmann, H., and U. Aebi. 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12:79-90.
- Hofmann, A., L. Eichinger, E. Andre, D. Rieger, and M. Schleicher. 1992. Cap100, a novel phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-regulated protein that caps actin filaments but does not nucleate actin assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 23:133-144.
- Hofmann, U.B., J.R. Westphal, E.T. Waas, A.J. Zendman, I.M. Cornelissen, D.J. Ruiter, and G.N. van Muijen. 1999. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer* 81:774-782.
- Hua, D., M.Y. Liu, Z.D. Cheng, X.J. Qin, H.M. Zhang, Y. Chen, G.J. Qin, G. Liang, J.N. Li, X.F. Han, and D.X. Liu. 2009. Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. *Mol Immunol* 46:2876-2884.
- Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17:548-558.
- Imai, K., M. Kobayashi, J. Wang, N. Shinobu, H. Yoshida, J. Hamada, M. Shindo, F. Higashino, J. Tanaka, M. Asaka, and M. Hosokawa. 1999. Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow. *Br J Haematol* 106:905-911.
- Jackson, A.L., S.R. Bartz, J. Schelter, S.V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, and P.S. Linsley. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635-637.
- Jacobs, D.B., and C. Pipho. 1983. Use of propidium iodide staining and flow cytometry to measure anti-mediated cytotoxicity: resolution of complement-sensitive and resistant target cells. *J Immunol Methods* 62:101-108.
- Janji, B., A. Giganti, V. De Corte, M. Catillon, E. Bruyneel, D. Lentz, J. Plastino, J. Gettemans, and E. Friederich. 2006. Phosphorylation on Ser5 increases the F-

- actin-binding activity of L-plastin and promotes its targeting to sites of actin assembly in cells. *J Cell Sci* 119:1947-1960.
- Janji, B., L. Vallar, Z. Al Tanoury, F. Bernardin, G. Vetter, E. Schaffner-Reckinger, G. Berchem, E. Friederich, and S. Chouaib. 2010. The actin filament cross-linker L-plastin confers resistance to TNF-alpha in MCF-7 breast cancer cells in a phosphorylation-dependent manner. *J Cell Mol Med* 14:1264-1275.
- Johnson, J.P. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18:345-357.
- Jones, S.L., and E.J. Brown. 1996. FcgammaRII-mediated adhesion and phagocytosis induce L-plastin phosphorylation in human neutrophils. *J Biol Chem* 271:14623-14630.
- Jones, S.L., J. Wang, C.W. Turck, and E.J. Brown. 1998. A role for the actin-bundling protein L-plastin in the regulation of leukocyte integrin function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9331-9336.
- Kaighn, M.E., K.S. Narayan, Y. Ohnuki, J.F. Lechner, and L.W. Jones. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16-23.
- Kaplan, R.N., B. Psaila, and D. Lyden. 2006. Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 25:521-529.
- Kaplan, R.N., R.D. Riba, S. Zacharoulis, A.H. Bramley, L. Vincent, C. Costa, D.D. MacDonald, D.K. Jin, K. Shido, S.A. Kerns, Z. Zhu, D. Hicklin, Y. Wu, J.L. Port, N. Altorki, E.R. Port, D. Ruggero, S.V. Shmelkov, K.K. Jensen, S. Rafii, and D. Lyden. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438:820-827.
- Katalinic, A., U. Kunze, and T. Schafer. 2003. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol* 149:1200-1206.
- Keely, P.J., J.K. Westwick, I.P. Whitehead, C.J. Der, and L.V. Parise. 1997. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390:632-636.
- Klein, M.G., W. Shi, U. Ramagopal, Y. Tseng, D. Wirtz, D.R. Kovar, C.J. Staiger, and S.C. Almo. 2004. Structure of the actin crosslinking core of fimbrin. *Structure* 12:999-1013.
- Klemke, M., M.T. Rafael, G.H. Wabnitz, T. Weschenfelder, M.H. Konstandin, N. Garbi, F. Autschbach, W. Hartschuh, and Y. Samstag. 2007. Phosphorylation of ectopically expressed L-plastin enhances invasiveness of human melanoma cells. *Int J Cancer* 120:2590-2599.
- Kohn, E.C., and L.A. Liotta. 1995. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res* 55:1856-1862.
- Kuniyasu, H., P. Troncoso, D. Johnston, C.D. Bucana, E. Tahara, I.J. Fidler, and C.A. Pettaway. 2000. Relative expression of type IV collagenase, E-cadherin, and vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in prostatectomy specimens distinguishes organ-confined from pathologically advanced prostate cancers. *Clin Cancer Res* 6:2295-2308.
- Langereis, J.D., B.H. Prinsen, M.G. de Sain-van der Velden, C.J. Coppens, L. Koenderman, and L.H. Ulfman. 2009. A 2D-DIGE approach to identify proteins involved in inside-out control of integrins. *J Proteome Res* 8:3824-3833.
- Lapillonne, A., O. Coue, E. Friederich, A. Nicolas, L. Del Maestro, D. Louvard, S. Robine, and X. Sastre-Garau. 2000. Expression patterns of L-plastin isoform in normal and carcinomatous breast tissues. *Anticancer Res* 20:3177-3182.
- Leavitt, J., Z.P. Chen, C.J. Lockwood, and F. Schatz. 1994. Regulation of synthesis of the transformation-induced protein, leukocyte plastin, by ovarian steroid hormones. *Cancer Res* 54:3447-3454.

- Leavitt, J., D. Goldman, C. Merrill, and T. Kakunaga. 1982. Changes in gene expression accompanying chemically-induced malignant transformation of human fibroblasts. *Carcinogenesis* 3:61-70.
- Leavitt, J., and T. Kakunaga. 1980. Expression of a variant form of actin and additional polypeptide changes following chemical-induced in vitro neoplastic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* 255:1650-1661.
- Lebart, M.C., F. Hubert, C. Boiteau, S. Venteo, C. Roustan, and Y. Benyamin. 2004. Biochemical characterization of the L-plastin-actin interaction shows a resemblance with that of alpha-actinin and allows a distinction to be made between the two actin-binding domains of the molecule. *Biochemistry* 43:2428-2437.
- Lehman, W., and R. Craig. 2004. The structure of the vertebrate striated muscle thin filament: a tribute to the contributions of Jean Hanson. *J Muscle Res Cell Motil* 25:455-466.
- Lehr, J.E., and K.J. Pienta. 1998. Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line. *J Natl Cancer Inst* 90:118-123.
- Li, C.Y., S. Shan, Q. Huang, R.D. Braun, J. Lanzen, K. Hu, P. Lin, and M.W. Dewhirst. 2000. Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* 92:143-147.
- Li, J., and R. Zhao. 2011. Expression and clinical significance of L-plastin in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Surg* 15:1982-1988.
- Lin, C.S., R.H. Aebersold, S.B. Kent, M. Varma, and J. Leavitt. 1988. Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 8:4659-4668.
- Lin, C.S., A. Lau, and T.F. Lue. 1998. Analysis and mapping of plastin phosphorylation. *DNA Cell Biol* 17:1041-1046.
- Lin, C.S., A. Lau, C.C. Yeh, C.H. Chang, and T.F. Lue. 2000. Upregulation of L-plastin gene by testosterone in breast and prostate cancer cells: identification of three cooperative androgen receptor-binding sequences. *DNA Cell Biol* 19:1-7.
- Lin, C.S., T. Park, Z.P. Chen, and J. Leavitt. 1993. Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem* 268:2781-2792.
- Lin, C.S., W. Shen, Z.P. Chen, Y.H. Tu, and P. Matsudaira. 1994. Identification of I-plastin, a human fimbrin isoform expressed in intestine and kidney. *Mol Cell Biol* 14:2457-2467.
- Lin, S.L., C.W. Chien, C.L. Han, E.S. Chen, S.H. Kao, Y.J. Chen, and F. Liao. 2010. Temporal proteomics profiling of lipid rafts in CCR6-activated T cells reveals the integration of actin cytoskeleton dynamics. *J Proteome Res* 9:283-297.
- Liotta, L.A., and W.G. Stetler-Stevenson. 1991. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51:5054s-5059s.
- Mainiero, F., C. Murgia, K.K. Wary, A.M. Curatola, A. Pepe, M. Blumemberg, J.K. Westwick, C.J. Der, and F.G. Giancotti. 1997. The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *Embo J* 16:2365-2375.
- Makrilia, N., A. Kollias, L. Manolopoulos, and K. Syrigos. 2009. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest* 27:1023-1037.
- Matsudaira, P. 1991. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem Sci* 16:87-92.
- Matsudaira, P., E. Mandelkow, W. Renner, L.K. Hesterberg, and K. Weber. 1983. Role of fimbrin and villin in determining the interfilament distances of actin bundles. *Nature* 301:209-214.
- Matsushima, K., Y. Kobayashi, T.D. Copeland, T. Akahoshi, and J.J. Oppenheim. 1987. Phosphorylation of a cytosolic 65-kDa protein induced by interleukin 1 in glucocorticoid pretreated normal human peripheral blood mononuclear leukocytes. *J Immunol* 139:3367-3374.

- Matsushima, K., M. Shiroo, H.F. Kung, and T.D. Copeland. 1988. Purification and characterization of a cytosolic 65-kilodalton phosphoprotein in human leukocytes whose phosphorylation is augmented by stimulation with interleukin 1. *Biochemistry* 27:3765-3770.
- Messier, J.M., L.M. Shaw, M. Chafel, P. Matsudaira, and A.M. Mercurio. 1993. Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages. *Cell Motil Cytoskeleton* 25:223-233.
- Michiels, F., G.G. Habets, J.C. Stam, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard. 1995. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature* 375:338-340.
- Miller, A.J., and M.C. Mihm, Jr. 2006. Melanoma. *N Engl J Med* 355:51-65.
- Molloy, T., and L.J. van 't Veer. 2008. Recent advances in metastasis research. *Curr Opin Genet Dev* 18:35-41.
- Morley, S.C. 2012. The actin-bundling protein L-plastin: a critical regulator of immune cell function. *Int J Cell Biol* 2012:935173.
- Morley, S.C., C. Wang, W.L. Lo, C.W. Lio, B.H. Zinselmeyer, M.J. Miller, E.J. Brown, and P.M. Allen. 2010. The actin-bundling protein L-plastin dissociates CCR7 proximal signaling from CCR7-induced motility. *J Immunol* 184:3628-3638.
- Nagafuchi, A., M. Takeichi, and S. Tsukita. 1991. The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65:849-857.
- Namba, Y., M. Ito, Y. Zu, K. Shigesada, and K. Maruyama. 1992. Human T cell L-plastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner. *J Biochem* 112:503-507.
- Naumov, G.N., I.C. MacDonald, A.F. Chambers, and A.C. Groom. 2001. Solitary cancer cells as a possible source of tumour dormancy? *Semin Cancer Biol* 11:271-276.
- Nguyen, T.H. 2004. Mechanisms of metastasis. *Clin Dermatol* 22:209-216.
- Nicolson, G. 1993. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 12:325-343.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144:1235-1244.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28.
- Nyberg, P., L. Xie, and R. Kalluri. 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 65:3967-3979.
- Ohsawa, K., Y. Imai, Y. Sasaki, and S. Kohsaka. 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88:844-856.
- Otsuka, M., M. Kato, T. Yoshikawa, H. Chen, E.J. Brown, Y. Masuho, M. Omata, and N. Seki. 2001. Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 289:876-881.
- Paclet, M.H., C. Davis, P. Kotsonis, J. Godovac-Zimmermann, A.W. Segal, and L.V. Dekker. 2004. N-Formyl peptide receptor subtypes in human neutrophils activate L-plastin phosphorylation through different signal transduction intermediates. *Biochem J* 377:469-477.
- Paget, S. 1889. The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* T.:571:
- Park, T., Z.P. Chen, and J. Leavitt. 1994. Activation of the leukocyte plastin gene occurs in most human cancer cells. *Cancer Res* 54:1775-1781.
- Patel, L.R., D.F. Camacho, Y. Shiozawa, K.J. Pienta, and R.S. Taichman. 2011. Mechanisms of cancer cell metastasis to the bone: a multistep process. *Future Oncol* 7:1285-1297.

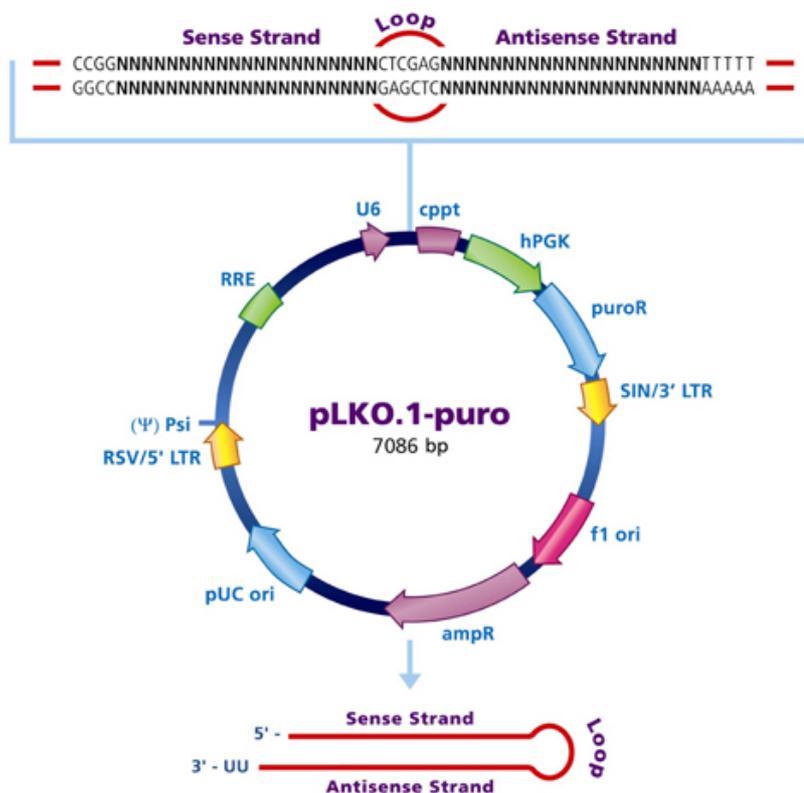
- Perl, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb, and G. Christofori. 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392:190-193.
- Pollard, T.D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol* 103:2747-2754.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465.
- Pope, B., S. Maciver, and A. Weeds. 1995. Localization of the calcium-sensitive actin monomer binding site in gelsolin to segment 4 and identification of calcium binding sites. *Biochemistry* 34:1583-1588.
- Puius, Y.A., N.M. Mahoney, and S.C. Almo. 1998. The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10:23-34.
- Rager, E.L., E.P. Bridgeford, and D.W. Ollila. 2005. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *Am Fam Physician* 72:269-276.
- Retsas, S., M. Quigley, D. Pectasides, K. Macrae, and K. Henry. 1994. Clinical and histologic involvement of regional lymph nodes in malignant melanoma. Adjuvant vindesine improves survival. *Cancer* 73:2119-2130.
- Rifkin, M.D. 1998. Prostate cancer: the diagnostic dilemma and the place of imaging in detection and staging. *World J Urol* 16:76-80.
- Robert-Koch-Institut. 2003.
- Robson, E.J., W.T. Khaled, K. Abell, and C.J. Watson. 2006. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. *Differentiation* 74:254-264.
- Rozycki, M.D., J.C. Myslik, C.E. Schutt, and U. Lindberg. 1994. Structural aspects of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6:87-95.
- Sahai, E. 2005. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15:87-96.
- Sahai, E. 2007. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 7:737-749.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Coldspring Harbor Laboratory Press Coldspring Harbor, New York*
- Schleicher, M., B. Andre, C. Andreoli, L. Eichinger, M. Haugwitz, A. Hofmann, J. Karakesisoglou, M. Stockelhuber, and A.A. Noegel. 1995. Structure/function studies on cytoskeletal proteins in Dictyostelium amoebae as a paradigm. *FEBS Lett* 369:38-42.
- Schmidt, A., and M.N. Hall. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:305-338.
- Schumacher, U., and B.S. Mitchell. 1997. Use of clinically relevant human-scid-mouse models in metastasis research. *Trends Biotechnol* 15:239-241.
- Shapiro, A.L., E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28:815-820.
- Shaw, L.M., I. Rabinovitz, H.H. Wang, A. Toker, and A.M. Mercurio. 1997. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 91:949-960.
- Shibata, M., T. Ohoka, S. Mizuno, and K. Suzuki. 1993a. Characterization of a 64-kd protein phosphorylated during chemotactic activation with IL-8 and fMLP of human polymorphonuclear leukocytes. I. Phosphorylation of a 64-kd protein and other proteins. *J Leukoc Biol* 54:1-9.
- Shibata, M., Y. Yamakawa, T. Ohoka, S. Mizuno, and K. Suzuki. 1993b. Characterization of a 64-kd protein phosphorylated during chemotactic activation with IL-8 and fMLP of human polymorphonuclear leukocytes. II. Purification and amino acid analysis of phosphorylated 64-kd protein. *J Leukoc Biol* 54:10-16.
- Shinomiya, H., A. Hagi, M. Fukuzumi, M. Mizobuchi, H. Hirata, and S. Utsumi. 1995. Complete primary structure and phosphorylation site of the 65-kDa macrophage protein phosphorylated by stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 154:3471-3478.

- Shinomiya, H., H. Hirata, and M. Nakano. 1991. Purification and characterization of the 65-kDa protein phosphorylated in murine macrophages by stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 146:3617-3625.
- Shinomiya, H., K. Nagai, H. Hirata, N. Kobayashi, H. Hasegawa, F. Liu, K. Sumita, and Y. Asano. 2003. Preparation and characterization of recombinant murine p65/L-plastin expressed in *Escherichia coli* and high-titer antibodies against the protein. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1368-1375.
- Shinomiya, H., M. Shinjo, L. Fengzhi, Y. Asano, and H. Kihara. 2007. Conformational analysis of the leukocyte-specific EF-hand protein p65/L-plastin by X-ray scattering in solution. *Biophys Chem* 131:36-42.
- Sikes, R.A., B.E. Nicholson, K.S. Koeneman, N.M. Edlund, E.A. Bissonette, M.J. Bradley, G.N. Thalmann, M.G. Cecchini, K.J. Pienta, and L.W. Chung. 2004. Cellular interactions in the tropism of prostate cancer to bone. *Int J Cancer* 110:497-503.
- Sledz, C.A., M. Holko, M.J. de Veer, R.H. Silverman, and B.R. Williams. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-839.
- Small, J.V., G. Isenberg, and J.E. Celis. 1978. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature* 272:638-639.
- Society, A.C. 2011. Global Cancer Facts and Figures 2nd Edition. *American Cancer Society*
- Soon, S.W., H.L. 1998. Predicting outcome in patients with localised melanoma. *Cutaneous melanoma* 51-56.
- Sporn, M.B. 1996. The war on cancer. *Lancet* 347:1377-1381.
- Steeg, P.S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12:895-904.
- Stetler-Stevenson, W.G., L.A. Liotta, and D.E. Kleiner, Jr. 1993. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Faseb J* 7:1434-1441.
- Sturge, J., M.P. Caley, and J. Waxman. 2011. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 8:357-368.
- Sun, H.Q., K. Kwiatkowska, and H.L. Yin. 1995. Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7:102-110.
- Taichman, R.S., C. Cooper, E.T. Keller, K.J. Pienta, N.S. Taichman, and L.K. McCauley. 2002. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62:1832-1837.
- Tan, E., S.H. Chua, J.T. Lim, and C.L. Goh. 2001. Malignant melanoma seen in a tertiary dermatological centre, Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 30:414-418.
- Tantivejkul, K., L.M. Kalikin, and K.J. Pienta. 2004. Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J Cell Biochem* 91:706-717.
- Teng, Y., M.Q. Ren, R. Cheney, S. Sharma, and J.K. Cowell. 2010. Inactivation of the WASF3 gene in prostate cancer cells leads to suppression of tumorigenicity and metastases. *Br J Cancer* 103:1066-1075.
- Thiery, J.P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442-454.
- Thies, A., S. Mauer, O. Fodstad, and U. Schumacher. 2007. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer* 96:609-616.
- Tilney, L.G., P.S. Connelly, K.A. Vranich, M.K. Shaw, and G.M. Guild. 2000. Actin filaments and microtubules play different roles during bristle elongation in *Drosophila*. *J Cell Sci* 113 ( Pt 7):1255-1265.
- Tilney, L.G., and J.C. Saunders. 1983. Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. I. Length, number, width, and distribution of stereocilia of each hair cell are related to the position of the hair cell on the cochlea. *J Cell Biol* 96:807-821.

- Todd, E.M., L.E. Deady, and S.C. Morley. 2011. The actin-bundling protein L-plastin is essential for marginal zone B cell development. *J Immunol* 187:3015-3025.
- Tse, J.C., and R. Kalluri. 2007. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 101:816-829.
- Tsuji, K., K. Yamauchi, M. Yang, P. Jiang, M. Bouvet, H. Endo, Y. Kanai, K. Yamashita, A.R. Moossa, and R.M. Hoffman. 2006. Dual-color imaging of nuclear-cytoplasmic dynamics, viability, and proliferation of cancer cells in the portal vein area. *Cancer Res* 66:303-306.
- Tsukita, S.T., S.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S. 1992. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin cell Biol*. Oct;4(5):834-9:
- Uings, I.J., and S.N. Farrow. 2000. Cell receptors and cell signalling. *Mol Pathol* 53:295-299.
- Umbas, R., J.A. Schalken, T.W. Aalders, B.S. Carter, H.F. Karthaus, H.E. Schaafsma, F.M. Debruyne, and W.B. Isaacs. 1992. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res* 52:5104-5109.
- van Muijen, G.N., K.F. Jansen, I.M. Cornelissen, D.F. Smeets, J.L. Beck, and D.J. Ruiter. 1991. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer* 48:85-91.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers, and F. van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107-119.
- Volkman, N., D. DeRosier, P. Matsudaira, and D. Hanein. 2001. An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function. *J Cell Biol* 153:947-956.
- Wabnitz, G.H., T. Kocher, P. Lohneis, C. Stober, M.H. Konstandin, B. Funk, U. Sester, M. Wilm, M. Klemke, and Y. Samstag. 2007. Costimulation induced phosphorylation of L-plastin facilitates surface transport of the T cell activation molecules CD69 and CD25. *Eur J Immunol* 37:649-662.
- Wabnitz, G.H., P. Lohneis, H. Kirchgessner, B. Jahraus, S. Gottwald, M. Konstandin, M. Klemke, and Y. Samstag. 2010. Sustained LFA-1 cluster formation in the immune synapse requires the combined activities of L-plastin and calmodulin. *Eur J Immunol* 40:2437-2449.
- Wabnitz, G.H., F. Michalke, C. Stober, H. Kirchgessner, B. Jahraus, D.J. van den Boomen, and Y. Samstag. 2011. L-plastin phosphorylation: a novel target for the immunosuppressive drug dexamethasone in primary human T cells. *Eur J Immunol* 41:3157-3169.
- Wang, C., S.C. Morley, D. Donermeyer, I. Peng, W.P. Lee, J. Devoss, D.M. Danilenko, Z. Lin, J. Zhang, J. Zhou, P.M. Allen, and E.J. Brown. 2010. Actin-bundling protein L-plastin regulates T cell activation. *J Immunol* 185:7487-7497.
- Wang, J., and E.J. Brown. 1999. Immune complex-induced integrin activation and L-plastin phosphorylation require protein kinase A. *J Biol Chem* 274:24349-24356.
- Wang, J., H. Chen, and E.J. Brown. 2001. L-plastin peptide activation of alpha(v)beta(3)-mediated adhesion requires integrin conformational change and actin filament disassembly. *J Biol Chem* 276:14474-14481.
- Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Sci Am* 275:62-70.
- Weiss, L. 1985. Mechanisms of metastatic patterns. *Principles of metastasis* Orlando, FL: Academic:
- Xu, L., Y. Ding, W.J. Catalona, X.J. Yang, W.F. Anderson, B. Jovanovic, K. Wellman, J. Killmer, X. Huang, K.A. Scheidt, R.B. Montgomery, and R.C. Bergan. 2009. MEK4 function, genistein treatment, and invasion of human prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 101:1141-1155.

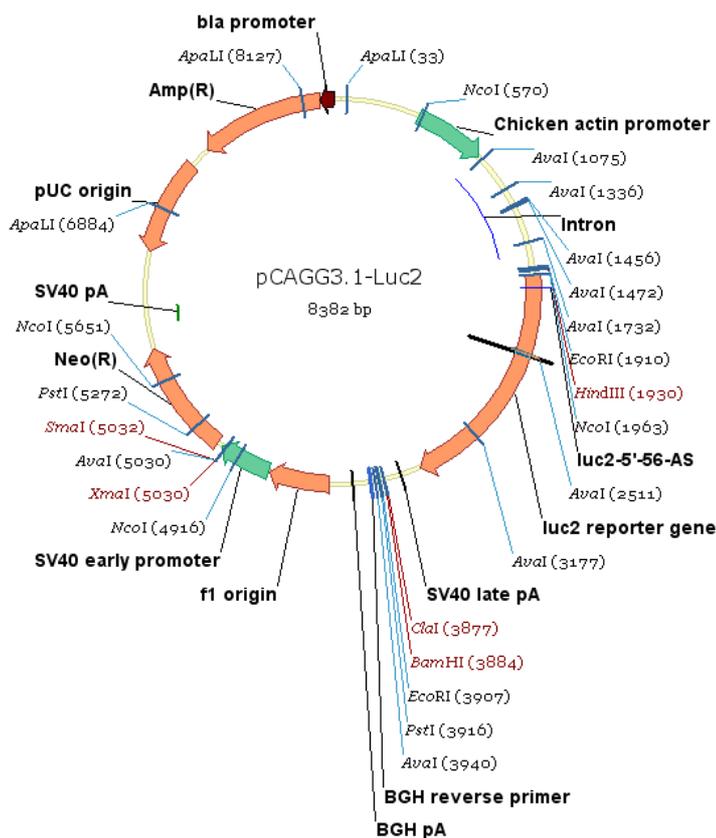
- Yilmaz, M., and G. Christofori. 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28:15-33.
- Zheng, J., N. Rudra-Ganguly, G.J. Miller, K.A. Moffatt, R.J. Cote, and P. Roy-Burman. 1997. Steroid hormone induction and expression patterns of L-plastin in normal and carcinomatous prostate tissues. *Am J Pathol* 150:2009-2018.
- Zheng, J., N. Rudra-Ganguly, W.C. Powell, and P. Roy-Burman. 1999. Suppression of prostate carcinoma cell invasion by expression of antisense L-plastin gene. *Am J Pathol* 155:115-122.

## IX Anhang

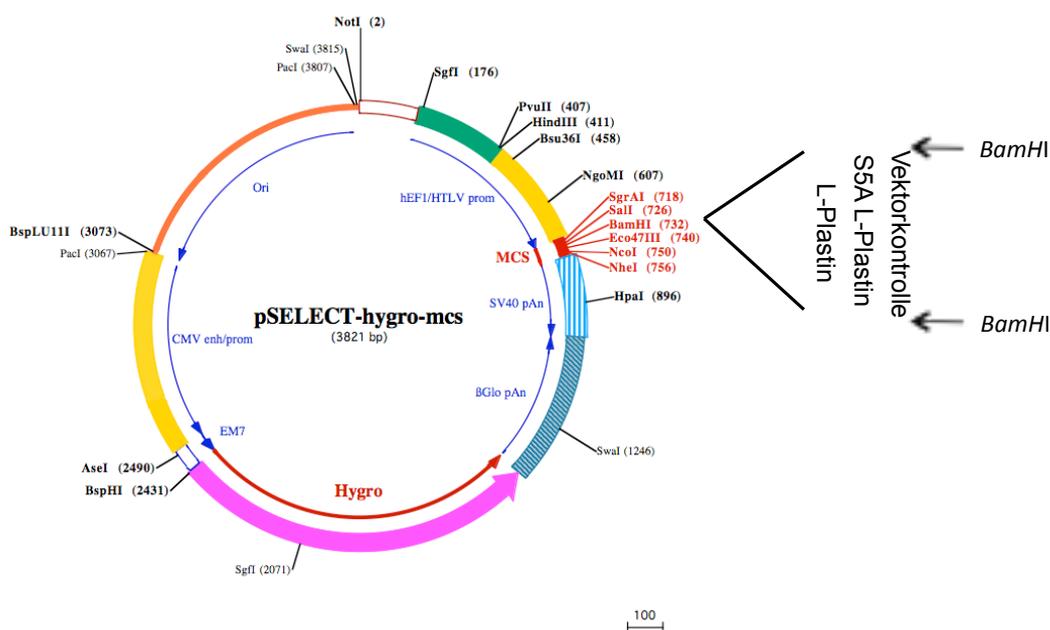


- Sequenz 1: CCGGGCGGACATTTAGGAAGTGGATCTCGAGATCCAGTTCCTAAA  
TGTCGGCTTTTTG
- Sequenz 2: CCGGCCTGGGTATAGAGTACGAGAACTCGAGTTCTCGTACTCTAT  
ACCCAGGTTTTTG
- Sequenz 3: CCGGCCAACCAGGTTCCATTAATACTACTCGAGTAGTTAATGGAACC  
TGGTTGGTTTTTG
- Sequenz 4: CCGGGTCATCAAGATTGGGTTGTTTCTCGAGAAACAACCCAATCTT  
GATGACTTTTTG
- Sequenz 5: CCGGCAGAGTAAACAAACCGCCATACTCGAGTATGGCGGTTTGT  
TACTCTGTTTTTG

**Abbildung IX-1: Vektorkarte des Vektorkonstruktes MISSION pLKO.1-puro und Sequenzen der L-Plastin shRNA Konstrukte.** Schematische Darstellung der Vektorkarte des leeren Vektorkonstruktes, welches in lentivirale Transduktions-Partikel verpackt, für die virale Transduktion der Tumorzelllinie (PC3) verwendet wurde. Des Weiteren wurden Vektorkonstrukte mit 5 unterschiedliche shRNA-Sequenzen zum RNAi-vermittelten Abbau von L-Plastin-mRNA im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt. *RSV/5' LTR*: chimäres LTR (engl. „long terminal repeat“) involviert bei Replikation und Integration; *Psi* ( $\Psi$ ): Verpackungs- und Dimerisierungs-Signal; *RRE*: Beteiligt beim Kernexport des viralen Genoms; *U6*: Polymerase III Promoter präzise Initiation und Termination der Transkription der jeweiligen shRNA Insertion; *cPPT*: Rolle bei der cDNA Synthese und Kernimport der Zielzellen; *hPGK*: Promoter des Puromycin-Resistenz-Gen; *puroR*: Puromycin-Resistenz-Gen für die stabile Selektion transduzierter Zellen; *SIN/3' LTR*: LTR involviert bei Replikation und Integration.



**Abbildung IX-2: Vektorkarte des Vektorkonstruktes pCAGG3.1-luc2.** Schematische Darstellung der Vektorkarte des Plasmids, welches das Luciferasegen enthält und zur Transfektion der Zelllinie MV3 eingesetzt wurde.



**Abbildung IX-3: Vektorkarte pSELECT-hygro-mcs.** Der Vektor enthält die Promotorsequenz hEF1/HTLV prom, ein Hygromycinresistenzgen unter Kontrolle eines CMV-Promotors, sowie die SV40 bzw.  $\beta$ -Globulin Polyadenylierungssignale. Die *Bam*HI L-Plastin/S5A L-Plastin Fragmente wurden in den mit dem gleichen Enzym geöffneten Vektor pSELECT-hygro-ms einkloniert.

## **X Danksagungen**

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Yvonne Samstag für die Bereitstellung dieses hoch interessanten Dissertationsthemas und Betreuung der experimentellen Arbeiten. Die offene und konstruktive Zusammenarbeit hat sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen. Vor allem auch für das große entgegengebrachte Vertrauen mich in einer sehr frühen Phase meiner Laufbahn mit organisations-wissenschaftlichen Aufgabenbereichen zu beauftragen und für die Möglichkeit das wissenschaftliche Arbeitsgebiet mit all seinen Facetten früh kennenzulernen. Zudem möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Immunologie, ganz Besonders jedoch den Mitarbeitern der AG Samstag, bedanken. Liebes Labor, vielen Dank für die aufschlussreichen Gespräche und Eure tolle Unterstützung und Anteilnahme! Ich möchte auch allen ehemaligen Mitgliedern des Labors danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Doktorvater Herr Prof. Dr. Manfred J. Schmitt, für die Betreuung meiner Arbeit als Vertreter der naturwissenschaftlichen-technischen Fakultät III der Universität des Saarlandes und die administrative Unterstützung. Viel entscheidender jedoch waren Ihre herzliche, engagierte Anteilnahme und Ihr Interesse. Vielen Dank für die Ratschläge und Ihr jederzeit offenes Ohr für alle Belange. Einen herzlichen Gruß auch an alle Mitarbeiter seiner Arbeitsgruppe, die mir immer das Gefühl gaben Teil des Teams zu sein.

Zusätzlich geht mein Dank an die Kooperationspartner Günther Hämmerling, Felix Lasitschka, Inaam Nackchbandi, Norman Hackl, Christine Falk, Hermann-Josef Gröne und Gabri van der Pluijm für Ihre Unterstützung und die lehrreichen Diskussionen.

Mein allerherzlichster Dank geht an meine Eltern und meine Freunde! Danke, für die nicht mit Worten ausdrückbare Unterstützung, Euer unendliches Verständnis und Eure Geduld. Euer Rückhalt hat mir all meine Kraft gegeben!

## **XI Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, Juni 2012

(Unterschrift)