

Charakterisierung von Leupaxin und seiner Interaktionspartner in Karzinomzellen

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Sandra Gräfin von Hardenberg,

geb. Beckemeyer

aus

Minden

Göttingen, 2010

Referent: Prof. Dr. Dr. W. Engel

Korreferent: Prof. Dr. S. Hoyer-Fender

Tag der Disputation : 07. Juli 2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Fachwortverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Leupaxin – Ein Mitglied der Paxillin-Proteinfamilie	1
1.2 Zur Expression und Lokalisation von LPXN	2
1.3 Zur Funktion von LPXN	4
1.4 Zur Funktion von LPXN im Prostatakarzinom	5
1.5 Ziele der Arbeit	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Chemikalien und Reagenzien	9
2.2 Biochemikalien und Enzyme	11
2.3 Gebrauchswaren	12
2.4 Sterilisationsverfahren	13
2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	13
2.6 Lösungen	14
2.7 Medien, Antibiotika, Agarplatten	17
2.7.1 Medien für Bakterien	17
2.7.2 Agarplatten	18
2.7.3 Medien für eukaryontische Zellkulturen	18
2.8 Biologisches Material	19
2.8.1 Bakterienstämme	19
2.8.2 Eukaryontische Zelllinien	19
2.8.3 Mausstämme	20
2.8.4 Synthetische Oligonukleotide	20

2.8.4.1	Synthetische DNA-Oligonukleotide	20
2.8.4.2	Synthetische RNA-Oligonukleotide	25
2.8.5	Antikörper	27
2.8.6	Plasmide und Vektoren	29
2.8.7	Verwendete Konstrukte und Plasmide	29
2.8.8	Datenbanken	30
2.9	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	30
2.9.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	30
2.9.2	Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks	31
2.9.3	Midipräparation von Plasmid-DNA	31
2.9.4	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	31
2.9.5	Phenol/Chloroform- Aufreinigung von Nukleinsäuren	32
2.9.6	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen	32
2.9.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen der Maus	32
2.9.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.10	Klonierungstechniken	33
2.10.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	33
2.10.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.10.3	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	34
2.10.4	Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.10.5	Subklonierung von PCR- und RT-PCR-Produkten	34
2.11	Gelelektrophorese	35
2.11.1	Gelelektrophorese von DNA	35
2.11.2	Gelelektrophorese von RNA	36
2.11.3	Längenstandards	36
2.12	Transfertechniken von Nukleinsäuren	37
2.12.1	Northern Blot-Analysen	37
2.12.2	Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung membrangebundener RNA	37
2.12.3	Random Prime-Markierung	37
2.12.4	Hybridisierung membrangebundener RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	38
2.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.13.1	PCR an Plasmid-DNA	39

2.13.2	Reverse Transkription	39
2.13.3	Quantitative real time PCR-Analysen	40
2.14	Sequenzanalyse	43
2.15	Proteinchemische Techniken	44
2.15.1	Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen	44
2.15.2	Isolierung von Gesamt-Protein aus Organen der Maus	44
2.15.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	45
2.15.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.15.5	Western Blot-Analysen von Proteinen auf PVDF-Membranen	46
2.15.6	Färbung von Polyacrylamidgelen	46
2.15.7	Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern	46
2.15.8	Densitometrische Auswertung	48
2.16	Aufreinigung eines TAT-Transduktionsproteins	48
2.16.1	Expression des TAT-LPXN-Fusionsproteins	48
2.16.2	Herstellung von Proteinlysaten aus Bakterien und Aufreinigung des Fusionsproteins	48
2.16.3	Transduktion des TAT-Fusionsproteins	50
2.17	Zellbiologische Methoden	50
2.17.1	Zellkultur eukaryontischer Zellen	50
2.17.2	Isolierung von Primärzellen aus murinen Prostatakarzinomen	51
2.17.3	Zellkultur eukaryontischer muriner Primärzellen	51
2.17.4	Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryontischen Zellen	52
2.17.5	Transfektion eukaryontischer Zellen	52
2.17.6	Anfertigung von Zytospin-Präparaten	53
2.17.7	Collagen-Aufreinigung aus Rattenschwänzen	53
2.18	Invasionsassay	53
2.19	Proliferationsassay	54
2.20	Assay zur Bestimmung der Adhäsion von Zellen	55
2.21	Bestimmung der Migrationsfähigkeit von Zellen	55
2.22	Herunterregulierung der Genexpression mittels RNA-Interferenz	56
2.22.1	Überblick über den Mechanismus von RNAi	57
2.22.2	Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNAs	58
2.23	Methoden zur subzellulären Lokalisierung eines Proteins	59
2.23.1	Immunzytochemische Färbung eukaryontischer Zellen	59

2.23.2	Subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen	60
2.24	Histologische Techniken	61
2.24.1	Fixierung des Gewebes	61
2.24.2	Vorbehandlung der Objektträger	61
2.24.3	Herstellung der Paraffinschnitte	62
2.24.4	Immunlokalisierung von Proteinen in Paraffingewebeschnitten	62
2.25	<i>Whole Genome</i> cDNA-Array	63
2.25.1	Vorbereitung der Gewebeproben	63
2.25.2	Isolierung der RNA	63
2.25.3	Labeling und Hybridisierung der Proben	64
2.25.4	Auswertung des Microarrays	65
2.26	Kinex TM Antikörper-Array	66
2.27	GST-Pulldown	66
2.27.1	Aufreinigung der Glutathionsepharose 4- <i>Beads</i>	66
2.27.2	GST- <i>Pulldown</i> -Experiment zum Interaktionsnachweis von Caldesmon und LPXN	67
2.27.3	GST- <i>Pulldown</i> -Experiment zum Nachweis der LPXN-abhängigen Aktivierung von RhoA und Rac	68
2.27.4	<i>In vitro</i> Aktivierung von RhoA und Rac durch GTP γ S	69
2.27.5	Regenerierung der Glutathionsepharose 4 <i>Beads</i>	69
2.28	Kastration transgener Mäuse	69
3	Ergebnisse	70
3.1	Einfluss von LPXN auf die Progression von Prostatakarzinomen in einem Mausmodell	70
3.1.1	Analyse von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen	71
3.1.1.1	Endogenes LPXN spielt keine Rolle bei der Entwicklung des TRAMP-Tumors	71
3.1.1.2	Analyse der Tumormasse doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse	72
3.1.1.3	Analyse der Morphologie der Prostatae doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse	73

3.1.1.4	Analyse zur Bildung von Fernmetastasen in doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäusen	76
3.1.2	LPXN erhöht die Progression von Prostatakarzinomen in kastrierten TRAMP-Mäusen	78
3.1.2.1	Überprüfung der Expression des transgenen SV40 T-Ag in den kastrierten Mäusen als Indiz für den Erfolg der Kastration	79
3.1.2.2	Analyse der Tumorentwicklung in kastrierten doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen	80
3.2	Einfluss von LPXN auf das Migrations- und Invasionsverhalten von primären Prostatakarzinomzellen	84
3.2.1	Etablierung einer Primärzellkultur aus Prostatatumoren doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse	84
3.2.2	LPXN erhöht das Migrations- und Invasionsverhalten von primären PCa-Zellen	86
3.3	LPXN reguliert die Expression von verschiedenen Genen	89
3.3.1	Die Expression des Zelladhäsions-Moleküls p120CTN korreliert negativ mit der LPXN-Expression	89
3.3.1.1	Überexpression von LPXN in PCa-Zelllinien korreliert mit der Expressionsabnahme von p120CTN	89
3.3.1.2	Expression von p120CTN im LPXN/TRAMP-Mausmodell	92
3.3.1.3	Expression von p120CTN in Primärzellen von LPXN/TRAMP-Tumoren	94
3.3.2	Analysen zur Funktion von p120CTN	95
3.3.2.1	Herunterregulierung von p120CTN in den PCa-Zelllinien mittels RNA-Interferenz	95
3.3.2.2	Verstärkte Migration und Invasion nach Herunterregulierung der p120CTN-Expression	97
3.3.2.3	Änderung der subzellulären Lokalisation von β -Catenin nach Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN-Expression	99
3.3.2.4	Herunterregulierung der LPXN-Expression vermindert die Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7	101
3.3.2.5	Überexpression von LPXN erhöht die Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7	102

3.3.3	<i>Whole genome expression</i> microarray zur Ermittlung von Kandidatengenen, welche durch LPXN während der Tumorprogression reguliert werden	103
3.4	Caldesmon als Interaktionspartner von LPXN	107
3.4.1	Expression von Caldesmon in PCa-Zelllinien	107
3.4.2	Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Caldesmon in den PCa-Zellen PC-3	108
3.4.3.	Subzelluläre Kolokalisation von LPXN und Caldesmon in den PCa-Zellen PC-3	109
3.4.4.	Interaktionsnachweis von LPXN und Caldesmon durch ein GST-Pulldown-Experiment	110
3.4.5	Analysen zur Funktion von Caldesmon	112
3.4.5.1	Herunterregulierung der Expression von Caldesmon in PCa-Zelllinien mittels RNA-Interferenz	112
3.4.5.2.	Verstärkte Zellmigration von PC-3 und DU 145 PCa-Zellen nach Herunterregulierung der Caldesmon-Expression	113
3.4.5.3	Caldesmon hat keinen Einfluss auf die Proliferation von PCa-Zellen	115
3.4.6	Analysen zur Expression von Caldesmon in Abhängigkeit der LPXN-Expression	116
3.4.7	Analysen zur Phosphorylierung von Caldesmon in Abhängigkeit zur LPXN-Expression	117
3.5	LPXN beeinflusst die Zelladhäsion und die Zytoskelett-Organisation	119
3.5.1	Analyse der Zelladhäsion und -organisation nach LPXN-Herunterregulierung <i>in vitro</i>	119
3.5.1.1	Verringerte Zelladhäsion und Zellzahl nach Herunterregulierung der LPXN-Expression	119
3.5.1.2	Verringerte Bildung von <i>focal adhesion sites</i> nach Herunterregulierung der LPXN-Expression	123
3.5.1.3	„Blebbing“ der Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression	125
3.5.2	Analyse der Zelladhäsion und -organisation bei LPXN Überexpression <i>ex vivo</i>	126
3.5.2.1.	Erhöhte Zelladhäsion nach Überexpression von LPXN <i>ex vivo</i>	126

3.5.2.2.	Verstärkte Bildung von <i>focal adhesion sites</i> nach LPXN-Überexpression	128
3.5.3	GST- <i>Pulldown</i> zur Analyse der Aktivität der Rho-GTPasen RhoA und Rac	129
3.5.3.1	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	129
3.5.3.2	GST- <i>Pulldown</i> mit den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen	130
3.6	Analysen zum Einfluss von LPXN auf die Phosphorylierung und Expression weiterer Gene	132
3.6.1	Durchführung eines Antikörper-Arrays	132
3.6.2	Überprüfung der Daten des Antikörper-Arrays	135
3.6.3	Analyse der TAK1-vermittelten Signalwege	136
3.6.4	Analyse der SRC-vermittelten Signalwege	139
4	Diskussion	141
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	141
4.2	Zur Bedeutung von LPXN in der Progression von Prostatakarzinomen	144
4.3	Molekulare Mechanismen der Tumorprogression	150
4.3.1	Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorprogression	151
4.3.2	Matrix-Metalloproteinasen in der Tumorprogression	155
4.3.3	Wachstumsfaktoren in der Tumorprogression	158
4.4	LPXN im Netzwerk der progressionsrelevanten Moleküle	161
4.4.1	LPXN-vermittelte Progression durch Zelladhäsionsmoleküle	161
4.4.2	LPXN-vermittelte Progression durch Caldesmon	166
4.4.3	Weitere LPXN-vermittelte Signalwege	169
4.5	Perspektiven	171
5	Zusammenfassung	175
6	Literaturverzeichnis	178

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
As	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa (ungefähr)
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
c.off	Cut off
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtri-phosphate
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigungskonstante
ggf.	gegebenenfalls
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
HE	Hematoxilin und Eosin
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPXN	Leupaxin
Luc	Luciferase
μ	micro = 10^{-6}
μ g	Microgramm
μ l	Microliter
μ m	Micrometer
μ M	Micromolar
m	milli = 10^{-3}
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mod.	modifiziert
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA = Boten-RNA
n	Anzahl
n	nano = 10^{-9}
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
p	pico = 10^{-12}
PCa (-Zelllinie)	<i>prostate carcinoma</i> = Prostatakarzinom
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Picogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur; reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Unit = definierte Enzymeinheit
UV	ultraviolettes Licht
u.a.	unter anderem
V	Volt
Vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
z.T.	zum Teil
z.B.	zum Beispiel

Fachwortverzeichnis

Englische Fachbegriffe der Molekularbiologie werden, soweit sinnvoll, auch als solche verwendet und nicht ins Deutsche übersetzt, da deutsche Ersatzwörter oftmals unwissenschaftlich klingen und nur eine Umschreibung dessen sind, was im Englischen mit einem Wort ausgedrückt werden kann. Die Bedeutung dieser Fachbegriffe wird hier nochmals aufgeführt, sofern dies nicht im Text geschieht.

Annealing	Wörtlich übersetzt: ausglühen, härten Primer-Anlagerung während der PCR
Array	Wörtlich übersetzt: Datenreihe
Assay	Wörtlich übersetzt: untersuchen, Untersuchung Test, Versuchsreihe
Blebbing	Wörtlich übersetzt: Blasenbildung, Abschnürung von Membranvesikeln
Downstream	Wörtlich übersetzt: stromabwärts In einer Kaskade: unterhalb, als nachgeschalteter Faktor Bei einem Gen: weiter 3' gelegen
Elongation	Wörtlich übersetzt: Verlängerung Hier: DNA-Strang-Verlängerung während der PCR
Focal adhesion site(s)	Wörtlich übersetzt: fokale Adhäsionsstelle(n) Dies sind Bereiche der Zellmembran, die über Integrin- cluster mit der ECM interagieren.
Full length	Wörtlich übersetzt: Volle Länge Hier: das gesamte Protein oder kompletten kodierenden Bereich einer cDNA betreffend

Gleason Score	Klassifizierungssystem für die verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms
Housekeeping	Wörtlich übersetzt: Haushalt Ein housekeeping-Gen ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, das in allen Zellen essentiell ist.
In frame	Wörtlich übersetzt: im Rahmen Bei der Herstellung eines Fusionsproteins muss darauf geachtet werden, dass bei der Klonierung der nachgeschalteten cDNA der Leserahmen der vorgeschalteten cDNA eingehalten wird.
In vitro	Wörtlich übersetzt: im Glas, organische Vorgänge, die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden
In vivo	Wörtlich übersetzt: im Lebendigen, Prozesse, die im lebenden Organismus stattfinden
Primer	Oligonukleotid von 20-35 Basenpaaren, welches von Polymerasen als Starthilfe zum Ansynthetisieren weiterer Nukleotide genutzt wird.
Proofreading	Wörtlich übersetzt: Korrekturlesen Polymerasen mit einer Proofreading-Aktivität sind in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide über ihre 3'-5'-Exonuklease-Aktivität zu entfernen.
Real time	Wörtlich übersetzt: Echtzeit Während der PCR kann die Zunahme der Amplifikate auf einem Monitor in Echtzeit verfolgt werden
Sandwich	Wörtlich übersetzt: belegtes Brot Hier: Art des Aufbaus beim Western und Northern Blot-Transfer. Die Membran wird zwischen Whatman-Papier + Gel und Whatman-Papier gelegt.

Screening	Wörtlich übersetzt: (durch)sieben, untersuchen Hier: Durchsuchen einer Bibliothek nach bestimmten Proteinen und Genen
Tag	Wörtlich übersetzt: Anhänger, Kennzeichen
Template	Wörtlich übersetzt: Schablone, Vorlage, Matrize Hier: RNA oder DNA, die während einer PCR amplifiziert werden soll
Upstream	Wörtlich übersetzt: stromaufwärts In einer Kaskade: oberhalb, als vorgeschalteter Faktor Bei einem Gen: weiter 5'-gelegen
Yeast-2-Hybrid-System	Hefesystem, um Proteine nachzuweisen, die an ein bestimmtes Protein, das untersucht werden soll, binden

1 Einleitung

1.1 Leupaxin – Ein Mitglied der Paxillin-Proteinfamilie

Leupaxin (LPXN) wurde erstmals 1998 von Lipsky *et al.* beschrieben und auf Grund seiner ausgeprägten Homologie zu dem *focal adhesion*-Protein Paxillin der Paxillin-Proteinfamilie zugeordnet. Dieser Proteinfamilie gehört auch das *androgen receptor-associated protein 55* (ARA55) an. Die wichtigsten gemeinsamen Merkmale aller Mitglieder der Paxillin-Proteinfamilie sind die einheitliche Struktur ihrer LD-Motive und LIM-Domänen sowie die subzelluläre Lokalisation an den *focal adhesion sites*. Die vier (ARA55 und Leupaxin) bzw. fünf (Paxillin) LD-Motive in der N-terminalen Hälfte der Proteine bestehen aus kurzen konservierten Leucin-reichen Aminosäuresequenzen, welche ein invariantes Leucin(L)-Aspartat(D)-Paar enthalten. Die vier LIM-(Lin-11; Isl-1 und Mec-3)-Domänen am Carboxy-terminalen Ende der Proteine bestehen aus jeweils ca. 50 Aminosäuren und enthalten konservierte Cysteine, Histidine und Aspartate, welche zusammen Zink-bindende Module bilden [Kosa *et al.*, 1994; Michelsen *et al.*, 1994; Perez-Alvarado *et al.*, 1994] (Abb. 1.1).

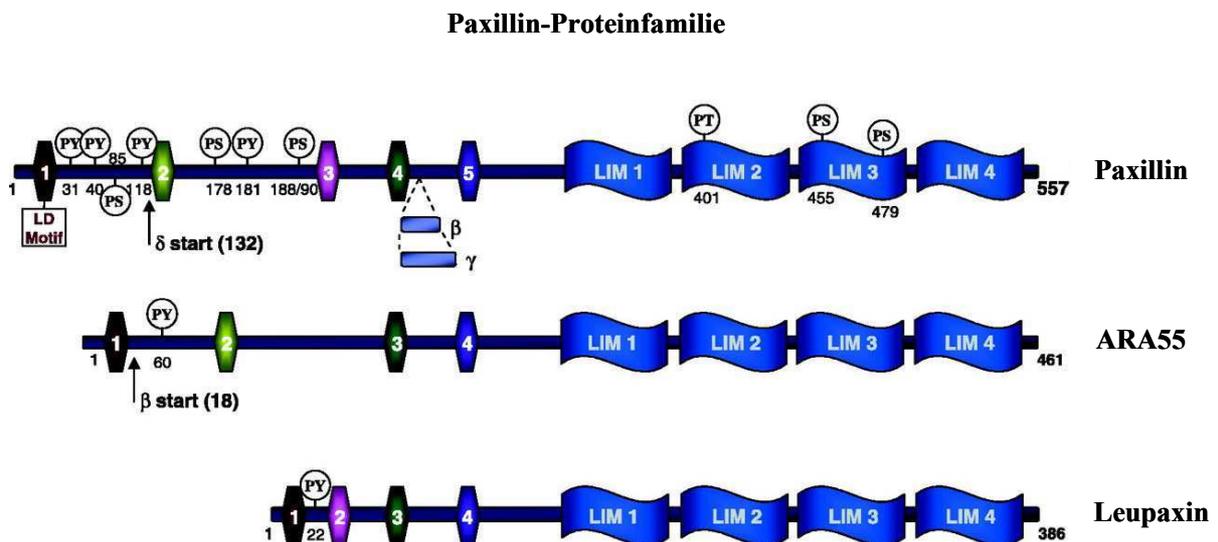


Abb. 1.1: Darstellung der Domänenstruktur der Mitglieder der Paxillin-Proteinfamilie Paxillin, ARA55 und Leupaxin (modifiziert nach Brown *et al.* [2004]). Paxillin, ARA55 und Leupaxin bestehen aus jeweils vier LIM-Domänen und vier (ARA55 und Leupaxin) bzw. fünf (Paxillin) LD-Motiven. Sowohl die LIM-

Domänen als auch die LD-Motive vermitteln die Interaktion mit verschiedenen Proteinen. Die LIM-Domänen sind zusätzlich für die Lokalisation der Proteine an den *focal adhesion sites* verantwortlich. Die Größe der Proteine variiert zwischen 386 (Leupaxin) und 557 (Paxillin) Aminosäuren. Einige Aminosäuren (PY = Thyrosinrest, PS = Serinrest, PT = Threoninrest) der Mitglieder der Paxillin-Proteinfamilie können phosphoryliert werden. Die Zahlen beschreiben die Aminosäureposition der phosphorylierten Aminosäuren.

Für Paxillin konnte gezeigt werden, dass sowohl die LD-Motive als auch die LIM-Domänen für die Interaktion mit Proteinen von Bedeutung sind [Brown *et al.*, 1998; Dawid *et al.*, 1998], und dass die LIM-Domänen zusätzlich für die Lokalisation von Paxillin an den *focal adhesion sites* verantwortlich sind [Brown *et al.*, 1996]. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen die Mitglieder der Paxillin-Proteinfamilie wichtige Plattformen zur Koordination von Signalwegen an den *focal adhesion sites* dar. Die *focal adhesion sites* sind dynamische Proteinkomplexe, die das Zytoskelett der Zelle mechanisch mit der extrazellulären Matrix (ECM) verankern und so im ständigen Informationsaustausch mit der Umgebung stehen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Paxillin mit der *focal adhesion kinase* FAK interagiert und diese Interaktion von der Adhäsion der Zellen an die ECM abhängig ist [Hildebrand *et al.*, 1995]. Weiterhin wurde die Assoziation von Paxillin und FAK im direkten Zusammenhang mit der Karzinogenese beschrieben, wobei ein Einfluss auf die Progression und Invasion von Prostatakarzinomen (PCa) nachgewiesen werden konnte [Tremblay *et al.*, 1996].

1.2 Zur Expression und Lokalisation von LPXN

LPXN wurde zunächst als zytoplasmatisches Protein beschrieben, welches hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird [Lipsky *et al.*, 1998]. Erst 2007 konnten Sahu *et al.* erste Hinweise auf die Expression von LPXN in der PCa-Zelllinie PC-3 erhalten. In unserer Arbeitsgruppe wurde LPXN zum gleichen Zeitpunkt im Rahmen der biologischen Dissertation von Frau Dr. Kaulfuß auf dessen Expression im humanen PCa untersucht. Dabei konnte durch immunhistochemische Analysen an humanen PCa-Präparaten in 22% der Fälle eine zumeist fokale Expression von LPXN ausschließlich im Epithel des Karzinoms detektiert werden. Die Expression von LPXN korrelierte dabei direkt mit dem Gleason-Muster der LPXN-positiven Tumorbereiche sowie mit dem Gleason-Score des gesamten PCa [Kaulfuß *et al.*, 2008]. Diese Korrelation deutet darauf hin, dass LPXN an der Progression von PCa beteiligt ist. Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der Expressionsanalyse

von LPXN in den etablierten PCa-Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU 145 unterstützt. Mittels Western Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass LPXN in den invasiven und androgen-unabhängigen PC-3- und DU 145-Zellen sechs- bzw. zweifach stärker exprimiert wird als in den nicht invasiven und androgen-abhängigen LNCaP-Zellen [Kaulfuß *et al.*, 2008].

Die subzelluläre Lokalisation von LPXN in Leukozyten wurde von Lipsky *et al.* als eine diffuse Verteilung im Zytoplasma beschrieben [1998]. In Osteoklasten hingegen konnte eine Lokalisation von LPXN an den Podosomen beobachtet werden [Gupta *et al.*, 2003, Sahu *et al.*, 2007]. Im Rahmen der biologischen Dissertation von Frau Dr. Kaulfuß wurde die subzelluläre Lokalisation von LPXN in den PC-3-Zellen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass LPXN an den für die Mitglieder der Paxillin-Proteinfamilie typischen *focal adhesion sites* lokalisiert, wobei zusätzlich in 1-3% der Zellen eine Kernlokalisation beobachtet werden konnte (Abb. 1.2). Es konnte gezeigt werden, dass der Transport von LPXN aus dem Kern durch ein Kernexportsignal vermittelt wird, welches im Bereich des LD3- bzw. LD4-Motivs liegt [2008]. Die Lokalisation von LPXN sowohl an den *focal adhesion sites* als auch im Kern konnte ebenfalls von Sundberg-Smith *et al.* in glatten Muskelzellen beobachtet werden [2008].

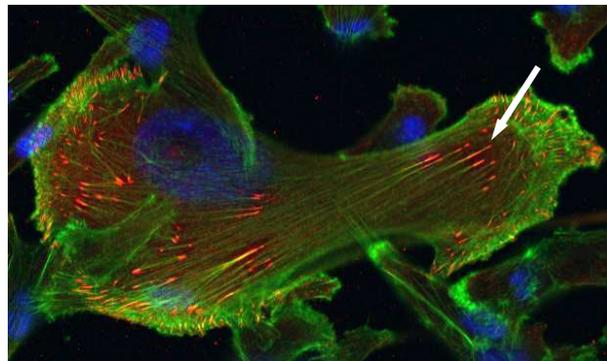


Abb. 1.2: Subzelluläre Lokalisation von LPXN in der PCa-Zelllinie LNCaP (aus vorliegender Arbeit). LNCaP-Zellen wurden auf Fibronektin-beschichteten Glasobjektträgern ausgeplattiert und für mind. 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem LPXN-spezifischen Antikörper angefärbt. Zur Visualisierung des Zytoskeletts wurde FITC-Phalloidin verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Die Überlagerung zeigt eine deutliche Lokalisation von LPXN an den *focal adhesion sites* (Pfeil). Die Aufnahme erfolgte mit einem Laserscanning-Mikroskop bei 600facher Vergrößerung.

1.3 Zur Funktion von LPXN

Über die Funktion von LPXN gibt es bisher nur wenige und z.T. kontroverse Ergebnisse. Es ist bekannt, dass LPXN in Lymphozyten mit dem FAK-Familienmitglied PYK2 einen Komplex formt, wodurch Zellfunktionen wie Motilität, Ausbreitung und Apoptose vermittelt werden können [Lipsky *et al.*, 1998]. Weiterhin konnte in Osteoklasten eine Assoziation von LPXN mit der Tyrosinkinase SRC nachgewiesen werden. In diesen Zellen beeinflusst LPXN die Migrations- und Resorptionsfähigkeit und stellt ein wichtiges Adapterprotein bei der Bildung von Adhäsionszonen dar [Gupta *et al.*, 2003]. In B-Zellen interagiert LPXN nach Induktion des B-Zell-Antigenrezeptors (BCR) mit der SRC-Tyrosinkinase LYN, was zur Phosphorylierung von LPXN und anschließend zur Inhibierung des BCR-vermittelten Signalweges führt [Chew *et al.*, 2007]. In neueren Studien wurde von Sundberg-Smith *et al.* [2008] gezeigt, dass LPXN in glatten Muskelzellen mit FAK einen Komplex bildet, und dass eine erhöhte FAK-Expression eine Akkumulation von LPXN im Kern bewirkt. Im Kern fungiert LPXN als Kofaktor von SRF (*serum response factor*). Da die Bindung von SRF an konservierte Promotor-Elemente für die Expression von vielen Differenzierungs-Markergenen in glatten Muskelzellen verantwortlich ist, wird LPXN als Aktivator der Muskelzellendifferenzierung beschrieben. 2009 wurde LPXN in einem AML (Akute Myeloische Leukämie) -Patienten mit der Translokation t(11;21)(q12q22) als RUNX1-Fusionsprotein beschrieben. Das Fusionsprotein RUNX1/LPXN sowie das Wildtyp RUNX1-Protein sind im Kern der hämatopoetischen Zellen lokalisiert. Dort konkurrieren beide Proteine um die Bindungsstelle am CSF1R (*colony stimulating factor 1 receptor*)-Promotor. Bindet das Fusionsprotein an dem CSF1R-Promotor, kommt es zu einer Hemmung der Transkription und somit zu einer gestörten Proliferation und Differenzierung der Zellen [Dai *et al.*, 2009]. Weiterhin konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass sich aus NIH3T3-Zellen, die stabil mit pEGFP-N1-RUNX1/LPXN bzw. pEGFP-N1-LPXN transfiziert wurden und anschließend subkutan in BALB/c-Nacktmäuse injiziert wurden, nach 28 Tagen ein Karzinom entwickelte [Dai *et al.*, 2009].

1.4 Zur Funktion von LPXN im Prostatakarzinom

Sahu *et al.* konnten 2007 eine Interaktion von LPXN mit den Tyrosin-Kinasen PYK2 und c-SRC sowie der Phosphatase PTP-PEST in PC-3-Zellen demonstrieren. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass als funktionelle Konsequenz aus dieser Komplexbildung eine erhöhte Zellmigration resultiert.

Gleichzeitig wurde im Rahmen der biologischen Dissertation von Frau Dr. Kaulfuß der Einfluss von LPXN auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von PCa-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die androgen-abhängigen LNCaP-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression eine veränderte Morphologie aufweisen, sich vom Kulturboden ablösen und apoptotisch werden. In den androgen-unabhängigen PC-3- und DU 145-Zellen konnten eine um 78% verringerte Invasivität sowie eine deutlich reduzierte Migrationsfähigkeit festgestellt werden. Während meiner Diplomarbeit konnte nach Überexpression von LPXN eine erhöhte Migrations- sowie Invasionsfähigkeit der PC-3-Zellen demonstriert werden [Beckemeyer, 2007]. Die Proliferation von PC-3- und DU 145-Zellen wird durch die Expressionsstärke von LPXN nicht beeinflusst. Dabei bleibt die Frage offen, welche Auswirkungen eine erhöhte LPXN-Expression auf das Wachstum von PCa *in vivo* ausübt.

Um zu verstehen, welche Signalwege beim Verlust der adhäsiven und invasiven Eigenschaften nach Herunterregulierung der Leupaxin-Expression eine Rolle spielen, wurde in unserer Arbeitsgruppe von Frau Dr. Kaulfuß ein Zelladhäsions-Array durchgeführt. Auf dem Array waren 96 cDNAs von bekannten Genen aufgespottet, die in Invasion, Adhäsion und Apoptose involviert sind. Es konnte dabei für das Zelladhäsionsmolekül p120Catenin (p120CTN) gezeigt werden, dass es bei verminderter LPXN-Expression in PCa-Zellen stärker exprimiert wird als in den entsprechenden Kontrollzellen. Weiterhin konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Zunahme der LPXN-Expression direkt mit der Herunterregulierung der p120CTN-Expression korreliert [Kaulfuß *et al.*, 2009]. p120CTN gehört zur Familie der p120-Catenine, die in Zell-Zell- und Zellmatrix-Interaktionen involviert sind. Kallakury *et al.* [2001a, b] konnten zeigen, dass beim PCa in fast 50% der untersuchten Fälle ein Expressionsverlust von p120CTN eintritt. Der Expressionsverlust korreliert dabei signifikant mit dem Gleason Score und dem Tumorstadium. Es stellte sich daher die Frage, ob p120CTN als Vermittler der LPXN-induzierten Eigenschaften fungieren kann.

In unserer Arbeitsgruppe konnten verschiedene Interaktionspartner von LPXN identifiziert werden, die zusätzliche Hinweise auf die Rolle von LPXN in der Karzinogenese geben. Es konnte gezeigt werden, dass LPXN über seine LIM-Domänen mit dem Androgenrezeptor (AR) interagiert und zudem in Anwesenheit des Liganden DHT (Dihydrotestosteron) seine transkriptionelle Aktivität erhöht. Der AR spielt bei der Progression von PCa eine wichtige Rolle, da er ein unkontrolliertes Wachstum der PCa-Zellen auslösen kann [Stanbrough *et al.*, 2001, Han *et al.*, 2005]. Dabei wird er vor allem im Zusammenhang mit der Entwicklung des androgen-abhängigen zum androgen-unabhängigen PCa beschrieben [Chen *et al.*, 2004; Edwards und Bartlett, 2005]. Darüber hinaus konnte eine liganden-unabhängige Interaktion mit dem Glukokortikoidrezeptor, dem Progesteronrezeptor sowie den Östrogenrezeptoren α und β nachgewiesen werden [Herr, 2005; Kaulfuß, 2006].

Durch ein *Screening* einer Prostata-cDNA-Bibliothek mittels eines Yeast-2-Hybrid-Systems konnten die Aktin-bindenden Proteine Transgelin und Caldesmon als Interaktionspartner von LPXN identifiziert werden [Beckemeyer, 2007]. Shields *et al.* [2002] konnten zeigen, dass die Expression von Transgelin, auch bekannt als SM22 α , im Mammakarzinom herunterreguliert ist, und dass dieser Expressionsverlust in Brust- und Darmkrebs mit der Progression des Tumors korreliert. Für Caldesmon wurde nachgewiesen, dass es die Invasionsfähigkeit von Brust- und Darmkrebszellen durch die Regulation der Podosomen- und Invadopodien-Bildung verringert [Yoshio *et al.*, 2007]. Außerdem reguliert Caldesmon die Proliferation und Migration von vaskulären, glatten Muskelzellen [Yokouchi *et al.*, 2006]. Diese Eigenschaften führten zu der Frage, ob die Veränderungen der PCa-Zellen nach einer deregulierten LPXN-Expression durch die Interaktion zwischen LPXN und Caldesmon vermittelt werden können.

Die einzigen *in vivo*-Experimente zur Aufklärung der Funktionsweise von LPXN wurden bisher in einem Mausmodell durchgeführt, welches Prostata-spezifisch LPXN überexprimiert [Kaulfuß, 2006]. Durch histologische Analysen der Prostatae von diesen transgenen Mäusen, die bis zu zwei Jahre alt waren, wurde demonstriert, dass die Überexpression von LPXN keine morphologische Veränderung des Prostataepithels bewirkt. Dieses Ergebnis konnte an einer weiteren unabhängigen transgenen LPXN-Mauslinie bestätigt werden [Kaulfuß *et al.*, 2009]. Die Analysen unterstützen die Annahme, dass LPXN kein Initiator der Tumorbildung in der Prostata ist, sondern vielmehr die Progression von bestehenden Tumoren beschleunigen könnte.

1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollte aufbauend auf vorangegangene Arbeiten der Einfluss von LPXN auf das Progressionsverhalten von PCa-Zellen analysiert werden. Weiterhin sollten verschiedene Hypothesen, auf welche Weise LPXN die Progression des PCa vermitteln könnte, überprüft werden. Die einzelnen Ziele waren:

- Analyse zum Einfluss von LPXN auf die Progression von bestehenden TRAMP-Tumoren
 - Histopathologische Analysen der Prostatae sowie verschiedener Organe doppelt transgener LPXN/TRAMP- und Kontrollmäuse im Alter zwischen 6 und 30 Wochen
 - Analyse der Tumorentwicklung einschließlich der Metastasenbildung in kastrierten, doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen verschiedenen Alters mit Hilfe histopathologischer Verfahren
 - Etablierung und Charakterisierung einer Primärzellkultur aus Prostatatumoren doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse
 - Untersuchung des Einflusses von LPXN auf das Migrations- und Invasionsverhalten der etablierten murinen Primärzellen
- Analyse des Einflusses von LPXN auf die Regulation verschiedener Gene
 - Untersuchung der Expression von p120CTN in LPXN/TRAMP-Tumoren und in den isolierten murinen Primärzellen
 - Herunterregulierung der Expression von p120CTN in den PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145
 - Untersuchung des Migrations- und Invasionsverhaltens von PC-3-Zellen nach Herunterregulierung der p120CTN-Expression sowie der simultanen Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression
 - Analyse der Lokalisation von β -Catenin sowie der Expression von β -Catenin-Zielgenen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression
 - Identifizierung von Kandidatengenen, die durch LPXN während der Tumorprogression reguliert werden mit Hilfe von *whole genome microarrays* an Tumormaterial

-
- Untersuchung der Expression, Lokalisation und Funktion des LPXN-Interaktionspartners Caldesmon
 - Analyse des Einflusses von Caldesmon auf die Migration und Proliferation von PCa-Zellen
 - Analysen zur Expression und Phosphorylierung von Caldesmon in Abhängigkeit zur LPXN-Expression
 - Untersuchung des Einflusses von LPXN auf die Adhäsion von PCa-Zellen
 - Analyse der Bildung von *focal adhesion sites* in Abhängigkeit von der LPXN-Expression
 - Untersuchung der Morphologie der Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression
 - Identifizierung von Signalwegen, in die LPXN involviert ist
 - *GST-Pulldown* zur Analyse der Aktivität der RhoGTPasen RhoA und Rac in PCa-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression
 - Durchführung eines Antikörper-Arrays zur Analyse des Einflusses von LPXN auf die Phosphorylierung und Expression weiterer Gene

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Substanzen, die nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 40% (29:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Aminosäuren	Biomol, Hamburg
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Adenosintriphosphat (ATP)	Biomol GmbH, Hamburg
Bacto-Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Baker, Deventer, NL
Dexamethason	Sigma-Aldrich, , Taufkirchen
Dimethyldicarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
dNTPs (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Entwickler	Kodak, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	ICN, Aurora, USA
Ethylenglycol-bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fixierer	Kodak, Darmstadt
FuGene HD	Roche Mannheim
G418	Merck, Darmstadt
Glukose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES buffered saline (HBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hygromycin	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
NuPAGE™ MES Running buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE™ LDS Sample buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
Orange-G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	PAN, Aidenbach
Phenol	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
p-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid (PNP- α -Gal)	MP Biomedicals, Eschwege
RNase-Inhibitor	MBI, St. Leon-Rot
RNA-Längenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Roti®Fect	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-Nanoquant	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Simply Blue Safe Stain	Invitrogen, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Deisenhofen
Tween 20	Merck, Darmstadt
VectaShield mit DAPI	VectorLab, Burlingame, USA
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl α -D-galactopyranosid (X- α -Gal)	Biomol, Hamburg
Zellkulturmedien	PAN, Aidenbach

2.2 Biochemikalien und Enzyme

Biochemikalien	Hersteller
Albumin Fraktion V	Biomol, Hamburg
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biocoll Lösung	Biochrom AG, Berlin, Germany
Complete Mini	Roche, Mannheim
Direct PCR Lyse Reagenz	Peqlab, Erlangen
DNase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (SeraPlus)	PAN, Aidenbach
Mango <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Medium 199	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
NuSerum TM	BD Bioscience, San Jose, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Pfu</i> Ultra-HF-DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
PhosSTOP	Roche, Invitrogen
Platinum- <i>Taq</i> -DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase SuperScript II	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A	Invitrogen, Karlsruhe
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Biozym, Hess. Oldendorf
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim

2.3 Gebrauchswaren

Nicht aufgeführte Gebrauchswaren wurden von den Firmen Schütt und Omnilab-Krannich (Göttingen), sowie Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Gebrauchswaren	Hersteller
6-, 12- oder 24well-Zellkultur-Platten	Corning Inc., New York, (USA)
384well-Platten, weiß	ABgene, Hamburg
flachbödige 96well-Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Blottingpapier GB 002, 003, 004	Schleicher & Schüll, Dassel
CentriSart I	Sartorius, Göttingen
FALCON culture slides	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
PVDF-Transfer Membran	GE Healthcare, München
Einmalfilter Minisart	Sartorius, Göttingen
NML (Porengröße 0,20 und 0,45 µm) Filterpapier 0858	Schleicher & Schüll, Dassel
NuPage™ 4-12% Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Hybond™ C Membran extra	GE Healthcare, München
Membranfilter	Millipore, Molsheim
Petrischalen	Greiner Nunc., Nürtingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Quarz-Küvetten	Hellma, Mühlheim
Röntgenfilme (CL-XPosure™Film, Clear Blue X-Ray Film)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Objektträger Superfrost®Plus	Schütt, Göttingen
Wundklammern (7,5x 1,75 mm)	Braun, Tuttlingen
4-Well-Slides	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
100ml Plastikflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Greiner Nunc., Nürtingen

2.4 Sterilisationsverfahren

Gebrauchswaren, Lösungen und Kulturmedien wurden über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert oder bei 121°C und 1,5 Bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert (0,2 µm). Wässrige Lösungen für RNA-Präparationen und RNA-Analysen wurden mit 1% (v/v) Dimethyldicarbonat versetzt, für 12 - 24 h bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert.

2.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
DirectPCR tail reagent	Peqlab, Erlangen
ECL Plus	GE Healthcare, München
Proliferationsassay (Cell Titer 96®AQ _{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay)	Promega, Mannheim
Matrigel Invasionsassay	Becton Dickinson, Bedford, MA
Matrigel Migrationsassay	Millipore, Morsheim
Micro Spin™-S200 HR Säulen	GE Healthcare, München
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices	Millipore, Schwalbach
OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit Nucleobond AX100	Macherey & Nagel, Düren
Plasmid Midi Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum ^(R) SYBR ^(R) -Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin ^(R) Extract II	Macherey & Nagel, Düren
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen
Tri-Reagent™	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.6 Lösungen

Für den routinemäßigen Gebrauch vorgesehene Lösungen wurden nach Sambrook *et al.*, [1989] angesetzt. Die dazu benötigten Chemikalien wurden in bidestilliertem oder DEPC-behandeltem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert (0,2 µm).

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Alkalische-Phosphatase-Färbelösung	45 µl NBT (75 mg/ml in DMF) 35 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) in 10 ml AP-Puffer
AP-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl pH 9.5
Blockpuffer I (Western Blot)	1x PBS 2-5% Magermilchpulver
Blockpuffer II (Western Blot)	1x TBS/0,1% Tween 20 5% Magermilchpulver
Blockpuffer III (Immunhistochemie)	1x PBS 3% BSA
Coomassie-Lösung	30% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R250
Formalin für Mausorgane	12 mM H ₂ NaO ₄ P 55 mM HNa ₂ O ₄ P 10% Formaldehyd (37%ig)
Kaliumphosphat (1M)	0,17 M KH ₂ PO ₄ 0,72 M K ₂ HPO ₄
Lysispuffer I (für Proteine (Zellkultur))	150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 % NP-40 0,25% Natriumdeoxycholat 1 Tab/10 ml Complete Mini 1 Tab/10 ml PhosSTOP

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
Lysispuffer II (Glycerol-Lysis-Puffer)	25 mM Tris/HCL pH 7.5 100 mM NaCl 1% NP-40 5 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 5% Glycerol 1 mM DTT 1 Tab/10 ml Complete Mini 1 Tab/10 ml PhosSTOP
Lysispuffer III (Pierce)	25 mM Tris/HCL pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1% NP-40 5% Glycerol
Lysispuffer für Bakterienpellets	100 mM Tris/HCL 1 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,2% Triton X-100 0,1% Tween 20 8% Glycerol 250 mM Urea 0,1 mM DTT Pepstatin A (1 µg/ml) Leupeptin (1 µg/ml) Aprotinin (1 µg/ml) 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM NaF 1 mM PMSF
Lysispuffer für Organe	1% TritonX-100 150 mM HEPES 1 mM EDTA 1 Tab/10 ml Complete Mini
Lysispuffer für Kinexus Antikörper-Array	20 mM MOPS pH 7.0 2 mM EGTA 5 mM EDTA 30 mM NaF 60 mM β-Glycerolphosphat 20 mM Natrium-Pyrophosphat

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
	1 mM Natrium-Orthovanadat 1 Tab/10 ml Complete Mini 1% TritonX-100 1 mM DTT
MOPS-Puffer (10x)	50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA 200 mM MOPS (pH 7.0)
Narkosemittel für Mäuse	65 mg/kg Körpergewicht Ketamin 13 mg/kg Körpergewicht Xylazin
P1 Puffer (Plasmid-Minipräparation)	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
P2 Puffer (Plasmid-Minipräparation)	200 mM NaOH, 1% SDS
P3 Puffer (Plasmid-Minipräparation)	3 M Natriumacetat (pH 5.5)
Probenpuffer für RNA	75 µl Formaldehyd (37%ig) 45 µl 10x MPOS 180 µl Formamid (99%ig)
10x PBS	1,37 M NaCl 81 mM Na ₂ HPO ₄ 27 mM KCl 14,7 mM KH ₂ PO ₄
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6.8 0,4% SDS
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7.0 mit NaOH
Stop-Mix I	95% Formamid 20 mM EDTA 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol
Stop-Mix II	15% Ficoll 400 200 mM EDTA 0,1% Orange G
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, pH 8.3 0,05 M EDTA
TBE-Puffer (5x)	445 mM Tris/HCl, pH 8.0 445 mM Borsäure 10 mM EDTA

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
10x TBS	1,37 M NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 7.6
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris pH 8.3 150 mM Glycin 20% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8.8 0,4% SDS
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% Trypsin 0,02% EDTA in PBS
20 x Turbo-Puffer	0,2 M NaOH mit festem H ₃ BO ₃ auf pH 8.0
Waschlösung IV (Western Blot)	1x TBS/PBS 2% Magermilchpulver
X-Gal-Stammlösung	20 mg X-Gal/ml N.N.-Dimethyl-formamid

2.7 Medien, Antibiotika, Agarplatten

2.7.1 Medien für Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium: 10 g/l Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 pH 7.0

2x YT-Medium : 16 g/l Trypton
 10 g/l Hefeextrakt
 5 g/l NaCl
 pH 7.0

Die Medien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert. Für die selektive Anreicherung der ausplattierten Bakterien wurden der jeweiligen Resistenz entsprechend Ampicillin (Endkonzentration 50-200 µg/ml) bzw. Kanamycin (Endkonzentration 25 µg/ml) zugegeben.

2.7.2 Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem flüssigen LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar-Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf 55°C abgekühlt und unter Rühren ggf. mit den unten angegebenen Reagenzien versetzt. Anschließend wurde das Medium in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Agarplatten in einer sterilen Plastiktüte bei 4°C aufbewahrt.

Ampicillin : Endkonzentration 50 µg/ml

Kanamycin: Endkonzentration 25 µg/ml

2.7.3 Medien für eukaryontische Zellkulturen

Die für die Kultur eukaryontischer Zellen verwendeten Medien wurden käuflich erworben (PAN, Aidenbach). Vor Gebrauch wurden diese mit fetalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) versetzt und anschließend sterilfiltriert. Für die Zellkulturen wurden folgende Medien verwendet:

Medium für PC-3-, LNCaP- und

DU 145-Zellen:

RPMI 1640 (PAN)

100 µg/ml Streptomycin

100 U/ml Penicillin

10% FKS

Medium für Primärzell-Klone 19-83A, 19-72A,**T-27F, T-45F:***Advanced* DMEM (Invitrogen, Karlsruhe)

2 mM Glutamin

20% FKS

8% NuSerum (Invitrogen)

0,2 µg/ml Gentamycin

100 nM DHT

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff, wobei das entsprechende Medium dafür zuvor mit 10% DMSO versetzt wurde.

2.8 Biologisches Material

2.8.1 Bakterienstämme

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α [Hanahan, 1983] von Invitrogen (Karlsruhe) wurde für die Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterienstämme verwendet. Der Bakterienstamm *Escherichia coli* BL21(DE3) pLys S (Invitrogen, Karlsruhe) wurde für die Transformation der GST-Expressionsplasmide sowie der TAT-Plasmide in kompetente Bakterienstämme verwendet.

2.8.2 Eukaryontische Zelllinien

PC-3 Humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie (Knochen-Metastase), ATCC, Rockville, USA, Androgen-unabhängige Zellen [Kaighn *et al.*, 1979; Ohnuki *et al.*, 1980]

DU 145 Humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie (Gehirn-Metastase), ATCC, Rockville, USA, Androgen-unabhängige Zellen [Mickey *et al.*, 1977; Stone *et al.*, 1978]

LNCaP Humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie (Lymphknoten-Metastase) ATCC, Rockville, USA, Androgen-abhängige Zellen [Horoszewicz *et al.*, 1983]

19-83A	Murine Prostataadenokarzinom-Primärzelllinie aus dem Prostatatumor der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Maus 19-83A
19-72A	Murine Prostataadenokarzinom-Primärzelllinie aus dem Prostatatumor der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Maus 19-72A
T-27F	Murine Prostataadenokarzinom-Primärzelllinie aus dem Prostatatumor der einfach transgenen TRAMP-Maus 27F
T-45F	Murine Prostataadenokarzinom-Primärzelllinie aus dem Prostatatumor der einfach transgenen TRAMP-Maus 45F

2.8.3 Mausstämme

Die verwendeten Mäuse des FVB-Stammes stammten aus institutseigenen Beständen oder dem Max-Planck Institut für experimentelle Medizin (Göttingen). Die verwendeten TRAMP-Mäuse wurden von der Firma Jackson Lab (Bar Harbor, Maine, USA) erworben und die verwendeten transgenen LPXN-Mäuse auf FVB-Hintergrund wurden in unserem Labor generiert [Herr, 2005; Kaulfuß, 2006]. Die Haltungsbedingungen bestanden aus einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus in pathogenfreier Umgebung bei 22°C und 55 ± 5% relativer Luftfeuchtigkeit. Tierfutter wurde von der Firma ssniff-Spezialdiäten (Soest) bezogen.

2.8.4 Synthetische Oligonukleotide

2.8.4.1 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Für die Generierung von cDNA-Produkten bzw. die Sequenzierung von Konstrukten wurden synthetische Oligonukleotide von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) erworben.

Vektor-spezifische Primer:

pGADT7Fw	5'-TCG ATG ATG AAG ATA CCC CAC CAA ACC-3'
pGADT7Rev	5'-AGA TGG TGC ACG ATG CAC AGT TGAA GTG-3'
pGBKT7Fw	5'-TCA TCG GAA GAG AGT AGT AAC AAA GG-3'
pGBKT7Rev	5'-CTA AGA GTC ACT TTA AAA TTT GTA TAC AC-3'
SP6new	5'-TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC TCA AGC-3'
T7new	5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAT TGG-3'
GFPC1-Top+	5'-GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC GT-3'
GFP-C1-R+	5'-GTA AAA CCT CTA CAA ATG TGG TAT GG-3'
pCMVseqFw	5'-CTC AGT GGA TGT TGC CTT TAC TTC T-3'
pCMVseqRev	5'-AAG CAA TAG CAT CAC AAA TTT CAC A-3'
pGEXSeqfor	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'

LPXN-spezifische Primer:

LPXN-663Fw	5'-CTT TGA GCG GAG TGG CTT GGC CTA CTG-3'
LPXN-689Rev	5'-CAG TAG GCC AAG CCA CTC CGC TCA AAG-3'
LPXN(LD)-Fw pEGFP	5'-CTT GGG AAT TCG ACA ATG GAA GAG TTA GAT GCC-3'
LPXN(LIM)-Rev pEGFP	5'-CAG TTG CTC GAG CAG TGG GAA GAG CTT ATT GAA GC-3'
LPXN-Fw-Eco Myc-His	5'-GA ATT CCA ATG GAAGAGTTAGATGCCTTATTGGAGGAAC-3'
LPXN-Rev-Xho Myc-His	5'-CTCGAGTTACAGTGGGAAGAGCTTATTGAAGCAAGG-3'
LPXN-TAT-Fw	5'-AGGCGGCCGCAAGGTGGTGAAGAGTTAGATGCCTTATTGGA-3'
LPXN-TAT-Rev	5'-TTGCGGCCGCTACCACCCAGTGGGAAGAGCTTATTGAAGC-3'
Human LPXN-Q-Fw 1	5'-TGATGAGACTTCGGAGATCCTTTC-3'
Human LPXN-Q-Rev 1	5'-CGTTTTAGAAGGTGGTGGTGATTC-3'
Human LPXN-Q-Fw 3	5'-TCTTAGCCATGTTCTCACCCAAGT-3'
Human LPXN-Q-Rev 3	5'-CCAGTTCAAAGAAGGAGCCAGTAG-3'
Human LPXN-Q4-Fw	5'-AGTTCCTTTGCGGTCTTCTTTC-3'
Human LPXN-Q4-Rev	5'-TTCCAGTTCCTCCAATAAGGCATC-3'
Human LPXN-Q4b-Rev	5'-GTCTCCTTTCTGGAATGCTGATCC-3'

p120CTN-spezifische Primer:

Human CTNND1-Q-Fw	5'-TGG ACG TGA CCA GGA TAA CAA GAT-3'
Human CTNND1-Q-Rev	5'-GGC GTG GCT TAC AGT CTT CAT TAG-3'
Human CTNND1-Q1A-Fw	5'-CCA AGA AGG GCA AAG GGA AAA AAC C-3'
Human CTNND1-Q1A-Rev	5'-GCT AAA TCT TCT GCA TCA AGG GTG TTG-3'
Maus CTNND1-Q1-Fw	5'-GGAAGAAATCAGACTTCCAGGTGA-3'
Maus CTNND1-Q1-Rev	5'-TGGTCTCCTCTCTCATTTCAGTGTG-3'

Caldesmon-spezifische Primer:

Cald1mouse-Fw	5'-GTT TCC AGC CGC ATT AAC GAA TGG C-3'
Cald1mouse-Rev	5'-GAG TTT ACT TCA CAG CAT GGT TTC TTT-3'
Cald pGADT7 EcoRI Fw	5'-GAA TTC ATG GAT GAT TTT GAG CGT-3'
Cald pGADT7XhoI Rev	5'-C TCG AGG TCA AAC CTT AGT GGG-3'
Cald pGFP EcoRI Fw	5'-CT CGA GTC ATG GAT GAT TTT GAG-3'
Cald pGFP XhoI Rev	5'-GA ATT CGA TCA AAC CTT AGT GGG-3'
Cald pGFP XhoI Fw T1-3	5'-CT CGA GTC ATG GAT GAT TTT GAG CGT CGC AG A-3'
Cald pGFP EcoRI Rev	5'-GA ATT CGA TCA AAC CTT AGT GGG GGA AGT GAC-3'
Cald pGAD Xho fw T1-3	5'-TTC ATG GAT GAT TTT GAG CGT CGC AGA-3'
Cald pGAD EcoRI rev	5'-C TCG AGG TCA AAC CTT AGT GGG GGA AGT GAC-3'
Cald pCMV HA, Myc SfiI fw	5'-GCA ATG GAG GCC ATG GAT GAT TTT GAG CGT CGC AG A-3'
Cald pCMV HA, Myc Xho1 rev	5'-CTC GAG GTC AAC CTT AGT GGG GGA AGT GAC-3'
Caldesmon intern1	5'-CTA CCG AGA AGG AAG AAA AAA GTG AA-3'
Caldesmon intern2	5'-CCT GGA GGG AGG GCC AGC GTG-3'
Human Cald1-Q3-Fw	5'-AACCTTCTGACTTGAGACCAGGAGA-3'
Human Cald1-Q3-Rev	5'-AGCTTGGGTTCTTTCTGGAAGTGTG-3'
Human Cald1-Q4-Fw	5'-CAAGCTCAAGACGCAGGACGAG-3'
Human Cald1-Q4-Rev	5'-AAGTCTCTATTTTCACAGCATGGGTTTC-3'

Genotypisierung-spezifische Primer:

LPXN-LD1-rev	5'-GAA GGT GGT GGT GAT TCC TTT GGC TC-3'
rPb-423-fw	5'-CTC TGC ACC TTG TCA GTG AGG TCC AG-3'
TRAMP-SV40Tag Rev	5'-CTCCTTTCAAGACCTAGAAGGTCCA-3'

Primer für *Housekeeping*-Gene:

Maus-HPRT-Q-Fw	5'-CGTCGTGATTAGCGATGATG-3'
Maus-HPRT-Q-Rev	5'-TATGTCCCCCGTTGACTGAT-3'
Maus/Human-GAPDH-Q-Fw	5'-CATCACCATCTTCCAGGAGC-3'
Maus/Human-GAPDH-Q-Rev	5'-ATGACCTTGCCCACAGCCTT-3'
Maus-TBP-Q-Fw	5'-CACCAATGACTCCTATGACCCCTA-3'
Maus-TBP-Q-Rev	5'-CAGTTGTCCGTGGCTCTCTTATTC-3'
Maus-TBP-Q2-Fw	5'-CCCACAACCTTCCATTCTCAAAC-3'
Maus-TBP-Q2/3-Rev	5'-TCAAGTTTACAGCCAAGATTCACG-3'
Human-PBGD-Q-Fw	5'-GCAATGCGGCTGCAACGGCGGAAG-3'
Human-PBGD-Q-Rev	5'-CCTGTGGTGGACATAGCAATGATT-3'
Human-TBP-Q-Fw	5'-AGCCTGCCACCTTACGCTCAG-3'
Human-TBP-Q-Rev	5'-TGCTGCCTTTGTTGCTCTTCCA-3'

Sonstige Human-spezifische Primer für quantitative *real time* PCR-Analysen:

Human-MMP-7-Q2-Fw	5'-CCGCGTCATAGAAATAATGCAGAA-3'
Human-MMP-7-Q2-Rev	5'-GATGTCAGCAGTTCCCCATACAAC-3'
Human-MMP-7-Q3-Fw	5'-TGAGTGAGCTACAGTGGGAACAGG-3'
Human-MMP-7-Q3-Rev	5'-GCATTATTTCTATGACGCGGGAGT-3'
Human-IL6-Q1-Fw	5'-TGAACCTTCCAAAGATGGCTGAAA-3'
Human-IL6-Q1-Rev	5'-TTTCTGCAGGAAGTGGATCAGGAC-3'
Human-IL6-Q2-Rw	5'-CACAGACAGCCACTCACCTCTTCA-3'
Human-IL6-Q2-Rev	5'-TTTCAGCCATCTTTGGAAGGTTCA-3'
Human- TAK1- Q1-Fw	5'-TGCCCAAACCTCCAAAGAATC-3'
Human- TAK1- Q1-Rev	5'-TTTGCTGGTCCTTTTCATCC-3'
Human- TAK1- Q2-Fw	5'-ACAGTGTTCCCAAGGAGTGG-3'
Human- TAK1- Q2-Rev	5'-AACTTCAGGTGCCATCCAAG-3'
Human-Yes-Q1-Fw	5'-TATGGCTGCTCAGATTGCTG-3'
Human-Yes-Q1/Q2-Rev	5'-TTTTGCACCTTGTCTTGCTG-3'
Human-Yes-Q2-Fw	5'-AGCTGGTTGATATGGCTGCT-3'
Human-GSK3a-Q3-Fw	5'-ACTCCAGTGGCGAGAAGAAA-3'
Human-GSK3a-Q3/Q4-Rev	5'-TTGAGGACAGCAGTGTGCTCAGG-3'
Human-GSK3a-Q4-Fw	5'-CCAGTGGCGAGAAGAAAGAC-3'
Human-KDELQ-Q-Fw	5'-TCGCCATCATCTTGCTACTG-3'
Human- KDELQ- Q-Rev	5'-TCTGAACGTGTCATGGTTCC-3'
Human-CDC2-Q1-Fw	5'-GACACAAAACCTACAGGTCAAGTGG-3'
Human-CDC2-Q1-Rev	5'-AGATCCATGGAAAGAAAACCTCAAAG-3'

Human-PSEN1-Q1-Fw	5'-CATTTTCTACAGTGTTCTGGTTGG-3'
Human-PSEN1-Q1-Rev	5'-GAATGCTAATTGGTCCATAAAAAGG-3'
Human-PSEN1-Q2-Fw	5'-TATAATGCAGAAAGCACAGAAAGG-3'
Human-PSEN1-Q2-Rev	5'-CCAACCAGAACACTGTAGAAAATG-3'
Human-Maspin-Q1-Fw	5'-CTCTTCTCTCCAATCTGTCTCTCC-3'
Human-Maspin-Q1-Rev	5'-CCGCTTGATTAGTTTCAGTGAGTA-3'
Human-Maspin-Q2-Fw	5'-AAGGAATTGGAAACTGTTGACTTC-3'
Human-Maspin-Q2-Rev	5'-GTTTGGTGTCTGTCTTGTTGACTC-3'

Sonstige Maus-spezifische Primer für quantitative *real time* PCR-Analysen:

Maus-IL-6 Q1-Fw	5'-CAAGTCCGGAGAGGAGACTTCACA-3'
Maus-IL-6- Q1-Rev	5'-CAGATTGTTTTCTGCAAGTGCATCATCGT-3'
Maus-PSEN-Q1-Fw	5'-GTG GCA CTG CCG CGA ACA GAG G-3'
Maus-PSEN-Q1-Rev	5'-CTC CGG ATG GCG CTG CTG GAG T-3'
Maus-PSEN-Q2-Fw	5'-ACA GCC ACT CCA GCA GCG CCA T-3'
Maus-PSEN-Q2-Rev	5'-GTG GCC ACG ACG ACG ACC ATG C-3'
Maus-PSEN-Q3-Fw	5'-ACCTTTGTCCTACTTCCAGAATGC -3'
Maus-PSEN-Q3-Rev	5'-CTTGGCTCCATATTTCAATGTCAG -3'
Maus-PSEN-Q4-Fw	5'-TGACAACCCTGAGCCAATATCTAA -3'
Maus-PSEN-Q4-Rev	5'-GGTGTAGATTAGCTGACCGTCCTT -3'
Maus-Maspin-Q1-Fw	5'-ACT GCC TCT GAG CTC CTT CGG C-3'
Maus-Maspin-Q1-Rev	5'-TGC TGT GTC GCC TTT GGT GCC C-3'
Maus-Maspin-Q2-Fw	5'-TTG TGC TCC CCA AGG ACG TGG A-3'
Maus-Maspin-Q2-Rev	5'-TGG CAT TGG CCA TGG TAC TGG GGT-3'
Maus-Yes-Q1-Fw	5'-CGG CCC CTT CTC GTC CTA GCG G-3'
Maus-Yes-Q1-Rev	5'-CCC TTT GTG GAA GAG GTC GGG GCA-3'
Maus-Yes-Q2-Fw	5'-GCT GGA GGT CTG TGT CGC CGG A-3'

2.8.4.2 Synthetische RNA-Oligonukleotide

Die synthetischen siRNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) und Invitrogen (Karlsruhe) käuflich erworben.

Humanes LPXN „D-LPXN“

Zielsequenz	5'-UAUCCAACCCAGCUCCUC-3'
Erster Strang	5'-UAUCCAACCCAGCUCCUCdTdT-3'
Zweiter Strang	5'-GAGGAGUGGGUUGGAAUAdTdT-3'

Humanes LPXN „D-LPXNst“

Zielsequenz	5'-GGCGCAGCUCGUGUAUACUACCAAU -3'
Erster Strang	5'-GGCGCAGCUGGUGUAUACUACCAAUdTdT-3'
Zweiter Strang	5'-AUUGGUAGUAUACACGAGCUGCGCCdTdT-3'

Luciferase (*Photinus pyralis*) „D-Luc“

Zielsequenz	5'-CGUACGCGGAAUACUUCGA -3'
Erster Strang	5'- CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3'
Zweiter Strang	5'-UCGAAGUAUCCGCGUACGdTdT-3'

Humanes p120Catenin „p120CTN-1“

Zielsequenz	5'-GGCUAGAGGAUGACCAGCGUAGUAU -3'
Erster Strang	5'- GGCUAGAGGAUGACCAGCGUAGUAUdTdT -3'
Zweiter Strang	5'-AUACUACGCUGGUCAUCCUCUAGCCdTdT -3'

Humanes p120Catenin „p120CTN-2“

Zielsequenz	5'- GCAGCUCCCAAUGUUGCCAACAAUA-3'
Erster Strang	5'- GCAGCUCCCAAUGUUGCCAACAAUAdTdT -3'
Zweiter Strang	5'- UAUUGUUGGCAACAUUGGGAGCUGCdTdT-3'

Humanes p120Catenin „p120CTN-3“

Zielsequenz	5'-CCCAGGAUCACAGUCACCUUCUAUA -3'
Erster Strang	5'- CCCAGGAUCACAGUCACCUUCUAUAAdTdT -3'
Zweiter Strang	5'-UAUAGAAGGUGACUGUGAUCCUGGGdTdT -3'

Humanes Caldesmon „Cald-A“

Zielsequenz	5'-ACAUAUUGAUACCUAUCUGCCAUGU -3'
Erster Strang	5'- ACAUAUUGAUACCUAUCUGCCAUGUdTdT -3'
Zweiter Strang	5'-ACAUGGCAGAUAGGUAUCAAU AUGUdTdT -3'

Humanes Caldesmon „Cald-B“

Zielsequenz	5'-CAGAAGGAGUUCGACCCAACAAUAA -3'
Erster Strang	5'- CAGAAGGAGUUCGACCCAACAAUAAdTdT -3'
Zweiter Strang	5'-UUAUUGUUGGGUCGAACUCCUUCUGdTdT -3'

Humanes Caldesmon „Cald-1“

Zielsequenz	5'-CCUGCUGAAGGUGUACGCAACAUCA -3'
Erster Strang	5'- CCUGCUGAAGGUGUACGCAACAUCAdTdT -3'
Zweiter Strang	5'-UGAUGUUGCGUACACCUUCAGCAGGdTdT -3'

Humanes Caldesmon „Cald-2“

Zielsequenz	5'-ACCAAUAAGGAAACUGCUGGCUUG -3'
Erster Strang	5'- ACCAAUAAGGAAACUGCUGGCUUGdTdT -3'
Zweiter Strang	5'- CAAGCCAGCAGUUUCCUUAUUUGGUdTdT -3'

Humanes Caldesmon „Cald-3“

Zielsequenz	5'-CCGCAUCA AUGAAUGGCUAACUAAA -3'
Erster Strang	5'- CCGCAUCA AUGAAUGGCUAACUAAAAdTdT -3'
Zweiter Strang	5'- UUUAGUUAGCCAUUCAUUGAUGCGGdTdT -3'

2.8.5 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
Anti-Caldesmon, (Cald-8) monoklonaler Antikörper, Maus (#C6292)	Sigma-Aldrich, Deisenhof
Anti-Caldesmon (8-L-Caldesmon) monoklonaler Antikörper, Maus (#610660)	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-phospho-Caldesmon Ser-789: sc-12931, polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti- β -Catenin monoklonaler Antikörper, Kaninchen	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-cmyc Tag (clone 4A6), monoklonaler Antikörper IgG1, Maus	Upstate-Chemicon, Hampshire, UK
Anti-GST, monoklonaler Antikörper, Maus (#G1160)	Sigma-Aldrich, Deisenhof
Anti-HSC70 (B-6) sc:7298 monoklonaler Antikörper, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (#9251), polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA
anti-LPXN (283 G), monoklonaler Antikörper, Maus	ICOS Corp., Bothell, USA
Anti-Phospho-MKK3/6 (Ser 189/207) 22A8 monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA
anti-p120CTN, monoklonaler Antikörper, Maus	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-Phospho-p38 (Tyr-182)-R sc:7975-R polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Rac1/2/3 (L129) monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-RhoA (67B9) monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Src (32G6) #2123 monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA

Primärantikörper	Hersteller
Anti-phospho-SRC-Familie 416 polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Anti-SV40, monoklonaler Antikörper, Maus	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-TAK1 #4505 polyklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA
anti- α -Tubulin (clone B-5-1-2), monoklonaler Antikörper, Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-phospho-Tyrosin (P-Tyr-100) monoklonaler Antikörper, Kaninchen	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Sekundärantikörper	Hersteller
anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase konjugiert (A-3687), Ziege	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Kaninchen IgG (H+L), HRP (<i>horse radish peroxidase</i>) konjugiert, Ziege	Dianova, Hamburg, Jackson ImmunoResearch
anti-Kaninchen IgG, Cy3 konjugiert (C2306)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase konjugiert (A-3688)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Maus IgG (H+L), HRP konjugiert, Kaninchen	Dianova, Hamburg, Jackson ImmunoResearch
anti-Maus IgG, Cy3 konjugiert (C2181)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.8.6 Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	Herkunft
pEGFP-C1	Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pGEM-Teasy	Promega, Wisconsin, USA
pCMV-His	Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pCMV-Myc	Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pGEX-4T3	GE Healthcare, München
pSport-Caldesmon	ImaGenes, Berlin, Deutschland
pET-28-TAT-GFP-Strep-Tag	Dr. Franco Laccone, Wien
pBAC-CTNND1	ImaGenes, Berlin, Deutschland
pGEX-4T1-PAK-RBD	Dr. S. Kliche, Institut für molekulare und klinische Immunologie, Magdeburg
pGEX-4T1-TRBD	Dr. S. Kliche, Institut für molekulare und klinische Immunologie, Magdeburg
pEGFP-LPXN	Dr. S. Kaulfuß, 2006

2.8.7 Verwendete Konstrukte und Plasmide

	Plasmid/Vektor	Herkunft	Primer/ Schnittstelle
pCMV-LPXN - cMyc	pCMV-Myc	LPXN full length (NM_004811)	LPXN-Fw-Eco Myc-HA und LPXN-Rev-Xho Myc-HA / EcoRI, XhoI
pCMV-LPXN-HA	pCMV-HA	LPXN full length (NM_004811)	LPXN-Fw-Eco Myc-HA und LPXN-Rev-Xho Myc-HA / EcoRI, XhoI
pCMV-Myc-Caldesmon	pCMV-Myc	Caldesmon <i>full length</i> Transkriptvariante 2 (NM_004342)	Cald pCMV HA, Myc SfiI fw und Cald pCMV HA, Myc XhoI rev / SfiI, XhoI
pCMV-HA-Caldesmon	pCMV-HA	Caldesmon <i>full length</i> Transkriptvariante 2 (NM_004342)	Cald pCMV HA, Myc SfiI fw und Cald pCMV HA, Myc XhoI rev / SfiI, XhoI
pEGFP-Caldesmon	pEGFP-C1	Caldesmon <i>full length</i> Transkriptvariante 2 (NM_004342)	Cald pGFP XhoI Fw T1-3 und Cald pGFP EcoRI Rev / XhoI, EcoRI
pGEX-LPXN	pGEX-4T3	LPXN <i>full length</i> (NM_004811)	LPXN-Fw-Eco / EcoRI, XhoI

	Plasmid/Vektor	Herkunft	Primer/ Schnittstelle
pGEX-LPXN-LIM	pGEX-4T3	LPXN-LIM-Domäne (NM_004811)	LPXN(LIM) Fw/ EcoRI, XhoI
pGEX-LPXN-LD	pGEX-4T3	LPXN LD-Domäne (NM_004811)	LPXN(LD)Fw / EcoRI, XhoI

2.8.8 Datenbanken

Verwendung	Programm
Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen	BLAST-Programm [Altschul <i>et al.</i> , 1990] (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
Bioinformatik	BCM Search Launcher (http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/) Ensembl v32 (http://www.ensembl.org/) National Center for Biotechnology Information (http://ncbi.nlm.nih.gov/) DCODE.org Comparative Genomics Center (http://www.dcode.org) XLStat2010 Excel
Restriktionsschnittstellen	WEB Cutter 2.0 (http://rna.lundberg.gu.se/cutter2)
Auswahl von Oligonukleotiden	Primer3 (http://frofo.wi.mit.edu/chi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

2.9 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.9.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Überprüfung rekombinanter Plasmide wurde zunächst eine geringe Menge an Plasmid-DNA präpariert. Hierzu wurde 1 ml einer angeimpften Übernachtskultur bei 13000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 250 µl P1-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde das Zellpellet in einer modifizierten alkalischen Lyse mit 250 µl P2 aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 250 µl P3 (Neutralisierung) wurde die Probe nach 5 minütiger Inkubationszeit bei 16000 x g für 10 min zentrifugiert. Der die Plasmid-DNA enthaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt, mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt,

und bei 16000 x g für 30 min gefällt. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20-50 µl H₂O aufgenommen.

2.9.2 Herstellung von Bakterien-Glycerin-Stocks

1 ml einer Bakteriensuspension wurden mit 10% sterilem Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.9.3 Midipräparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden 50 ml einer Übernachtskultur mit dem Plasmid-Midi Kit der Firma Macherey & Nagel, (Düren) oder Invitrogen (Karlsruhe) isoliert. Die DNA wurde dabei über Säulen affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Aufarbeitung erfolgte nach dem Protokoll der Hersteller. Diese hochaufgereinigte Plasmid-DNA kann u.a. für die Transfektion von Zelllinien, für Restriktionsanalysen und zur Subklonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden. Wurde nicht hochreine Plasmid-DNA benötigt, wurde die Übernachtskultur im größeren Maßstab nach der Methode der Minipräparation aufgereinigt und ggf. über Säulen (Invitex, Berlin oder Millipore, Schwalbach) weiter aufgereinigt.

2.9.4 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

[Sambrook *et al.*, 1989]

[aus Beckemeyer, 2007]

Die Ethanolfällung wurde eingesetzt, um DNA zu konzentrieren und sie von Salzverunreinigungen zu befreien. Zur Fällung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurde der Ansatz mit 1/10 Vol 3 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5.2, und 3 Vol 96% Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte durch Inkubation für 10 min bei RT oder für mehrere Stunden bei -20 °C. Der Ansatz wurde für 30 min bei 16000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in einem entsprechenden Volumen H₂O aufgenommen

2.9.5 Phenol/Chloroform- Aufreinigung von Nukleinsäuren

[aus Beckemeyer, 2007]

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Reinigung der DNA von Proteinen und Membranbestandteilen. Die zu extrahierenden DNA-Proben wurden mit gleichen Volumina Phenol versetzt und intensiv gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 16000 x g für 2-5 min. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Extraktion nun mit 1 Vol Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) wiederholt. Die sich in der wässrigen Phase befindende DNA wurde anschließend einer Ethanolfällung (2.9.4) unterzogen

2.9.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Ausbeute an RNA betrug dabei zwischen 0,5 und 1,0 µg/µl.

2.9.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen der Maus

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen der Maus erfolgte über Säulen der Firma Peqlab (Erlangen). Die Gewebestücke wurden unmittelbar nach dem Abtöten der Maus in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ohne dass die Gewebestücke auftauten wurden diese in einem eisgekühlten Mörser zerstoßen und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, welches mit 400 µl Lysispuffer gefüllt war und gevortext. Die weitere Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (pegGOLD Total RNA Kit).

2.9.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde ein Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) eingesetzt. Nachdem die Nullwerte abgeglichen wurden, konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (bei 260 nm)

bestimmt werden und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 320 nm) ermittelt werden. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte dabei über das Lambert'sche Gesetz.

Um niedrige Konzentrationen zu ermitteln, wurde eine bestimmte Menge der DNA auf ein Agarosegel, welches mit EtBr versetzt worden war, neben einem DNA-Standard (MassRuler, MBI) aufgetragen, für den bei jeder Bande die entsprechende Menge an DNA bekannt ist. Nach dem Lauf wurde die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert und die Konzentration der Probe bestimmt, indem die zu bestimmenden Banden mit Banden des Standards ähnlicher Größe verglichen wurden.

2.10 Klonierungstechniken

2.10.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur enzymatischen Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde ein Restriktionsansatz mit einem Volumen von mindestens 10 µl vorbereitet. Pro µg DNA wurden 2-3 U des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt und zusammen mit einem passenden Puffer bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 1-2 h oder über Nacht inkubiert. Wurden für die Spaltung der DNA zwei Restriktionsendonukleasen benötigt, wurde ein Puffer eingesetzt, der beiden Enzymen eine ausreichende Aktivität erlaubte.

2.10.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Zuhilfenahme der NucleoSpin^(R) Extract II-Säulen (Macherey und Nagel, Düren). Nachdem die über ein Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten wurden, wurden diese in einem ersten Schritt bei 50°C aus der Agarose gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf die Säulen gegeben und nach den Angaben des Herstellers weiter aufgereinigt. Danach wurde die DNA mit Wasser eluiert.

2.10.3 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um zu verhindern, dass es zu einer Religation linearisierter Plasmid-DNA kommt, wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt. Hierbei wurden endständige 5'-Phosphatgruppen des Vektors mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase entfernt. Die DNA wurde dazu mit 2 U Alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe von Phenol/Chloroform aufgereinigt, mit 2,5 Vol Ethanol und 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 4.8) gefällt und in H₂O resuspendiert.

2.10.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die Ligation konnte lineare Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten enzymkatalytisch verknüpft werden. Dabei wurden die 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der linearisierten DNA mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase unter Bildung von Phosphodiesterbindungen verbunden. So entstehen rekombinante DNA-Moleküle. Es wurde folgender Ligationsansatz verwendet:

25-50 ng	Vektor-DNA
30-120 ng	Insert-DNA
1 µl	T4-DNA-Ligase (5 U/µl)
1 µl	10 x Ligationspuffer
ad 10 µl H ₂ O	

Der Ansatz wurde für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.10.5 Subklonierung von PCR- und RT-PCR-Produkten

Blunt-End PCR- und RT-PCR-Produkte können in den pGEM-Teasy Vektor, welcher 5' T-Überhänge besitzt, ligiert werden, wenn diesem zuvor ein dA an das 3'-Ende angehängt wird. *Taq*- und andere Polymerasen besitzen eine terminale Transferase-Aktivität, welche

Grundlage dieser TA-Klonierungsstrategie ist. Wurden die PCR-Produkte mit einer Polymerase amplifiziert, welche eine Transferase-Aktivität besitzt, konnten die PCR-Produkte direkt in den pGEM-Teasy Vektor ligiert werden. Dafür wurden folgende Komponenten gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

50 ng pGEM-T Easy Vektor
PCR-Produkt (3:1, Insert: Vektor-Verhältnis)
1 µl T4-DNA-Ligase 10x Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase
in einem Gesamtvolumen von 10 µl

Wurde zur Amplifizierung der PCR-Produkte eine Polymerase verwendet, welche keine Transferase-Aktivität besitzt, wurde ein *A-tailing* durchgeführt, bevor das PCR-Produkt in den pGEM-Teasy Vektor kloniert werden konnte. Dafür wurde das PCR-Produkt für 30 min bei 70°C mit einer *Taq*-Polymerase inkubiert, die nachträglich ein dATP an das PCR-Produkt anhängt. Dazu wurden folgende Komponenten gemischt:

7 µl PCR-Produkt
0,7 µl Mango*Taq*-DNA-Polymerase (1 U/µl)
0,3 µl MgCl₂ (50 mM)
1 µl dATP (2 mM)
1 µl 10x Polymerase-Puffer

Anschließend wurden 1-2 µl des Ansatzes direkt für die Ligation in pGEM-Teasy eingesetzt.

2.11 Gelelektrophorese

2.11.1 Gelelektrophorese von DNA

Agarose-Gelelektrophoresen wurden zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Die Konzentration der Agarose betrug zwischen 0,5-2,0 % (w/v) und wurde je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente bestimmt. Die Agarose wurde in 100 ml 0,5x Turbo-Puffer durch Kochen gelöst, mit EtBr (Endkonzentration 0,5 µl/ml) versetzt und anschließend in einen Gelträger überführt. Nach vollständiger Verfestigung des Gels wurde die

Elektrophorese in einer mit 0,5x Turbo-Puffer gefüllten Gelkammer bei konstanter Spannung von 200-220 V durchgeführt. Bei der Verwendung der TBE-Agarosegele wurde die Agarose in 1x TBE-Puffer gelöst und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die Elektrophorese wurde dann bei einer konstanten Spannung mit 150 V durchgeführt.

2.11.2 Gelelektrophorese von RNA

[Maniatis *et al.*, 1980]

Die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA wurde während der Gelelektrophorese verhindert, indem eine Formaldehyd-Lösung in 1x MOPS/Agarose-Lösung zugesetzt wurde (Endkonzentration 6,6%). Die RNA-Proben wurden vor der Auftrennung folgendermaßen behandelt:

x µl	RNA (5-6 µg Gesamt-RNA)
2 µl	10x MOPS
8 µl	deionisiertes Formamid
3 µl	Formaldehyd (37%ige Lösung)
20 µl	Gesamtansatz

Der Ansatz wurde bei 65°C für 10 min denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die RNA-Proben mit 0,2 Vol Stop-Mix II mit Ethidiumbromid versetzt und bei 60 V über Nacht gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.11.3 Längenstandards

Während der DNA- und RNA- Gelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe parallel immer ein Längenstandard mitgeführt.

1 kb DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt
0,5-10 kb RNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt
MassRuler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.12 Transfertechniken von Nukleinsäuren

2.12.1 Northern Blot-Analysen

Die RNA-Fragmente wurden im denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des Northern-Blot-Verfahrens auf Nitrocellulosefilter (Hybond-C-Membran) übertragen. Der Transfer der RNA auf die mit 2x SSC aktivierte Membran erfolgte über Nacht mit einem Turbo-Blotter (Schleicher & Schüll, Dassel) nach den Angaben des Herstellers. Nach 12 - 18 h wurde der Blot abgebaut und die Positionen der Geltaschen auf der Membran markiert. Der Filter wurde zur Fixierung der RNA für 2 h bei 80°C inkubiert.

2.12.2 Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung membrangebundener RNA

2.12.3 Random Prime-Markierung

(Feinberg und Vogelstein, 1983)

Für die Markierung von DNA-Fragmenten mit [α -³²P] Isotopen wurde das Ready Prime Kit II (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Die Methode basiert auf dem von Feinberg and Vogelstein (1989) entwickelten Prinzip des *random priming*. Der Reaktionsmix enthält dATP, dGTP, dTTP, Klenow Fragment (4-8 U) und zufällige Oligodeoxyribonukleotide.

20-50 ng der Sonden-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 45 μ l in einem Wasserbad für 3-5 min denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Probe wurde in das Ready Prime Reaktionsgefäß überführt, gut gemischt, und zum Schluss wurden 5 μ l von [α -³²P] dCTP (40 μ Ci) zum Reaktionsmix zugegeben. Die Markierungsreaktion wurde bei 37°C für 30 min durchgeführt. Die markierte DNA wurde danach mit Hilfe von MicroSpin S 200HR Säulen (GE Healthcare) über Zentrifugationsschritte aufgereinigt. Die spezifische Aktivität der DNA-Sonde wurde mit einem Szintillationsmessgerät (Tri-Carb 4530, Packard Instruments, Warrenton, USA) gemessen. Sie lag idealerweise zwischen 4×10^8 und 5×10^9 cpm/ μ g DNA.

2.12.4 Hybridisierung membrangebundener RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Der fixierte Nitrocellulosefilter mit darauf gebundener RNA wurde zunächst in 2x SSC-Puffer getränkt und luftblasenfrei in ein Hybridisierungs-Glasröhrchen überführt. Anschließend wurde überschüssiges 2x SSC entfernt und 8 ml des auf 65°C vorgewärmten Rapid-Hyb-Puffer (GE Healthcare) zu der Membran dazugegeben. Die Prähybridisierung erfolgte für 1 h bei 65°C im Rollofen (Bachofer, Reutlingen). Anschließend wurden die denaturierte Sonde sowie 300 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) für 10 min bei 95°C denaturiert und abgekühlt zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter denselben Bedingungen wie die Prähybridisierung. Die Filter wurden danach zunächst 15-30 min mit vorgewärmten 2x SSC-Puffer und anschließend für 2-5 min mit 0,2x SSC + 0,1% SDS bei 65°C im Rollofen gewaschen. Lag der Hintergrund bei 0,5-1 Bq/cm² wurde die noch feuchte Membran in eine Folie eingeschweißt und zur Auswertung in eine Autoradiographie-Kassette eingeklebt. Zur Exposition mit einem Röntgenfilm wurde die Kassette bei -70°C eingefroren und der Film nach 12-72 h entwickelt.

2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

[Saiki *et al.*, 1985]

Unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotid-Primern, ausgehend von einer DNA-Matrize, wurde ein Fragment enzymatisch mittels einer PCR *in vitro* amplifiziert. Dazu wurde zunächst die doppel-strängige DNA bei 95°C denaturiert. Die anschließende Erniedrigung der Temperatur ermöglicht die Anlagerung der Primer an die einzel-strängige DNA. Die Aktivierung einer zugesetzten DNA-Polymerase zur Synthese des DNA-Fragments wird durch eine erneute Temperaturerhöhung bewirkt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus lassen sich aufgrund der exponentiellen Vervielfältigung große Mengen eines Fragments amplifizieren. Mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.11.1) wurde der Erfolg der PCR anschließend überprüft.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind in Kapitel 2.8.4 aufgeführt.

2.13.1 PCR an Plasmid-DNA

Die PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

x μ l	<i>template</i> -DNA (10–50 ng)
1 μ l	Primer 1 (10 pmol/ μ l, sequenzspezifisch)
1 μ l	Primer 2 (10 pmol/ μ l, sequenzspezifisch)
5 μ l	dNTPs (2 mM)
5 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase Puffer (10 x)
0,7 μ l	Mango <i>Taq</i> -Polymerase (1U/ μ l)
ad 50 μ l	dH ₂ O

Die DNA-Amplifikation erfolgte in 30 - 40 Zyklen in einem Primus 25 Thermocycler der Firma MWG Biotech (High Point, NC, USA). Die einzelnen Temperaturschritte und die jeweilige Anzahl/Dauer der Zyklen wurden für jedes DNA-Fragment und die dafür eingesetzten Primer neu gewählt. Ein Zyklus bestand aus folgenden Einzelschritten:

95°C	30–60 sec	Denaturierung
50–65°C	30–90 sec	Annealing
72°C	30–90 sec	Elongation

Vor dem ersten Zyklus wurde der Ansatz 1 - 3 min bei 95°C denaturiert. Nach Beendigung der gewünschten Zyklen wurde ein letzter Elongationsschritt von 7 min bei 72°C angeschlossen. Ca. 1/10 Vol des Reaktionsansatzes wurde mit Stop-Mix II gemischt, je nach Größe des PCR-Produkts auf ein 1-1,5%iges Agarosegel aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

2.13.2 Reverse Transkription

Um cDNA aus Gesamt-RNA zu synthetisieren, wurde eine Reverse Transkription durchgeführt. Dazu wurden die SuperScript II (Invitrogen, Karlsruhe) und oligo(dT)-Primer, die mit den poly(A)⁺-Sequenzen der mRNA paaren, verwendet.

Es entsteht ein sog. cDNA-Strang (für *complementary* DNA), der zur mRNA komplementär ist und später DNA-abhängigen DNA-Polymerasen zugänglich gemacht werden kann.

Für die Reverse Transkription wurden 2-5 µg RNA mit 1 µl oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) und 1 µl dNTP (10 mM) in 12 µl Gesamtvolumen gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von:

4 µl 5x First Strand buffer

2 µl DTT (0,1 M)

1 µl RNase-Inhibitor

wurde die Probe 2 min bei 42°C inkubiert und 1 µl SuperScript II hinzugefügt. Die Reverse Transkription wurde 50 min bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase bei 70°C für 15 min inaktiviert.

2.13.3 Quantitative *real time* PCR-Analysen

[mod. aus Beckemeyer, 2007]

Real time PCR bezeichnet ein PCR-Verfahren, bei dem während der PCR die Menge der entstandenen Produkte in Echtzeit gemessen wird. Die Messung der Produktzunahme geschieht anhand von Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit von der Produktmenge emittiert wird. Eine Möglichkeit zur Generierung produktabhängiger Fluoreszenz bieten dsDNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Hier wurde der Cyaninfarbstoff SYBR®-Green I, welcher als Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG der Firma Invitrogen (Karlsruhe) vertrieben wird, verwendet. Der Farbstoff bindet weitgehend sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA, mit einer etwa 100 fach höheren Affinität als Ethidiumbromid. Das derart gebundene SYBR®-Green fluoresziert nach Anregung etwa 1000 x stärker als der freie Farbstoff, weshalb SYBR®-Green sehr gut geeignet ist, die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte sichtbar zu machen [Morrison *et al.*, 1998]. SYBR®-Green lässt sich in Gegenwart von doppelsträngiger DNA mit Blaulicht (480 nm) anregen und zeigt ein Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 520 nm.

Die Analyse wurde im 384well-Maßstab mit dem „ABI Prism 7900T Sequence Detection System“ durchgeführt. Dieses System arbeitet mit einem Temperatur-Cycler und einem Laser,

der zu jedem der 384 Reaktionsansätze gelenkt wird und diese anregt. Über ein ladungsempfindliches Detektionssystem erfolgte die Messung der Fluoreszenz jeder Probe, die durch an dsDNA gebundenes SYBR®-Green emittiert wird. Die Daten wurden mit Hilfe der Sequenz-Detektionssystem-Software (SDS Version 2.1, PE Applied Biosystems) quantifiziert, exportiert und in Excel (Microsoft) ausgewertet. Die Reaktions-Ansätze enthielten je 0,25 µM der Oligonukleotide und 5 µl SYBR®-Green. Letzterer enthält die HotStarTaq™ DNA-Polymerase in einem optimierten Puffer, dNTP-Mix (mit dUTP-Additiv), den SYBR®-Green I Fluoreszenz-Farbstoff und ROX-Farbstoff als passive Referenz. Der ROX-Farbstoff soll die Korrektur minimaler Abweichungen erlauben, die durch Pipettier-Ungenauigkeiten oder Fluoreszenz-Schwankungen entstehen können.

Jedem Ansatz wurden entweder 25 ng genomische DNA (bei Kopienzahlbestimmung des Transgens; Endkonzentration 2,5 ng/µl) oder 2,5 µl 1:100 verdünnter cDNA (bei Bestimmung differentieller Genexpression) zugefügt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurden Ansätze mitgeführt, die genomische DNA einer transgenen Maus der F1-Generation in den Endkonzentrationen 20 ng/µl, 10 ng/µl, 5 ng/µl, 2,5 ng/µl, 1,25 ng/µl und 0,625 ng/µl enthielten. Um das Auftreten von unspezifischen Produkten auszuschließen, wurde nach Abschluss der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde kontinuierlich die Fluoreszenz (F) bei steigender Temperatur (T) gemessen und die Steigung dF/dT (1. Ableitung) errechnet. Diese wurde gegen die Temperatur aufgetragen und damit die Maxima bei den primerspezifischen Schmelztemperaturen aufgezeigt. Zusätzliche Maxima verrieten unspezifische Produkte, z.B. Primer-Dimere. Folgendes Programm wurde für alle Primer verwendet:

50°C	2 min		
95°C	15 min	} 40 Zyklen	Aktivierung <i>Taq</i>
94°C	15 s		Denaturierung
58°C	30 s		Annealing
72°C	1 min 30 sec		Elongation
95°C	15 s		
60°C	15 s		
60°C-95°C	2°C/min		Schmelzkurve

Die relative Quantifizierung der initialen Kopienzahl erfolgt bei der *real time* PCR anhand des Verhältnisses der Kopienzahl des zu untersuchenden Testamplikons und eines Referenzamplikons, das unter identischen Bedingungen amplifiziert wird. Für die Genotypisierung wurde ein HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)-spezifisches Primerpaar verwendet, da das HPRT-Gen genau eine Kopie im Mausgenom hat. Für die quantitativen Genexpressionsanalysen wurden als Referenz die *housekeeping*-Gene PBGD (Porphobilinogen-Deaminase) und TBP (TATA-binding protein) verwendet. Bei der Auswertung wird ein Signal-Schwellenwert definiert, bei welchem sich jede Einzelreaktion in der exponentiellen Phase befinden sollte. Der Zeitpunkt (in Zyklen), zu dem das Signal diesen Schwellenwert erreicht, wird als Schwellenwertzyklus oder C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Dieser C_T -Wert korreliert mit der Anzahl der Kopien, die für die Reaktion eingesetzt wurden. Wie in Abbildung 2.1 gezeigt, resultiert eine höhere oder niedrigere Start-Kopienzahl in einem signifikant früheren oder späteren Anstieg der Fluoreszenz-Emission.

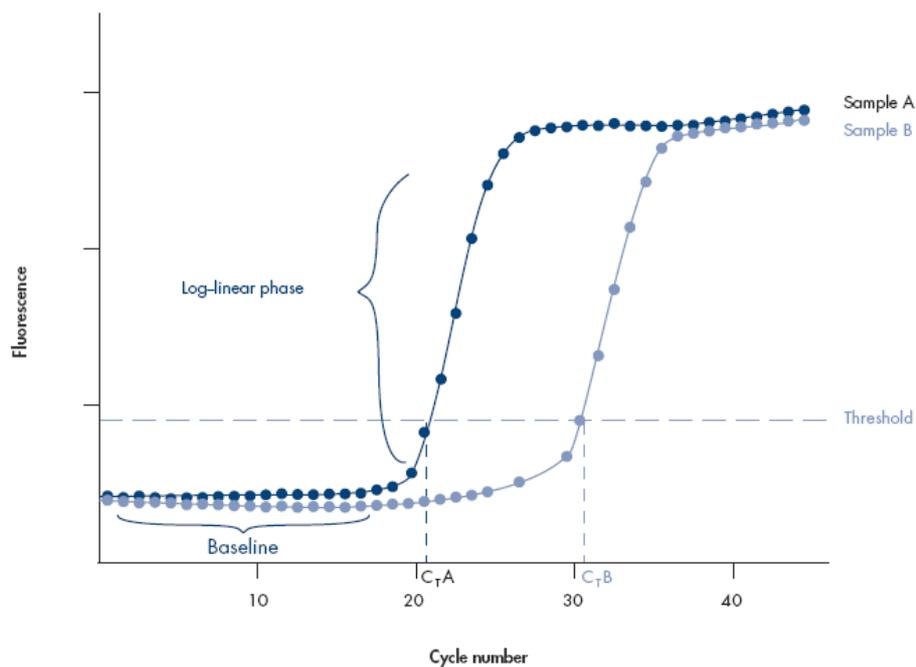


Abb. 2.1: Zunahme der Fluoreszenz zweier Proben (A und B) in Abhängigkeit von der PCR-Zyklus-Anzahl. Probe A enthält eine größere Menge an Start-Kopien als Probe B und überschreitet den Schwellenwert daher bei einem früheren Zyklus als Probe A. C_T : Schwellenwertzyklus. Quelle: QuantiTect SYBR®-Green PCR Handbook, Qiagen (2003).

Aus den Daten der Standardkurven für jedes Amplikon interpoliert das Programm SDS 2.1 die theoretisch eingesetzte DNA-Menge für Referenzamplikon und Testamplikon jeder Probe (cDNA oder Maus-DNA). Da für das Testamplikon und das Referenzamplikon einer Probe exakt gleiche DNA-Mengen für die Taqman-Analyse eingesetzt werden, sollte das Verhältnis der durch das Programm interpolierten DNA-Menge von Testamplikon zu Referenzamplikon den Wert 1 ergeben. Im Falle einer homozygot transgenen LPXN-Maus, befindet sich doppelt soviel *template*-DNA für das Testamplikon wie für das Referenzamplikon in den Taqman-Ansätzen. Bei der Berechnung des Verhältnisses Testamplikon zu Referenzamplikon wird in diesem Fall ein Wert von ca. 2 erhalten.

2.14 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruch-Verfahrens nach Sanger. Vier Didesoxynukleotide (A, G, T, C) werden jeweils mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche wiederum während der gelelektrophoretischen Analyse über Laserabtastung automatisch detektiert werden. Wird ein solches Nukleotid anstelle eines normalen Nukleotids in die wachsende DNA-Kette eingebaut, führt dies zu einem Abbruch der Polymerasereaktion. Die endständige Base sämtlicher DNA-Fragmente ist somit bekannt. Für die Sequenzreaktion wurden 100 ng/1000 bp Plasmid-DNA, 10 pmol sequenzspezifischem Primer und 2,5 µl ET-Mix (DYEnamic ET terminator Cycle sequencing Kit der Firma GE Healthcare, München) eingesetzt. Der Gesamtansatz betrug 10 µl und wurde nach folgendem Programm analysiert:

95°C	1 min		Denaturierung
95°C	30 sec	} 25 Zyklen	Denaturierung
60°C	30 sec		Annealing
60°C	2 min		Elongation
60°C	5 min		Elongation

Nach der Sequenzreaktion wurde der Gesamtansatz mit 10 µl H₂O aufgefüllt und anschließend über SephadexG50-Säulen aufgereinigt. Die gelelektrophoretische Analyse wurde mit der automatischen Sequenzanlage MegaBACE™1000 der Firma Molecular Dynamics (GE Healthcare) durchgeführt.

2.15 Proteinchemische Techniken

2.15.1 Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen

Die Isolierung von Gesamtprotein aus Zellkulturen erfolgte aus 25 cm² großen Zellkulturflächen (Konfluenz > 80%). Nach dem Entfernen des Mediums und dem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurden die Zellen in 300 µl Lysis-Puffer I lysiert. Die adhären Zellen wurden mit einem Zellschaber oder einer Pipette vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Suspensionszellen wurden bei 100 x g für 5 min zentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in 300 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min entfernt. Der Überstand, in dem die Zellproteine enthalten sind, wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.15.3) und das Lysat in geeigneten Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

2.15.2 Isolierung von Gesamt-Protein aus Organen der Maus

Die nach dem Abtöten der Maus entnommenen Organe wurden unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Isolierung der Proteine wurden die Organe, ohne dass sie auftauten, in einem eisgekühlten Mörser zerstoßen und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben, welches mit 1 ml Lysispuffer gefüllt war und gevortext. Dem Lysispuffer wurden zuvor Proteaseinhibitoren (Complete Mini, Roche, Karlsruhe) sowie ggf. Phosphataseinhibitoren (PhosSTOP, Roche, Karlsruhe) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die nicht löslichen Bestandteile für 10 min bei 4°C und 16000 x g abzentrifugiert. Der die Proteine enthaltene Überstand wurde in ein vorgekühltes, sauberes Eppendorf-Gefäß überführt, die Konzentration wie unter 2.15.3 beschrieben bestimmt und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.15.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

[Bradford, 1976]

Die Konzentration von Proteinen wurde nach der Methode von Bradford mit Hilfe von Roti[®]-Nanoquant (Roth) bestimmt. Diese Methode hat den Vorteil, dass Konzentrationen von 200 ng bis 25 µg gemessen werden können. Der Coomassie-Farbstoff Brilliant-Blau bindet in saurer Lösung an Proteine, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495 nm auf 595 nm auftritt. Eine zuvor erstellte BSA-Eichreihe (0-6.7 µg BSA/ml) dient als interner Standard und ermöglicht, dass die Proteinkonzentration direkt anhand der ermittelten Optischen Dichte bei 495 und 595 nm abgelesen werden kann.

20 ml des Roti[®]-Nanoquant-Farbstoffs (5x-Konz.) wurden mit 80 ml H₂O_{dd} gemischt und gekühlt gelagert. Jeweils 200 µl dieser Arbeitslösung wurden zu 50 µl einer 1:100 Verdünnung der zu messenden Proteine gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte in flachbödigen, durchsichtigen 96well-Mikrotiterplatten in einem SynergyMx Microplate Reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vt.) bei 490/595 nm. Die Messungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmungen und wurden anschließend gemittelt.

2.15.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurden Gradientengele (NuPAGE[™] 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieses Polyacrylamid-Gelsystem beruht auf dem SDS-PAGE-Prinzip [Laemmli, 1970], wodurch Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch einen konstanten pH-Wert der Gele und der Puffer von 7.0 wird die Stabilität der Proteine erhöht, was zu einem besseren Ergebnis der Elektrophorese führt.

Die gekühlten Proteinproben wurden mit 0,25 Vol Probenpuffer (LDS Sample Buffer (4x), NuPAGE[™], Invitrogen, Karlsruhe) gemischt, 10 min bei 70°C erhitzt, abzentrifugiert und nach Abkühlen auf Eis auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x MES-Puffer (Invitrogen) bei 150-180 V für ca. 1-2 h. Zur Bestimmung der Größe der aufgetragenen Proteine wurde parallel zu den Proteinproben ein Proteinstandard (NuPAGE[™] See Blue Plus2, Invitrogen) mit aufgetragen.

2.15.5 Western Blot-Analysen von Proteinen auf PVDF-Membranen

[Gershoni *et al.*, 1982, 1983]

Eine PVDF-Membran (Macherey & Nagel), die auf die Größe des zu blottenden Polyacrylamidgels zugeschnitten wurde, wurde für 10 sec in 100% Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer für 10 min unter Schütteln äquilibriert. Anschließend wurde die PVDF-Membran auf fünf Whatman GB003 Filter (Schleicher & Schüll, Dassel) derselben Größe, die zuvor ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden, gelegt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Membran zu keinem Zeitpunkt trocken fiel. Auf die Membran wurde das nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit Wasser abgespülte Polyacrylamidgel gelegt. Fünf weitere mit Transferpuffer getränkte Filter komplettierten das *sandwich*-Model. Nach dem Beseitigen der Luftblasen erfolgte der Proteintransfer vom Gel auf die Membran in einem Elektrobloetter (Biometra, Göttingen) bei 220 mA für 1,5 h.

2.15.6 Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Kontrolle des Western Blot-Transfers wurden die SDS-Polyacrylamidgele nach dem Blotten mit Coomassie-Brillant Blue-Lösung für 2-4 h angefärbt und anschließend bis zur gewünschten Farbintensität mit H₂O entfärbt.

2.15.7 Inkubation von membrangebundenen Proteinen mit Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran, wurde diese zum Abblocken von unspezifischen Bindungsstellen in 5% Magermilchpulver in 1x TBS-Tween für 1 h bei RT inkubiert. Nach anschließendem Waschen in TBS-Tween erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper in der für den Antikörper spezifischen Verdünnung in 1x TBS-Tween oder 5% Magermilchpulver in 1x TBS-Tween bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran für 2x 10 min in 2,5% Milchpulver in TBS-Tween gewaschen und mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bis 1:10000 in 5% Milchpulver in TBS-Tween für 2 h bei RT inkubiert.

Für den Nachweis der Proteine über Chemilumineszenz wurde die Membran zunächst für 3x 15 min mit 2,5% Milchpulver in 1x TBS-Tween gewaschen, um Milchpulverrückstände zu

entfernen. Gleichzeitig wurde etwa 1 ml der ECL Plus-Arbeitslösung hergestellt, indem Luminol/Enhancer-Lösung und die stabile Peroxid-Lösung der Firma GE Healthcare 1:40 gemischt wurden. Die Peroxidase-Lösung setzt das Substrat der Arbeitslösung um. Anschließend wurde die Lösung für 5 min unter Lichtabschluss auf die gewaschene Membran gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde die abgetropfte Membran in Plastik eingeschweißt und in eine Filmkammer eingeklebt. In der Dunkelkammer wurde ein Film aufgelegt und zunächst nach 1 min entwickelt. Je nach Intensität der Banden wurde die Entwicklungszeit verlängert oder verkürzt.

Für den Nachweis der Proteine über die Alkalische Phosphatase wurde bereits ein Sekundärantikörper verwendet, der AP gekoppelt war. Nach Inkubation der Membran für 3x 15 min in 2,5% Milchpulver in 1x TBS-Tween wurde die Membran für 5 min bei RT in AP-Puffer gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran unter Lichtabschluss in 10 ml Färbelösung (Alkalische Phosphatase-Färbelösung) inkubiert, wodurch die Proteine sichtbar gemacht wurden. Durch das Waschen mit 1x TBS-Tween wurde die Reaktion abgestoppt und danach die Membran getrocknet.

Tab. 2.1: Übersicht über die in der Western Blot-Analyse verwendeten Antikörper-Verdünnungen sowie das Puffersystem

Antikörper	Verdünnung		Puffer-System
	Primärantikörper	Sekundärantikörper	
anti-phospho-Caldesmon (Ser789)	1:2000	1:4000	1x TBS-0,2% Tween
anti-phospho JNK (Thr183/Tyr185)	1:2000	1:2000	1x TBS-0,2% Tween
anti-phospho MKK3/6 (Ser 189/207)	1:1500	1:2000	1x TBS-0,2% Tween
anti-phospho p38 (Tyr182)	1:2000	1:3000	1x TBS-0,2% Tween
anti-phospho SRC-Familie (Ser416)	1:2000	1:3000	1x TBS-0,2% Tween
anti-SV40 T-Ag	1:4000	1:4000	1x TBS-0,2% Tween
anti-HSC-70	1:7500	1:10000	1x TBS-0,2% Tween
anti-Caldesmon	1:3000	1:4000	1x TBS-0,2% Tween
anti-p120CTN	1:4000	1:4000	1x TBS-0,2% Tween
anti-Rho A	1:2000	1:2000	1x TBS-0,2% Tween
anti-Rac	1:2000	1:2000	1x TBS-0,2% Tween
anti-TAK1	1:3000	1:4000	1x TBS-0,2% Tween
anti-SRC	1:4000	1:4000	1x TBS-0,2% Tween
anti- α -Tubulin	1:7500	1:10000	1x TBS-0,2% Tween
anti-LPXN	1:1600	1:2000	1x TBS-0,2% Tween 5%Magermilch

2.15.8 Densitometrische Auswertung

Zur genauen Analyse der Western Blots wurden die Bandenintensitäten quantifiziert. Dazu wurden die Filme zunächst eingescannt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Quantity One[®] Quantification Software Version 4.1 der Firma BIORAD.

2.16 Aufreinigung eines TAT-Transduktionsproteins

[mod. aus Beckemeyer, 2007]

Zur Überexpression des humanen LPXN in Karzinomzellen wurde ein TAT-LPXN-Fusionsprotein verwendet. TAT besitzt die Eigenschaft, gefaltete Proteine über die Zellmembran zu transportieren, ohne dabei die Integrität der Membran zu stören.

2.16.1 Expression des TAT-LPXN-Fusionsproteins

Die als Glycerolstock gelagerten *E.coli* BL21 pLys-Bakterien, in die das Konstrukt pET-28-TAT-LPXN-EGFP-Strep-Tag [Beckemeyer, 2007] transformiert wurde, wurden zunächst in 50 ml 2 x YT-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurden die Bakterien 1:25 verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte anschließend mit 1 mM IPTG für 4 h bei RT, um schwerlösliche Expressionsprodukte in Form von *inclusion bodies* zu vermeiden.

Die Expressionskontrolle durch IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) [Studier und Moffat, 1986] wird durch die *lac*-Repressor-Bindungsstelle vermittelt, durch die eine effiziente Repression des T7-Promotors garantiert ist. Durch die Bindung der *lac*-Repressor-Proteine an die Operatorregion wird der T7-Promotor blockiert. Wird der Bakterienkultur jedoch IPTG zugesetzt, kann sich dieses an die *lac*-Repressor-Proteine binden, sodass die T7-Promotorregion freiliegt. Die RNA-Polymerasen sind dann in der Lage, beginnend am Promotor, die Sequenz zu translatieren.

2.16.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Bakterien und Aufreinigung des Fusionsproteins

Nach der Induktion der transformierten *E.coli* BL21 pLys wurden die Bakterien bei 4500 x g für 10 min abzentrifugiert und der Mediumüberstand verworfen. Pro 50 ml Pellet wurde 1 ml Lysispuffer (siehe 2.6) zum Auflösen der Pellets verwendet. Das Lysieren der Pellets geschah durch 10 minütiges Vortexen sowie vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurde das Bakterienlysat 3 x 1 min sonifiziert und anschließend 15 min bei 13000 x g in einer Kälzentrifuge abzentrifugiert. Der das Protein enthaltende lösliche Überstand wurde abgenommen und das Protein nach den Vorgaben des Herstellers (IBA, Göttingen) über Strep-Tactin Säulen aufgereinigt. Proteine, die einen Streptavidin-Tag enthalten, binden an die Strep-Tactin Sepharose-Matrix der Säulen, während die restlichen bakteriellen Proteine durch Waschen entfernt werden. Anschließend kann das Fusionsprotein durch Zugabe von Desthiobiotin von der Matrix eluiert und isoliert werden (Abb. 2.2). Nach der Elution des Fusionsproteins wurde das Desthiobiotin aus dem Eluat entfernt. Dazu wurde die Proteinlösung in Centrisart-Röhrchen (c.off = 20 kDa) bei 4500 x g zentrifugiert und durch wiederholte Zugabe von PBS gewaschen. Zur Kontrolle des aufgereinigten Fusionsproteins wurde dieses über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung analysiert.

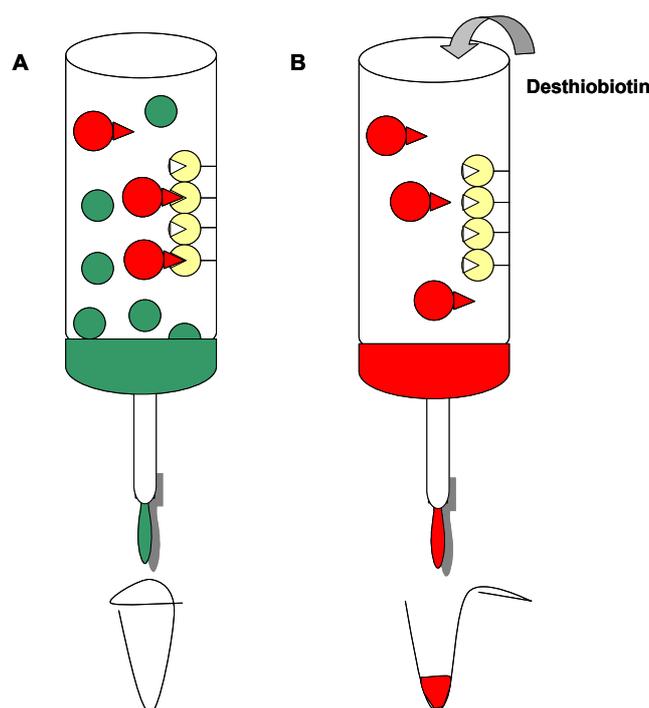


Abb. 2.2: Aufreinigung des Fusionsproteins über Strep-Tactin-Säulen von IBA. Proteine, die einen Streptavidin-Tag enthalten, können an die Strep-Tactin Sepharose-Matrix der Aufreinigungs-Säulen binden. Das generierte TAT-LPXN-EGFP-Strep-Tag-Fusionsprotein kann so durch das Binden an die Säulenmatrix von den übrigen Proteinen getrennt werden (A). Nach Durchlauf des gesamten Proteinlysats kann das gebundene Fusionsprotein durch die Zugabe von Desthiobiotin von der Matrix gelöst werden (B).

2.16.3 Transduktion des TAT-Fusionsproteins

Zur Transduktion des TAT-LPXN-EGFP-Strep-Tag-Fusionsproteins in humane Prostatakarzinomzellen wurden von diesen Zellen zunächst 50000 in 12-Well-Platten ausplattiert. Nach 12 h wurde das LPXN-Fusionsprotein in einer Konzentration von 500 nM auf die Zellen gegeben und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Protein abgenommen, die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und für nachstehende Versuche vorbereitet.

2.17 Zellbiologische Methoden

2.17.1 Zellkultur eukaryontischer Zellen

Die adhärent wachsenden PC-3-, LNCaP- und DU 145-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit Zusatz von 1,2% Penicillin/Streptomycin und 10% FKS in oberflächenbehandelten Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C. In Abhängigkeit von der Wachstumsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche geteilt. Die Zellen wurden dabei zunächst mit 1x DPBS (PAN) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (PAA, Pasching, Österreich) so lange inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst haben. Nach dem Lösen der Zellen wurden diese 1:2 bis 1:5 geteilt und die verbliebenen Zellen in frischem Medium weiter kultiviert.

2.17.2 Isolierung von Primärzellen aus murinen Prostatakarzinomen

Zur Etablierung der murinen Primärzellkultur wurden die LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäuse unmittelbar zuvor abgetötet und der entnommene Prostatatumor unter sterilen Bedingungen zunächst mit einer Rasierklinge mechanisch zerkleinert. Anschließend erfolgte die weitere Zerkleinerung mit einem Tissue Chopper (H. Saur Laborbedarf, Reutlingen). Das zerkleinerte Gewebe wurde in HBS gewaschen und in ein steriles Falcon mit 5 ml Kollagenase (1 mg/ml) und 5 ml Medium 199 überführt. Die Suspension wurde für zwei Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert und in Medium 199 mit 0,04% DNase I resuspendiert. Danach erfolgte die Trennung der verschiedenen Zelltypen mittels Biocoll-Gradienten durch die Zentrifugation bei 2000 x g für 20 min. Die mittlere Fraktion wurde in 50 ml Medium 199 verdünnt und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in *Advanced* DMEM (Invitrogen) mit Zusätzen und Antibiotika gelöst und in kleinen Kulturschalen, die zuvor mit Rattenschwanz-Kollagen beschichtet wurden, ausplattiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Isolierung der epithelialen Tumorzellen wurde eine Immunzytochemie, wie unter 2.23.1 beschrieben, mit einem SV40-Antikörper durchgeführt.

2.17.3 Zellkultur eukaryontischer muriner Primärzellen

Die Primärzelllinien T-27F, T-45F, L-T-19-83A und L-T-72A wurden in advanced DMEM mit FKS, NuSerum, Gentamycin und DHT kultiviert (siehe 2.7.3). Zum Abtöten der Fibroblasten wurden die Zellen zusätzlich mit 1µM Dexamethason behandelt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank mit 5% CO₂ bei 37°C. Je nach Fibroblastenkonzentration wurden die Zellen drei- bis siebenmal pro Woche differentiell trypsiniert. Die Zellen wurden dazu zunächst mit 1x DPBS (PAN) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (PAA, Pasching, Österreich) für ca. 3 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die gelösten Zellen entfernt und die adhärenen Zellen in frischem Medium weiter kultiviert. Waren die Zellkulturen frei von Fibroblasten, wurden sie je nach Proliferationsrate ein- bis zweimal pro Woche geteilt.

2.17.4 Kryokonservierung und Revitalisierung von eukaryontischen Zellen

Zur Konservierung der eukaryontischen Zellen wurden diese zuvor bis zu einer Konfluenz von >80% wachsen gelassen und anschließend mit DPBS gewaschen. Nach dem Trypsinieren der Zellen wurden sie einer entsprechenden Menge Kulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert und für ca. 7 Tage bei -70°C aufbewahrt. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff konserviert. Zur Revitalisierung wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut, in vorgewärmtes Kulturmedium überführt und über Nacht inkubiert. Nach 12 – 24 h wurde das Medium zur vollständigen Entfernung des DMSO gewechselt.

2.17.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion von eukaryontischen Zellen erfolgte zur Überexpression von Fusionsproteinen, zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von Fusionsproteinen und zum Nachweis der Kolokalisation ausgewählter Proteine mit Hilfe von immunzytochemischen Experimenten. Das verwendete Transfektionsreagenz FuGENE HD (Roche, Mannheim) stellt ein nicht-kationisches Lipid dar und hat daher eine besonders geringe Toxizität. Das Produkt wurde speziell dazu entwickelt, besonders schwer zu transfizierende Zelllinien zu transfizieren, da es auch in serumhaltigen Medien und bei geringer Zelldichte eingesetzt werden kann. Für die Transfektion wurden nur Zellen verwendet, die sich in einer permanenten Wachstumsphase befanden. Ca. 18 h vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Platten oder kleinen Kulturflaschen so ausplattiert, dass am folgenden Tag eine Zelldichte von 80% erreicht wurde. Das Kulturmedium ohne Zusätze wurde mit der DNA und dem Transfektionsreagenz nach dem Protokoll des Herstellers gemischt, für 20-30 min bei RT inkubiert und vorsichtig auf die Zellen getropft. Zuvor wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Kulturmedium ohne Antibiotika beschichtet. Nach 12-18 h wurden das Transfektionsmedium komplett gegen normales Medium mit allen Zusätzen ausgetauscht und die Zellen zur Proteinexpression 24-72 h unter Kulturbedingungen inkubiert.

2.17.6 Anfertigung von Zytospin-Präparaten

Zur Fixierung von Zellen auf Objektträgern wurde neben der Kultivierung der Zellen auf Objektträgern auch die Methode der Zytospin-Präparation angewendet. Dazu wurden ca. 7×10^5 Zellen in einem speziellen Rotor (Sigma, Rotor 11234) bei $90 \times g$ für 7 min auf einen Objektträger zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurden die Präparate für immunzytochemische Experimente verwendet oder in Aluminiumfolie eingewickelt und bei -20°C aufbewahrt.

2.17.7 Collagen-Aufreinigung aus Rattenschwänzen

Zur Beschichtung von Zellkulturschalen wurde Kollagen aus Rattenschwänzen verwendet. Dazu wurden diese zunächst mit 70% igem EtOH gereinigt. Anschließend wurde die Haut der Schwänze entfernt und beginnend von der Schwanzspitze die Wirbel einzeln herausgebrochen und die Kollagenfasern aus dem Bindegewebe gezogen. Die einzelnen Kollagenfasern wurden getrocknet und in ca. 2 cm lange, blutfreie Stränge zerkleinert. Danach wurden die Fasern über Nacht in einer flachen Schale unter UV-Licht sterilisiert und anschließend in sterile Flaschen überführt. 0,5 g der Kollagenfasern wurden in 200 – 220 ml 0,05% iger Essigsäure für mind. 24 h bei 4°C unter sterilen Bedingungen gerührt, bevor die Lösung bei 6000 rpm für 1 – 2 h zentrifugiert wurde. Der zähflüssige Überstand war für ca. 1 Jahr bei 4°C lagerbar.

2.18 Invasionsassay

Zur Bestimmung der invasiven Eigenschaften der Zellen wurden BioCoat Matrigel *Invasion Chambers* (Becton Dickinson, Bedford, MA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Diese stellen die Basalmembran *in vitro* dar und bieten den Zellen die Bedingungen, die sie benötigen, um ihre invasive Eigenschaft *in vitro* zu zeigen. Die Invasions-Kammern bestehen aus einer BD Falcon™ TC Companion Platte mit Falcon™ Cell Culture Inserts, die eine PET-Membran (8 μm Porengröße) mit einer dünnen Schicht Matrigel *Basement Membrane Matrix* enthalten. Die Matrigel-Schicht schließt die Poren der Membran, so dass nur invasive Zellen durch die Matrigel-Matrix und die Poren der Membran wandern können. Dagegen können nicht invasive Zellen nicht durch die Membran wandern, sondern verbleiben auf der Matrigel

Matrix. Die Membran kann nach dem Färben der Zellen leicht aus den Inserts heraus geschnitten werden und für Licht- und Elektronenmikroskopie verwendet werden.

LPXN-siRNA, p120CTN-siRNA bzw. LPXN- und p120CTN-siRNA transfizierte PC-3- und DU 145-Zellen sowie die murinen Primärzellen wurden im entsprechenden Kulturmedium jeweils in einer Konzentration von 7×10^5 Zellen/ml resuspendiert. 500 μ l dieser Zellsuspension wurden in den oberen Teil eines Inserts gegeben und für 18 - 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die nicht invasiven Zellen vorsichtig mit einem Wattestäbchen von der oberen Oberfläche der Membran entfernt. Anschließend wurde die Membran mit einem Skalpell aus dem *Chamber* geschnitten und die Zellen auf der unteren Seite der Membran mit dem Diff-Quik Staining Set (Dade Behring GmbH, Marburg) gefärbt. So konnten die invasiven Zellen unter einem Mikroskop (BX60, Olympus Optical Co., Japan) bei 100facher Vergrößerung gezählt werden. Die Daten entsprechen der Anzahl invasiver Zellen aus fünf zufällig gewählten Sichtfeldern. Alle Experimente wurden in 3facher Wiederholung durchgeführt.

2.19 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der Proliferationsfähigkeit von Zellen wurde ein Proliferationsassay der Firma Promega, Mannheim gewählt (Cell Titer 96 ® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay). Dieser macht sich die Eigenschaft von lebenden Zellen zunutze, welche schwach gefärbte Tetrazoliumsalze (MTS) in intensiv gefärbte Formazanderivate umwandeln können. Da diese Reduktion intakte Mitochondrien erfordert, kann sie nur in lebenden Zellen stattfinden und bietet daher eine Möglichkeit zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen zu unterscheiden. Zu Beginn des Tests wurden pro Well der 96-Well-Platten 3×10^3 Zellen ausplattiert. Nach einer Adhäsionsphase von 2 h wurde ein Nullwert, welcher von allen übrigen Messungen abgezogen wurde, zur Minimierung der Fehlerrate nach dem Protokoll des Herstellers gemessen. Die Intensität des Farbumschlages des Chromophors in jedem Well wurde mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (SynergyMx Universal Microplate Reader, BIO-TEK Instr. Inc.) verifiziert. Die Absorption wurde im Abstand von 24 h analysiert, wobei darauf geachtet wurde dass die Konfluenz der Zellen nicht auf über 95% anstieg. Die Messung erfolgte bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm (zum Abzug des Hintergrundes).

2.20 Assay zur Bestimmung der Adhäsion von Zellen

Zur Bestimmung der adhäsiven Eigenschaften der PC-3- und DU 145-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression wurden sog. Adhäsionsassays durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst über Nacht mit siRNA gegen LPXNst bzw. als Kontrolle mit siRNA gegen Luciferase transfiziert. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit DPBS gewaschen und in neuem Medium für weitere 48 h kultiviert. Mit 0,3 mM EDTA in DPBS wurden die Zellen nach der Kultivierung vom Boden der Kulturschale gelöst und in einem 50 ml Falcon in Kulturmedium ohne Serum verdünnt bevor die genaue Zellzahl durch zweifaches Auszählen bestimmt wurde. Die murinen Primärzellen wurden ohne vorherige Transfektion vom Boden der Kulturschale gelöst, verdünnt und ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 15 min in dem Falcon unter der Sterilbank stehen gelassen. Auf 4-Well-Slides, die zuvor mind. 1 h bei 37°C mit 10 µg/µl Fibronectin, Rattenschwanz-Collagen, 1%iger Gelatine oder 20 µg/µl BSA beschichtet worden sind, wurden jeweils 1×10^4 Zellen in 500 µl Gesamtvolumen zugegeben. Nach Inkubation für 1, 2 oder 24 h bei 37°C wurde das Medium vorsichtig entfernt und die adhären Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Anschließend erfolgte eine immunzytochemische Färbung mit einem anti-phospho-Tyrosin-Antikörper oder mit FITC-Phalloidin über Nacht. Nach Beendigung der immunzytochemischen Färbung wurden die adhären Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und deren Fläche bestimmt.

2.21 Bestimmung der Migrationsfähigkeit von Zellen

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von PC-3- und DU 145-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN-Expression bzw. von murinen Primärzellen wurde der sog. *scratch*-Assay oder auch Wundheilungsassay angewendet.

Zunächst wurden die PC-3- und DU 145-Zellen mit siRNA gegen LPXN, p120CTN bzw. LPXN und p120CTN und als Kontrolle gegen Luciferase transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst und 1×10^4 Zellen wurden pro Well eines 4-Well-Slides ausplattiert. Die Primärzellen wurden direkt vom Boden der Kulturflasche gelöst und in einem 4-Well-Slide ausplattiert. Nach 24 h hatten die Zellen eine geschlossene Ein-Zellschicht am Boden gebildet. In diese Ein-Zellschicht wurde mit Hilfe einer sterilen, gelben Pipettenspitze eine vertikale Wunde zugefügt, anschließend das

Kulturmedium zur Beseitigung der abgekratzten Zellen gewechselt und die Wunde mit Hilfe eines inversen Mikroskops dokumentiert. Nach einer Inkubationszeit von 8 - 24 h wurden die Zellen erneut fotografiert und der Wundheilungsprozess dokumentiert.

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit der PC-3- und DU 145-Zellen mit herunterregulierter Caldesmon Expression wurde ein Transwell-Migrationsassay (24-Well Millicell, Millipore, Molsheim) durchgeführt. 8 µm großen Poren in der PET-Membran am Boden der Migrations-Kammern erlauben es migrierenden Zellen auf die andere Seite der Membran zu gelangen. Die PCa-Zellen wurden zunächst wie unter 2.22.2 beschrieben mit Caldesmon-spezifischer siRNA und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. 8×10^4 Zellen in einem Gesamtvolumen von 500 µl wurden anschließend in die mit Medium aktivierte Kammer gegeben und für 18 – 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, welche nicht auf die Unterseite der Membran migriert waren, vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt und danach die Zellen auf der Unterseite der Membran mit dem Diff-Quik Staining Set (Dade Behring GmbH, Marburg) gefärbt. Nach der Färbung wurde die PET-Membran mit einer Rasierklinge vorsichtig aus der Migrations-Kammer geschnitten und auf einem Objektträger mit einem Tropfen Öl eingedeckelt. Unter einem Mikroskop (BX60, Olympus Optical Co., Japan) wurden die Zellen bei 100facher Vergrößerung gezählt. Die Daten entsprechen der Anzahl migrierter Zellen aus fünf zufällig gewählten Sichtfeldern. Alle Experimente wurden in 3facher Wiederholung durchgeführt.

2.22 Herunterregulierung der Genexpression mittels RNA-Interferenz

[mod. aus Kaulfuß, 2006]

Der Terminus RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt die Verwendung von doppelsträngiger RNA, um spezifische mRNAs für die Degradierung zu markieren, wodurch die Expression der entsprechenden Gene verringert wird. RNAi ist eines aus einer breiten Klasse von RNAsilencing- Phänomenen, die in Pflanzen, Tieren und Pilzen gefunden worden sind [Cogoni *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001b; Tuschl, 2001].

2.22.1 Überblick über den Mechanismus von RNAi

Im ersten Schritt wird doppelsträngige RNA in 21-23 Nukleotide *small interfering RNAs*(siRNA) geteilt, welche auch als *guide RNAs* bezeichnet werden [Hammond *et al.*, 2001; Sharp, 2001]. Das Enzym Dicer, ein Mitglied der RNase III-Familie der dsRNA-spezifischen Ribonukleasen, schneidet prozessiv die dsRNA (direkt oder über ein Transgen oder Virus eingeführt) in ATP-abhängiger Weise. Das sukzessive Schneiden degradiert die RNA in 19- 21 bp-Duplexe (siRNAs), die jedes einen 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende besitzen [Hutvagner *et al.*, 2002]. Im Effektor-Schritt binden die siRNA-Duplexe an einen Nuklease- Komplex, um den sog. RISC (*RNA-induced silencing complex*) zu bilden. Das ATPabhängige Entwinden der siRNA-Duplexe ist für die Aktivierung von RISC notwendig. Der aktive RISC geht gezielt gegen homologe Transkripte durch Basenpaarung vor und schneidet die mRNA ~12 Nukleotide vom 3'-Terminus der siRNA [Hammond *et al.*, 2001; Sharp, 2001]. In Säugerzellen führt das Einbringen langer doppelsträngiger RNA (>30 Nukleotide) zur Initiation einer antiviralen Antwort, die z.B. eine unspezifische Inhibierung der Proteinsynthese oder RNA-Degradation auslöst. Diese antivirale Antwort in Säugerzellen kann umgangen werden, indem synthetische siRNAs eingebracht oder siRNAs von Vektoren exprimiert werden (Abb. 2.3).

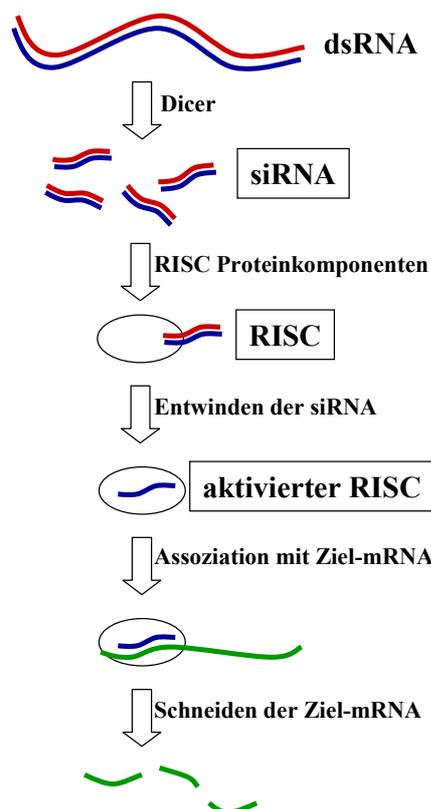


Abb. 2.3: Übersicht über den Mechanismus von RNAi [mod. nach www.ambion.com]. RNAi wird durch das Enzym Dicer initiiert, welches doppelsträngige RNA in ~22-Nukleotide kleine *small interfering* RNAs (siRNAs) prozessiert. Die siRNAs werden dann in eine Multikomponenten-Nuklease (RISC) inkorporiert. RISC wird anschließend von einer latenten Form, die doppelsträngige siRNA enthält, in eine aktive Form durch Entwindung der siRNAs überführt. Der aktivierte RISC verwendet dann die entwundenen siRNAs als eine Schablone für die Substratselektion und die Ziel-mRNA wird geschnitten.

2.22.2 Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNAs

Die auf RNAi basierende Methode kann verwendet werden, um eine spezifische mRNA zur Degradierung zu markieren, wodurch es zur Verminderung der entsprechenden Genexpression (*gene silencing*) kommt. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass sequenz-spezifische einzelsträngige RNA-Oligonukleotide sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Orientierung als Negativkontrolle für dieses spezifische *gene silencing* eingesetzt werden können, da sie keinen Effekt auf die spezifische mRNA-Degradierung haben [Tuschl *et al.*, 1999]. Transfektionen von PC-3-, LNCaP- und DU 145-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz OligoFectamine™ (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt, welches stabile Komplexe zwischen Lipiden und Oligonukleotiden bildet. So können die RNA-Moleküle effizient in die Säugetier-Zellen aufgenommen werden. Die Transfektion wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit genspezifischen siRNA-Duplex-Oligonukleotiden in einer Endkonzentration von 80 nM im Transfektionsmedium durchgeführt. Als eine weitere Kontrolle wurden die PCa-Zellen mit siRNA-Duplex-Oligonukleotiden gegen das Luciferase-Gen des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*; nicht-verwandte Sequenz) transfiziert (Sequenzen der Oligonukleotide siehe 2.8.4.2).

Für die Transfektion wurden die PCa-Zellen entweder in kleinen Kulturflaschen (22 cm²), in 6-Well-Platten oder 12-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert. Alle Angaben der nachfolgend beschriebenen Transfektion beziehen sich auf ein Well einer 12-well-Platte; für kleine Kulturflaschen wurden die 3fachen Mengen verwendet. 3 µl Duplex-siRNA (20 µM) wurden mit 100 µl OptiMEM I (Invitrogen) in einem 1,5 ml-Gefäß vermischt. 3 µl OligoFectamine™ wurden zu 20 µl OptiMEM I in einem weiteren 1,5 ml-Gefäß gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OligoFectamine-Lösung zu der RNA-Probe hinzugefügt und für 25 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml OptiMEM I wurde in jedes Well gegeben. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch (RNA/OligoFectamine™ in OptiMEM I) vorsichtig auf die Zellen gegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator

8 - 12 h kultiviert. Nach Entnahme des Transfektionsmediums wurde normales Kulturmedium zu den Zellen gegeben und die Zellen unter den gleichen Bedingungen weiterkultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen zur Isolierung von Proteinen, RNA und für immunhistochemische Experimente zur Verifizierung des *gene silencing* und zur Untersuchung der Effekte der jeweiligen Gen-Herunterregulierung verwendet.

2.23 Methoden zur subzellulären Lokalisierung eines Proteins

2.23.1 Immunzytochemische Färbung eukaryontischer Zellen

Die etablierten PCa-Zellen und die Primärzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % auf speziellen Objektträgern mit angehefteter Kulturflasche (FALCON culture slides, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) in entsprechendem Kulturmedium kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und in 3,7% Formaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen für 15 min in 0,1% Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach kurzem Waschen der Zellen in PBS wurden diese für 30 min bei RT mit 3% BSA in PBS zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Anschließend erfolgte das Ablösen der angehefteten Kulturflasche von den Objektträgern und die Inkubation mit dem Primärantikörper in entsprechender Konzentration in 3% BSA in PBS bei 4°C in einer feuchten Kammer für mindestens 12 h. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen für 5 min in PBS gewaschen und mit dem jeweiligen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung, sowie einem Antikörper zur Visualisierung des Zytoskeletts, mindestens 2 h bei RT inkubiert. Nach intensivem Waschen für mindestens 3 x 10 min in 1x PBS wurden die Präparate in Vectashield/DAPI eingedeckelt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (BX60, Olympus) wurden die immunzytochemischen Präparate mit dem analySIS-Programm CellF (soft imaging GmbH) analysiert, fotografiert und bearbeitet.

Tab. 2.2: Übersicht über die in der immunzytochemischen Analyse verwendeten Antikörper-Verdünnungen

Antikörper	Verdünnung	
	Primärantikörper	Sekundärantikörper
anti- β -Catenin	1:300	1:400
anti-Caldesmon	1:200	1:400
anti-cmyc	1:200	1:400
anti-Phospho-Tyrosin	1:500	1:500
anti-SV40 T-Ag	1:500	1:500
anti-p120CTN	1:300	1:400
FITC-Phalloidin	1:2000	–

2.23.2 Subzelluläre Lokalisation von Fusionsproteinen

Für die subzelluläre Lokalisation von LPXN und Caldesmon wurde jeweils der komplette offene Leserahmen *in frame* in den pEGFP-C1-Vektor kloniert (Clontech, Heidelberg). Dadurch entstand ein Fusionskonstrukt, bei dem LPXN [Kaulfuß, 2006] bzw. Caldesmon an den C-Terminus der EGFP-kodierenden Sequenz gekoppelt ist. PCa-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausplattiert und gemäß 2.17.5 mit den Fusionskonstrukten transfiziert. Nach einer 24 stündigen Inkubation wurden die Zellen vom Boden des Wells abgelöst und 1×10^6 Zellen auf speziellen Objektträgern mit aufgesetzter Kulturflasche (FALCON culture slide) ausplattiert. Nach erneuter Kultivierung für 24 h wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und für 20 min in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit Vectashield/DAPI eingedeckelt und nach dem Trocknen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (BX60, Olympus) ausgewertet. Für die Kolo-kalisation von LPXN und Caldesmon wurde LPXN zunächst in einen Vektor kloniert, der einen cmyc Tag enthielt (pCMV-cmyc). Anschließend wurden die Zellen mit dem LPXN-cmyc- und dem Caldesmon-pEGFP-Fusionsprotein gemäß 2.17.5 transfiziert. Die Visualisierung des LPXN-cmyc-Fusionsproteins erfolgte dann mittels Immunzytochemie mit einem cmyc-spezifischen Antikörper.

2.24 Histologische Techniken

[mod. aus Beckemeyer, 2007]

Die folgenden histologischen Methoden erfolgten in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Schweyer (Abteilung Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen).

2.24.1 Fixierung des Gewebes

Das frisch präparierte Material wurde direkt in Bouin'sches Fixativ gegeben und je nach Größe des Präparates für eine Stunde bis zu 2 Tagen bei RT fixiert. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 96%) wurde das Gewebe entwässert. Um das Ethanol vor der Einbettung in das Paraffin vollständig zu entfernen, wurde das Gewebe über Nacht in Methylbenzoat inkubiert. Für die Einbettung wurde das Paraffin im Wasserbad bei 58°C geschmolzen. Die Einbettung bestand aus mehreren Schritten, die sämtlich bei 58°C durchgeführt wurden. Für die Entfernung des Methylbenzoats wurde das Gewebe zweimal mit Benzol und zweimal in einem 1:1 Benzol/Paraffin-Gemisch jeweils für 1 h inkubiert. Zur vollständigen Durchdringung des Gewebes mit dem Paraffin wurde das Präparat anschließend zweimal für 1 h in Paraffin inkubiert. Im Anschluss daran wurde die auf 58°C temperierte Einbettungsform etwa zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, das Gewebe in die Form überführt und mit Paraffin aufgefüllt. Nach der Aushärtung über Nacht wurde der Paraffinblock aus der Form entnommen und bei 4°C gelagert.

2.24.2 Vorbehandlung der Objektträger

Die Objektträger wurden 20 min in 0,1 M HCl gekocht und danach 2x 5 min in H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 30 min in 96% Ethanol gelegt, getrocknet und über Nacht in 1x Denhardt's Lösung inkubiert. Nach 20minütiger Fixierung in Ethanol/Eisessig (3:1) wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 70%, 50%, 30% Ethanol, je 5 min) rehydriert und über Nacht bei 70°C in 1% Organosilan (pH 3.4) inkubiert. Schließlich wurden sie 5x 5 min in H₂O gewaschen und über Nacht bei 100°C gebacken. In diesem Zustand können die beschichteten Objektträger bis zu sechs Monate aufbewahrt werden. Die Aktivierung der Objektträger erfolgte in 10% Glutaraldehyd

in PBS, pH 7.0, für 30 min. Anschließend wurden sie 5 min in H₂O gewaschen, bevor die Aktivierung in 0,1 M Natrium-Perjodat 15 min unter dem Abzug stabilisiert wurde. Schließlich wurden die Objektträger 3x in PBS gewaschen und über Nacht bei 42°C getrocknet. Im aktivierten Zustand können die Objektträger mindestens 8 Wochen verwendet werden.

2.24.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Paraffinblöcke mit dem fixierten Gewebe wurden zu Quadern geeigneter Größe zurechtgeschnitten und in das Mikrotom (JUNG RM 2035, Leica) eingespannt. Die Schnittdicke betrug 5-7 µm. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte auf 58°C warmes Wasser gelegt, mit einem Objektträger aufgenommen und getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei 4°C gelagert.

2.24.4 Immunlokalisierung von Proteinen in Paraffingewebeschnitten

Zunächst wurden die Schnitte 2x 10 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol für 1x 5 min und 1x 2 min, 96%, 70% Ethanol für je 5 min) rehydriert und in H₂O (5 min) gespült. Die Gewebeschnitte wurden 45 min in einem Dampfgerat gekocht. Nach 20 min Abkühlzeit wurden sie für 5 min mit H₂O gespült und kurz in H₂O_{dd} getaucht. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt und unspezifische Bindungsstellen wurden 20 min mit 3% H₂O₂ abgesättigt. Danach wurde erneut 5 min mit H₂O gespült und die Gewebeschnitte kurz in H₂O_{dd} und TBS getaucht. Anschließend wurde 20 min mit BSA geblockt. Auf das Präparat wurde der Primärantikörper (LPXN, Klon G, 1:500; SV40-Tag 1:400) gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Unspezifische Antikörper-Bindungen wurden in TBS 3x 2 min abgewaschen. Der Zweitantikörper (HRP) wurde entsprechend den Firmenempfehlungen (DAKO EnVision) in TBS verdünnt. Nach 30 min Inkubation in einer feuchten Kammer wurden nicht gebundene Antikörper 3x 2 min in TBS ausgewaschen. Die DAB-Chromogen-Färbung erfolgte während einer Inkubationszeit von 15 min bei RT. Die Reaktion wurde mit TBS abgestoppt und die Gewebeschnitte anschließend 5 min in H₂O gewaschen. Danach wurde 8 min mit Hämalaun gegengefärbt. Die Gewebeschnitte wurden für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und anschließend eingedeckelt.

2.25 *Whole Genome Microarray*

Für eine genomweite Transkriptomanalyse an Prostatatumormaterial von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen und einfach transgenen TRAMP-Kontrollmäusen wurde eine whole genome Microarray-Analyse durchgeführt. Dafür wurde der GeneChip[®] ST Array (Maus) und der GeneChip[®] Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet.

2.25.1 Vorbereitung der Gewebeproben

Die Transkriptom-Analyse erfolgte an Prostatatumoren, die eine definierte Größe (ca. 10 mm²) erreicht hatten. Das Wachstum der Prostatatumore der transgenen TRAMP/LPXN- und TRAMP-Mäuse wurde dazu durch regelmäßiges Abtasten der unteren Bauchregion eruiert. Bei Erreichen der definierten Größe wurden die Mäuse abgetötet, der Prostatatumor herauspräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.25.2 Isolierung der RNA

Für die RNA-Isolierung aus dem Prostatatumorgewebe wurde TRIzol der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. TRIzol ist eine einphasige Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat und hält während der Homogenisierung der Gewebeproben die RNA intakt, während es die Zellen zerstört und die Zellkomponenten löst. Um RNase-Kontaminationen zu verhindern, wurden vor Arbeitsbeginn alle Arbeitsutensilien sowie der Arbeitsplatz mit RNaseZAP[®] (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gereinigt.

Jedes Gewebestückchen wurde mit 1 ml TRIzol versetzt und mit einem Handhomogenisator homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die Suspension mit 200 µl Chloroform versetzt und nach sorgfältigem Mischen für weitere 5 min inkubiert. Danach wurden die Proben zunächst bei 12000x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und anschließend die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Für die Präzipitation der RNA wurden 500 µl Isopropanol und 1 µl GlycoBlue zur besseren Visualisierung der RNA-Pellets pro ml TRIzol zu den Proben gegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Proben bei 20°C für 30 min oder über Nacht inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt der Proben bei 12000x g für 30 min bei 4°C. Das RNA-Pellet wurde dann einmal mit

75%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 12000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Nach einer Behandlung der Proben mit DNase I (nach Angaben des Herstellers) und anschließender Zentrifugation bei 12000 x g für 30 min bei 4°C wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei 37°C getrocknet. Danach wurde das Pellet in 50-100 µl RNase-freiem H₂O gelöst.

Zur Überprüfung der Quantität der isolierten RNA wurden 2 µl jeder Probe mit Hilfe des *Eukaryote Total RNA Nano Assays* im Bioanalyser 2100 (Agilent, Waldbronn) analysiert. Die Überprüfung der Qualität der RNA erfolgte mit Hilfe eines Photometers (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.25.3 Labeling und Hybridisierung der Proben

Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Abbildung 2.4 gibt einen schematischen Überblick über die durchgeführten Arbeitsschritte.

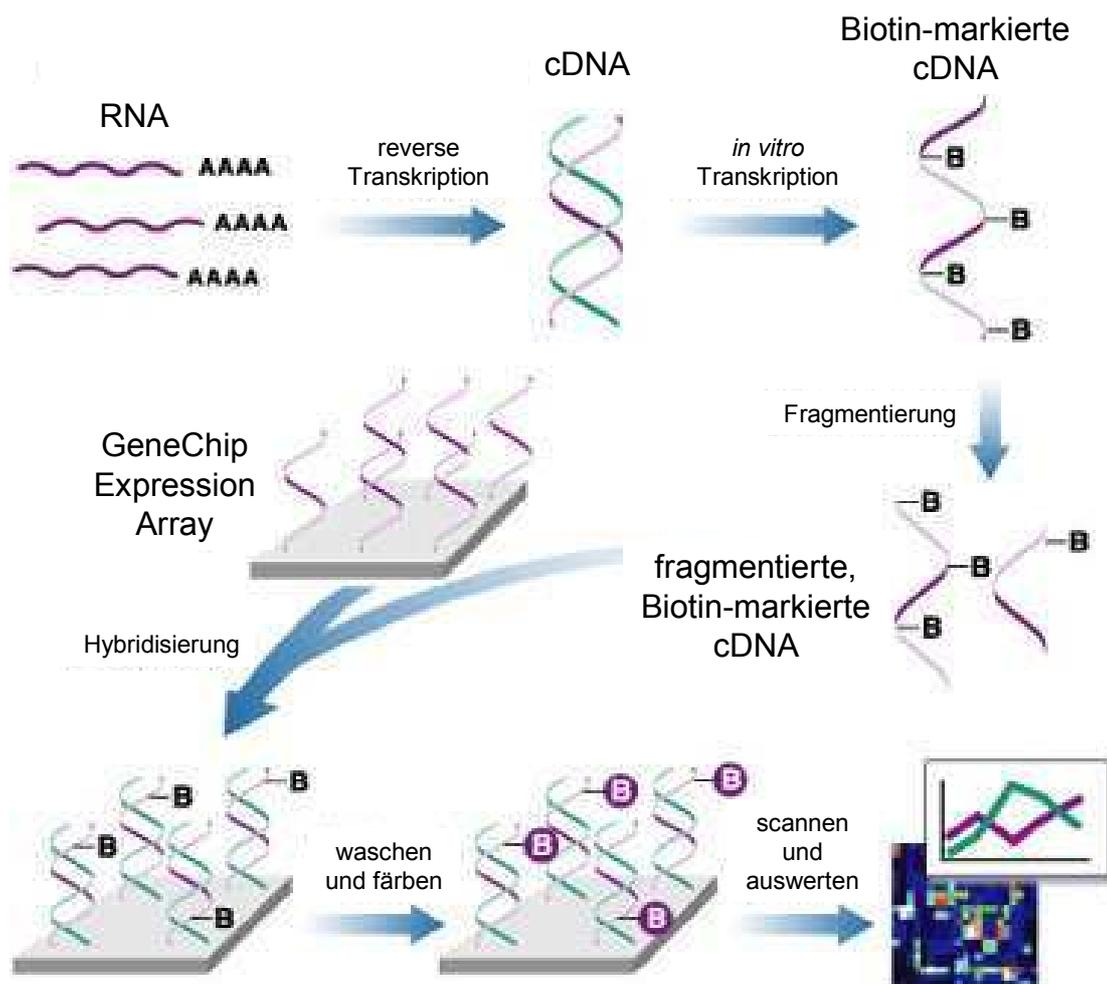


Abb. 2.4: Schematischer Überblick über die Durchführung des Microarray-Experiments. (mod. nach www. Dkfiz.de) Durch die reverse Transkription wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Nach der Synthese der cRNA (hier nicht abgebildet) wurde die cDNA unter der Verwendung Biotin-markierter Basen (CTP und UTP) durch *in vitro*-Transkription synthetisiert. Anschließend folgte die Fragmentierung der cDNA und die Hybridisierung mit dem Gene Chip Expression Array. Nach dem Waschen des hybridisierten Arrays wurde dieser mit R-Phycoerythrin-markiertem Streptavidin gefärbt.

Nach der Synthese der Erststrang-cDNA wurde die Zweitstrang-cDNA synthetisiert. Anschließend folgte die Synthese und Aufreinigung der cRNA bevor eine weitere Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte. Die restliche cRNA wurde hydrolisiert und die einsträngige cDNA aufgereinigt. Danach wurde die einsträngige cDNA fragmentiert und mit Biotin markiert. Die Hybridisierung der Microarrays mit den jeweiligen gelabelten Proben erfolgte im Hybridisierungsofen (GeneChip[®] Hybridization Oven 640, Affymetrix, Santa Clara, USA) für 16 h bei 60 rpm und 45°C. Anschließend wurden die Microarrays in der GeneChip[®] Fluidics Station 450 (Affymetrix) gewaschen und mit Streptavidin R-Phycoerythrin (SAPE, Invitrogen, USA) gefärbt. Um das Signal zu amplifizieren wurde die SAPE-Lösung zweimal hinzugefügt. Zwischen den Färbeschritten wurde ein biotinylierter anti-Streptavidin Antikörper (Vector Laboratories, CA) hinzugegeben.

2.25.4 Auswertung des Microarrays

Die Auswertung des Microarrays erfolgte mit Hilfe des GeneChip[®] Scanner 3000 (Affymetrix). Die erhaltenen Daten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Lennart Opitz (Transkriptomanalyse-labor, Universitätsmedizin Göttingen) statistisch ausgewertet. Diese statistische Auswertung enthielt unter anderem den logFC-Wert (Logarithmus *fold change*), die FDR (*false positive rate*) und den p-Wert aller aufgespotteten fast 21000 Gene. Der FC wird berechnet aus dem Verhältnis des Mittelwerts der Genexpression der drei Tumore der LPXN/TRAMP-Mäuse zu dem Mittelwert der Genexpression der drei Tumore der TRAMP-Mäuse. Die FDR gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit der logFC falsch positiv ist. Geordnet wurden die Gene nach der niedrigsten FDR.

2.26 Kinex™ Antikörper-Array

Die Untersuchung von PC-3-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression auf deregulierte Proteine erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Kinexus (Vancouver, Kanada). Dafür wurden PC-3-Zellen zunächst gemäß 2.22.2 mit siRNA gegen LPXN und als Kontrolle gegen Luciferase transfiziert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen für 48 h. Nach der Kultivierung wurden die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, in dem entsprechenden eiskalten Lysispuffer (siehe 2.6) lysiert und 4x für 10 sek sonifiziert. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Mittels Western Blot-Analyse wurde das Protein auf die Herunterregulierung der LPXN-Expression überprüft. Die Transfektion und die anschließende Proteinisolierung wurden 3x wiederholt, überprüft und anschließend gepoolt. Der Versand erfolgte auf Trockeneis, das weitere Verfahren wurde vom Hersteller durchgeführt.

2.27 GST-Pulldown

Ein Experiment, um die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachzuweisen, stellt der GST (Gluthation-S-Transferase)-*Pulldown* dar. GST tritt natürlich mit einem Molekulargewicht von 26 kDa auf und kann in *E. coli* exprimiert werden.

2.27.1 Aufreinigung der Glutathionsepharose 4-Beads

Da die GST-Sepharose in 20% Ethanol geliefert wird, wurden jeweils 200 µl der Sepharose zunächst mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend bei 500x g für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 3 x wiederholt, bevor die Sepharose in DPBS aufgenommen wurde, so dass eine 50% ige Lösung entstand.

2.27.2 GST-Pulldown-Experiment zum Interaktionsnachweis von Caldesmon und LPXN

Zum Nachweis der Interaktion von Caldesmon und LPXN wurden PC-3-Zellen zunächst wie unter 2.17.5 beschrieben mit pEGFP-Caldesmon transfiziert und das Gesamtprotein nach 48 h wie unter 2.15.1 beschrieben isoliert. Der pGEX-LPXN-, pGEX-LPXN-LIM-, pGEX-LPXN-LD-, und als Kontrolle der pGEX-4T3-Leervektor wurden in *E.coli* BL21 pLys transformiert und anschließend überexprimiert. Dazu wurden die Bakterien zunächst in 50 ml 2 x YT-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurden die Bakterien 1:25 verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte anschließend mit 1 mM IPTG für 4 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml DPBS pro 50 ml Bakterienpellet lysiert. Von nun an wurden alle Arbeitsschritte, sofern nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Nach dem Lysieren der Pellets wurde das Bakterienlysate 3 x 1 min sonifiziert und anschließend TritonX-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% hinzu gegeben. Nach 30 minütigem Schütteln wurde das Bakterienlysate bei 12000 x g für 10 min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Cup überführt. 200 µl des Bakterienüberstandes, 40 µl der aufgereinigten GST-Sepharose und 500 µg des pEGFP-Caldesmon-Proteins wurden gemischt und für 45 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 x g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und die Sepharose-Beads 3 x mit 500 µl Lysispuffer II (Glycerol-Lysispuffer) gewaschen. Nachfolgend wurden 40 µl des LDS-Sample Puffers + 1 mM DTT zu den Beads gegeben und für 5 min bei 70°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine erneute Abzentrifugation der Beads. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und auf Eis gelagert. Die Beads wurden aufbewahrt und wie unter 2.28.3 beschrieben aufgereinigt. Für den anschließenden SDS-Gellauf wurden 20 µl des Lysats eingesetzt. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit einem anti-Caldesmon spezifischen Antikörper.

2.27.3 GST-Pulldown-Experiment zum Nachweis der LPXN-abhängigen Aktivierung von RhoA und Rac

Zum Nachweis der LPXN-abhängigen Aktivierung von RhoA und Rac wurden für den GST-Pulldown die Effektoren TRBD (*Rhotekin-binding domain*) und RBD (*Rac-binding-domain*) verwendet. Diese können nur von RhoA bzw. Rac gebunden werden, wenn sie aktiviert sind. PC-3-Zellen wurden zunächst wie unter 2.22.2 beschrieben mit siRNA gegen LPXN und als Kontrolle gegen Luciferase transfiziert und nach 48 h Gesamtprotein wie unter 2.15.1 beschrieben isoliert. Die *E.coli* BL21 pLys Bakterien, welche mit pGEX-4T1-PAK-RBD, pGEX-4T1-TRBD (2.8.6) bzw. dem pGEX-4T1-Leervektor (2.8.5) transformiert wurden, wurden zunächst in 50 ml 2 x YT-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurden die Bakterien 1:25 verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37°C unter Schütteln weiter inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte anschließend mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml DPBS pro 50 ml Bakterienpellet lysiert. Von nun an wurden alle Arbeitsschritte, sofern nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Nach dem Lysieren der Pellets wurde das Bakterienlysat 3 x 1 min sonifiziert und anschließend TritonX-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% hinzu gegeben. Nach 30minütigem Schütteln wurde das Bakterienlysat bei 12000 x g für 10 min und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Cup überführt. 200 µl des Bakterienüberstandes, 40 µl der aufgereinigten GST-Sepharose und 500 µg des pEGFP-Caldesmon-Proteins wurden gemischt und für 45 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 x g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und die Sepharose-Beads 3 x mit 500 µl Lysispuffer III (2.6). Nachfolgend wurden 40 µl des LDS-Sample Puffers + 1 mM DTT zu den Beads gegeben und für 5 min bei 70°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine erneute Abzentrifugation der Beads. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt und auf Eis gelagert. Die Beads wurden aufbewahrt und wie unter 2.27.5 beschrieben aufgereinigt. Für den anschließenden SDS-Gellauf wurden 20 µl des Lysats eingesetzt. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit einem anti-Caldesmon spezifischen Antikörper.

2.27.4 *In vitro* Aktivierung von RhoA und Rac durch GTP γ S

Als Positivkontrolle für das unter 2.27.3 beschriebene *GST-Pulldown*-Experiment wurde das PC-3-Zelllysats vor der Inkubation mit dem Bakterienüberstand und der GST-Sepharose einer Behandlung mit GTP γ S unterzogen. Dafür wurden 500 μ l des Zelllysats mit 10 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0, (Endkonzentration 10 mM) gut gemischt. Anschließend wurden 5 μ l 10 mM GTP γ S (Endkonzentration 0,1 mM) zu dem Lysat gegeben, gevortext und für 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Lysat 32 μ l 1M MgCl₂ (Endkonzentration 60 mM) versetzt, gevortext und auf Eis gestellt.

2.27.5 Regenerierung der Glutathionsepharose 4 *Beads*

Zur Wiederverwendung der Glutathionsepharose 4 *Beads* wurden diese abwechselnd in einem basischen und einem sauren Puffer gewaschen. Zunächst erfolgte die Resuspension der *Beads* in 2 Vol des basischen Puffers (pH 8,5: 0,1 M Tris HCL, 0,5 M NaCl). Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die *Beads* in 2 Vol. des sauren Puffers resuspendiert. (pH 4,5: 0,1 M NaAc, 0,5 M NaCl). Nach erneuter Zentrifugation wurden die Schritte 4 – 5 x wiederholt und die *Beads* anschließend in 3 – 5 Vol PBS aufgenommen. Die regenerierte Glutathionsepharose konnte bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert und verwendet werden.

2.28 Kastration transgener Mäuse

Eine Anzahl männlicher transgener LPXN/TRAMP-, TRAMP- und LPXN-Mäuse wurde im Alter von 8 Wochen unter sterilen Bedingungen kastriert. Dafür wurde den Mäusen zur Narkotisierung zunächst 65 mg/kg Ketamin und 13 mg/kg Xylazin (siehe 2.6) subkutan gespritzt. Anschließend wurde der Leistenkanal der Mäuse beidseits durch einen Längsschnitt geöffnet und der Samenstrang aufgesucht. Dieser wurde mit einem selbstauflösenden Faden abgeschnürt und anschließend mit einer feinen Schere durchtrennt. Der abgetrennte Hoden wurde entfernt. Nach Entfernung beider Hoden und Kontrolle auf Bluttrockenheit wurde der Leistenkanal mittels zweischichtiger Klammerung verschlossen. Die Wunde wurde anschließend mit einem Wundpuder versehen und die Mäuse zum Aufwachen auf einen 37°C warmen Wärmeblock gelegt.

3 Ergebnisse

Während meiner Diplomarbeit konnten zur Analyse der Leupaxin (LPXN)-Funktion zwei verschiedene Linien doppelt transgener LPXN/TRAMP-Mäuse generiert werden (LPXN/TRAMP #19, LPXN/TRAMP #20). Diese sollten Erkenntnisse darüber geben, ob LPXN an der Progression von TRAMP-Prostatatumoren beteiligt ist. Als Kontrolle wurden einfach transgene TRAMP-Mäuse mit dem gleichen Hintergrund generiert. Während der Diplomarbeit konnten jedoch nur insgesamt neun Tiere der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Linie 19, acht Tiere der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Linie 20 und 21 Tiere der einfach transgenen TRAMP-Linie analysiert werden. Histopathologische Auswertungen deuteten bereits darauf hin, dass durch die Überexpression von LPXN die Progression der TRAMP-Tumore verstärkt ist [Beckemeyer, 2007].

Um eine signifikante Aussage über den Einfluss von LPXN auf die Progression von TRAMP-Prostatatumoren treffen zu können, war u.a. die weitere Analyse und Charakterisierung der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäuse Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.1 Einfluss von LPXN auf die Progression von Prostatakarzinomen in einem Mausmodell

Um den Einfluss von LPXN auf das Progressionsverhalten von Prostatakarzinomen (PCa) *in vivo* signifikant zu bestimmen, wurden von jeder der drei Versuchstiergruppen (doppelt transgene LPXN/TRAMP-Mäuse Linie #19, doppelt transgene LPXN/TRAMP-Mäuse Linie #20, einfach transgene TRAMP-Kontrollmäuse) zu jedem Zeitpunkt (6, 10, 14, 18, 22, 26, 30 Wochen) mindestens acht Tiere präpariert. Von jedem Tier wurden zum Zeitpunkt der Präparation das Gewicht des Urogenitaltraktes sowie das Körpergewicht gemessen. Um die Morphologie der Prostatae zu analysieren, wurden diese direkt nach der Präparation in Formalin fixiert. Nach der Einbettung in Paraffin wurden Gewebeschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (HE, siehe Material und Methoden 2.24) angefärbt. Zusätzlich zum Urogenitaltrakt wurden den Tieren Leber, Lunge, Niere, Milz und gegebenenfalls Lymphknoten entnommen und diese auf Metastasen hin untersucht. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Schweyer (Abteilung Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

3.1.1 Analyse von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen

3.1.1.1 Endogenes LPXN spielt keine Rolle bei der Entwicklung des TRAMP-Tumors

Immunhistochemische Analysen der Prostatae konnten bestätigen, dass die Expression des transgenen LPXN-cmyc ausschließlich in den Prostatae (normale Prostata und Prostatatumor) doppelt transgener LPXN/TRAMP-Mäuse zu detektieren ist. In den Prostatae einfach transgener TRAMP-Kontrollmäuse konnte keine LPXN-Expression detektiert werden. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass durch die Überexpression des SV40 *large T*- und *small t*-Antigens (T/t-Ag), die zur Entwicklung des TRAMP-Tumors führen, die Expression des endogenen LPXN beeinflusst wird (Abb. 3.1).

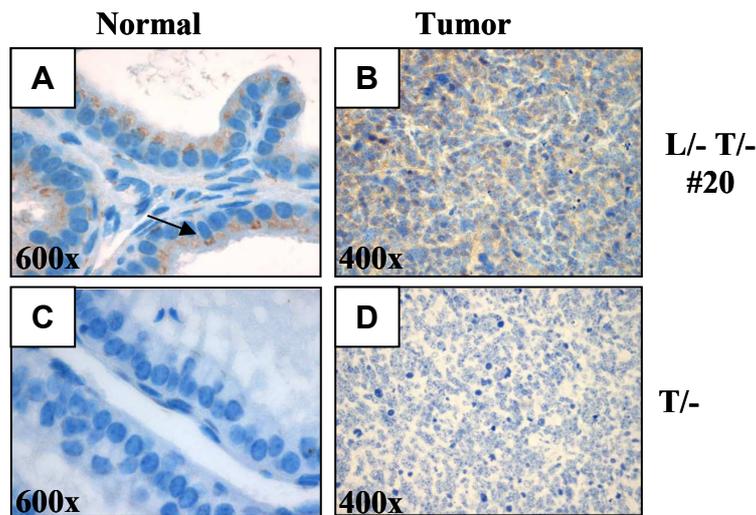


Abb. 3.1: Immunhistochemische Analyse zur Detektion von LPXN in den Gewebeschnitten der Prostata doppelt und einfach transgener Mäuse [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Zur Detektion von LPXN in den Gewebeschnitten der Prostata von doppelt transgenen LPXN/TRAMP- (L/-T/-) und einfach transgenen TRAMP (T/-)-Mäusen wurde eine immunhistochemische Analyse mit einem LPXN-Antikörper (283G) durchgeführt. Im Prostataepithel (A, 600fache Vergrößerung) und im Prostatatumor (B, 400fache Vergrößerung) doppelt transgener Mäuse (hier L/-T/- #20) ist eine deutliche Anfärbung des LPXN-cmyc zu erkennen (A, Pfeil). Im Prostatagewebe einfach transgener TRAMP- (T/-) Mäuse ist sowohl im normalen Prostataepithel als auch im Prostatatumor keine LPXN-Expression zu detektieren (C, 600fache Vergrößerung und D, 400fache Vergrößerung).

3.1.1.2 Analyse der Tumormasse doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse

Zur Ermittlung der relativen Tumormasse der Versuchsmäuse wurde jeweils das Gewicht des Urogenitaltraktes (GU) zum Zeitpunkt der Präparation gegen das Körpergewicht aufgetragen. Die logarithmische Trendlinie der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäuse (L/-T/- #19- und L/-T/- #20) verläuft zu jedem Zeitpunkt oberhalb der Trendlinie der einfach transgenen TRAMP-Kontrollmäuse (T/-). Dies weist auf eine erhöhte Tumormasse und somit auf einen aggressiveren Verlauf des PCa durch die Überexpression von LPXN hin (Abb. 3.2).

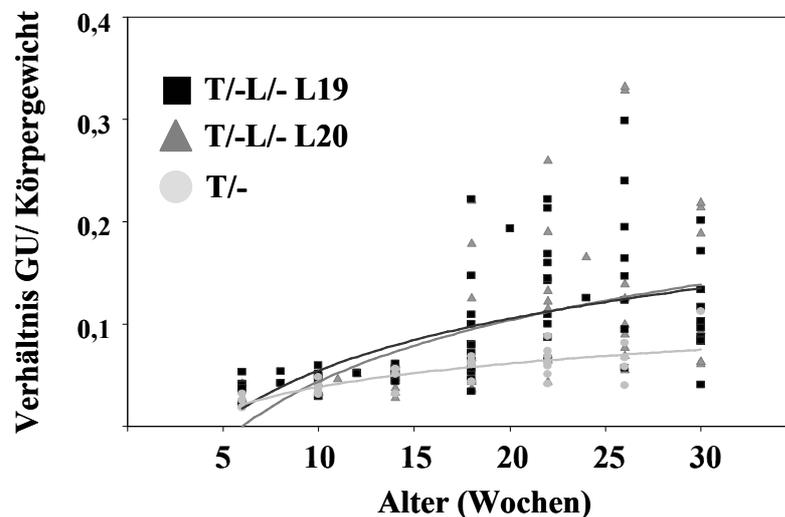


Abb. 3.2: Vergleich der relativen Tumormassen der doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäuse [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Von der sechsten Woche an, im Abstand von vier Wochen, wurden mindestens acht Mäuse jeder Versuchstiergruppe (L/-T/- #19, L/-T/- #20, T/-) abgetötet, der Urogenitaltrakt entnommen und gewogen. Die logarithmische Trendlinie aus dem Verhältnis von Urogenitaltraktgewicht (GU) zum Körpergewicht demonstriert zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere relative Tumormasse in beiden doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mauslinien im Vergleich zu den einfach transgenen TRAMP-Mäusen.

3.1.1.3 Analyse der Morphologie der Prostatae doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse

Zusätzlich zu der Tumormasse der Versuchsmäuse wurden weiterhin die Gewebeschnitte der Prostatae der doppelt (L/-T/-) und einfach (T/-) transgenen Mäuse histopathologisch analysiert. Die Morphologie der Prostatae wurde anschließend einem Stadium des progressiven PCa zugeordnet. Dabei wurden die Prostata intraepitheliale Neoplasie (PIN), das gut differenzierte Karzinom (WDC) und das schlecht differenzierte Karzinom (PDC) als verschiedene Stadien des PCa gewählt.

Im Alter zwischen 18 und 26 Wochen entwickelte die Mehrheit der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäuse beider Linien (L/-T/- #19 und L/-T/- #20) bereits ein PDC, während der am häufigsten auftretende Phänotyp bei den Kontrollmäusen (T/-) die PIN ist. Daher wurde in Abbildung 3.3 stellvertretend für die am häufigsten vorkommende morphologische Veränderung der Prostata in jeder Versuchstiergruppe und zu jedem der drei Zeitpunkte der Gewebeschnitt eines Tieres abgebildet. Die PIN bezeichnet ein Stadium, bei dem die Zellen des Prostataepithels beginnen zu entarten. Langgezogene, größere Zellkerne verwischen die sonst gleichmäßige Struktur nebeneinander angeordneter Zellen des Epithels. Weiterhin entsteht eine siebartige Form der Prostata Drüsen, wobei verstärkt Mitosen und Apoptosen zu erkennen sind (vergl. Abb. 3.3 G-I). Ein PDC zeichnet sich durch das Vorkommen von pleomorphen Zellen mit unregelmäßigen, großen Zellkernen und wenig Zytoplasma aus. Außerdem sind große nekrotische Areale und eine hohe Vaskularisation des Tumorgewebes bezeichnend für ein PDC. Die verbliebenen Drüsen sind meistens vollkommen vom Tumorgewebe eingeschlossen (vergl. Abb. 3.3 A-F). Als zusätzliche Kontrolle wurden, wie in Abbildung 3.3 zu erkennen, Gewebeschnitte der Prostatae von einfach transgenen LPXN-Mäusen angefertigt. Diese zeigen keine morphologische Veränderung des Prostatagewebes (Abb. 3.3 J-L). Dadurch kann wiederum ausgeschlossen werden, dass LPXN an der Initiation des Prostatatumors beteiligt ist, sondern ausschließlich an der Progression.

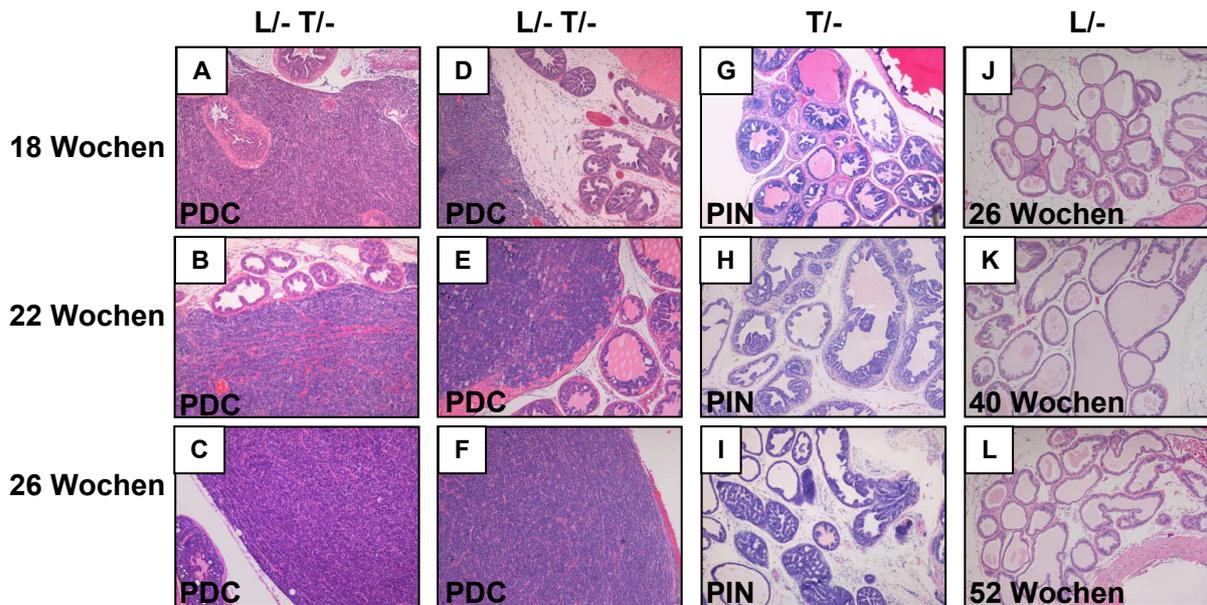


Abb. 3.3: Die Überexpression von LPXN resultiert in einer verstärkten Progression des TRAMP-Tumors [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Histopathologische Analysen von mindestens acht Mäusen jeder Versuchstiergruppe (L/-T/- #19, L/-T/- #20, T/-) zu jedem angegebenen Zeitpunkt ergaben einen signifikanten Unterschied in der Tumorentwicklung von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen (L/-T/-) im Vergleich zu einfach transgenen TRAMP-Mäusen (T/-). Während bei den L/-T/- Mäusen im Alter von 18 bis 26 Wochen die am häufigsten auftretende morphologische Veränderung der Prostata das schlecht differenzierte Karzinom (PDC) war (A-F), konnte in den (T/-)-Kontrollmäusen am zahlreichsten das Anfangsstadium der Tumorentwicklung, die Prostata intraepitheliale Neoplasie (PIN), beobachtet werden (G-I). Transgene LPXN-Mäuse (L/-) entwickelten bis zu einem Alter von 52 Wochen keinen Prostatatumor (J-L). Alle Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit einer 40fachen Vergrößerung angefertigt.

In Abbildung 3.4 werden alle analysierten Mäuse mit Angabe des jeweiligen histologischen Befundes zusammengefasst. 56% (n=9) der doppelt transgenen Mäuse der Linie #19 bildeten im Alter von 18 Wochen ein PDC aus, während im Alter von 22 Wochen bereits 93% aller untersuchten Mäuse dieser Versuchstiergruppe das Stadium des PDC aufwiesen. Zum Zeitpunkt von 26 Wochen konnte bei allen untersuchten doppelt transgenen Mäusen der Linie #19 durch die verstärkte Expression von LPXN ausschließlich ein PDC festgestellt werden. Bei der Kontrollgruppe der einfach transgenen TRAMP-Mäuse war ein deutlich milderer Verlauf des PCa zu erkennen. Im Alter von 18 Wochen war nur bei 12,5% der untersuchten Mäuse (n=1) ein PDC zu erkennen, während im Alter von 26 Wochen der Prozentsatz nur unwesentlich angestiegen war (16% (n=2)). Der am häufigsten beobachtete histologische Befund der Prostata in der (T/-)-Kontrollgruppe war zu jedem Zeitpunkt das Anfangsstadium der Tumorentwicklung, die PIN (Abb. 3.4).

A

18 Wochen	Mäuse [n]	PIN [n (%)]	WDC [n (%)]	PDC [n (%)]	Metastasen [n (%)]
T/-	8	6 (75%)	1 (12.5%)	1 (12.5%)	0
L/- T/- #19	16	6 (38%)	1 (6%)	9 (56%)	1 (7%)
L/- T/- #20	12	4 (33.5%)	1 (8%)	7 (58.5%)	1 (8%)
22 Wochen					
T/-	9	7 (78%)	1 (11%)	1 (11%)	0
L/- T/- #19	14	0	1 (7%)	13 (93%)	6 (43%)
L/- T/- #20	10	3 (30%)	0	7 (70%)	1 (10%)
26 Wochen					
T/-	12	6 (50%)	3 (25%)	2 (16%)	1 (8%)
L/- T/- #19	12	0	0	12 (100%)	6 (50%)
L/- T/- #20	9	2 (22%)	1 (11%)	6 (67%)	5 (55%)

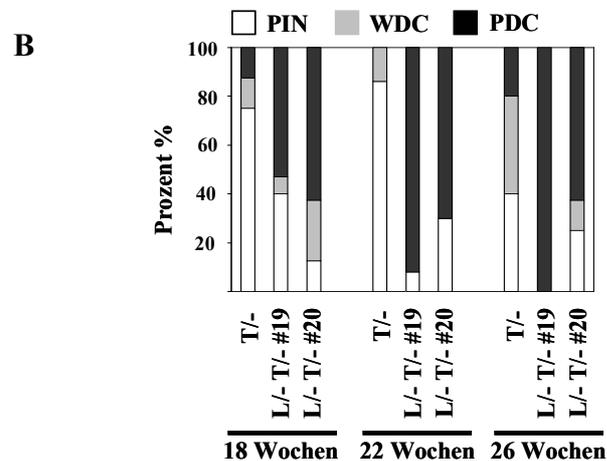


Abb. 3.4: LPXN verstärkt die Progression von TRAMP-Tumoren [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. A. Die morphologische Analyse der Prostatae doppelt transgener LPXN/TRAMP-Mäuse zweier Linien (L/-T/- #19, L/-T/- #20) im Vergleich zu den Prostatae einfach transgener TRAMP-Mäuse (T/-) an Hand von Gewebeschnitten zeigt einen deutlich aggressiveren Verlauf des Prostatatumors in den Mäusen mit erhöhter LPXN-Expression. Die Einteilung der Progressionsstadien des Tumors erfolgte in Prostata intraepitheliale Neoplasie (PIN), gut differenziertes Karzinom (WDC) und schlecht differenziertes Karzinom (PDC). B. Der grafische Überblick betont den erhöhten Anteil schlecht differenzierter Karzinome in den doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen im Vergleich zu den einfach transgenen TRAMP-Mäusen durch die Überexpression von LPXN.

3.1.1.4 Analyse zur Bildung von Fernmetastasen in doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäusen

Um den Einfluss von LPXN auf die Entwicklung von Metastasen im TRAMP-Prostatatumor zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von verschiedenen Organen doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse angefertigt, mit HE gefärbt und analysiert (Material und Methoden, 2.24). Es konnte festgestellt werden, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten die Bildung von Metastasen in Leber, Lunge oder Lymphknoten in den doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen stark erhöht war. Im Alter von 26 Wochen entwickelten 40% der LPXN/TRAMP-Mäuse der Linie 19 (L-T- #19) und 55% der LPXN/TRAMP-Mäuse der Linie 20 (L-T- #20) Fernmetastasen, während in den TRAMP-Mäusen (T-) zum gleichen Zeitpunkt nur bei 10% der untersuchten Tiere Metastasen detektiert werden konnten (vergl. Abb. 3.4 und Abb. 3.5).

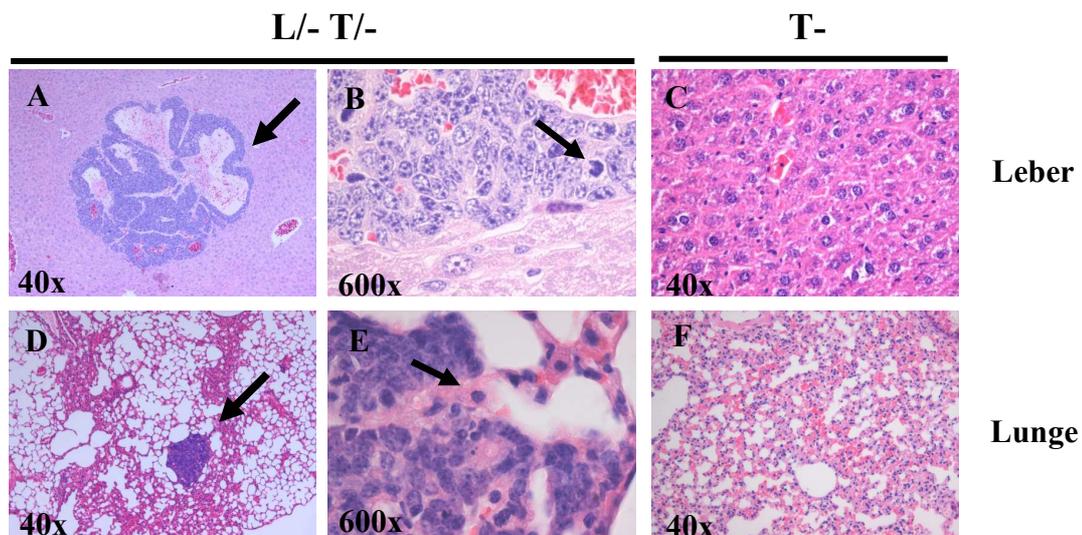


Abb. 3.5: LPXN verstärkt die Bildung von Fernmetastasen beim TRAMP-Prostatatumor [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Zur Analyse der Bildung von Metastasen wurden Gewebeschnitte von Lymphknoten, Leber, Lunge, Niere und Milz doppelt (L/-T/-) und einfach transgener (T/-) Mäuse angefertigt, mit HE gefärbt und analysiert. Mehr als 50% der 26 Wochen alten doppelt transgenen L/-T/- Mäuse entwickelten Fernmetastasen in Lymphknoten, Leber oder Lunge (A + B, D + E), während bei den einfach transgenen T/- Mäusen bei weniger als 10% Metastasen detektiert werden konnten (C + F). Bei 600facher Vergrößerung der Leber- und Lungenmetastase sind deutlich die typischen Mitosen im Tumorgewebe zu erkennen (B + E, Pfeile).

Weiterhin wurden zur Überprüfung der Metastasen immunhistochemische Analysen mit einem SV40 T-Ag spezifischen Antikörper durchgeführt (Material und Methoden, 2.24). Stammen die Metastasen vom Prostata-Primärtumor ab, muss das SV40T/t Ag, welches transgen in der Prostata von TRAMP-Tumoren überexprimiert wird, auch in den Metastasen detektiert werden können. Dafür wurden Gewebeschnitte der präparierten Organe angefertigt und diese mit einem SV40 T-Ag-Antikörper behandelt. Wie in Abbildung 3.6 zu erkennen, exprimieren auch die Metastasen (hier Lymphknoten) das SV40 T/t-Ag (A + B). Als Positivkontrolle wurde ein Gewebeschnitt eines Prostata-Tumors dargestellt, als Negativkontrolle ein Gewebeschnitt des Nebenhodens. Dieses Gewebe zeigt keine spezifische SV40 T-Ag Kernfärbung (E + F).

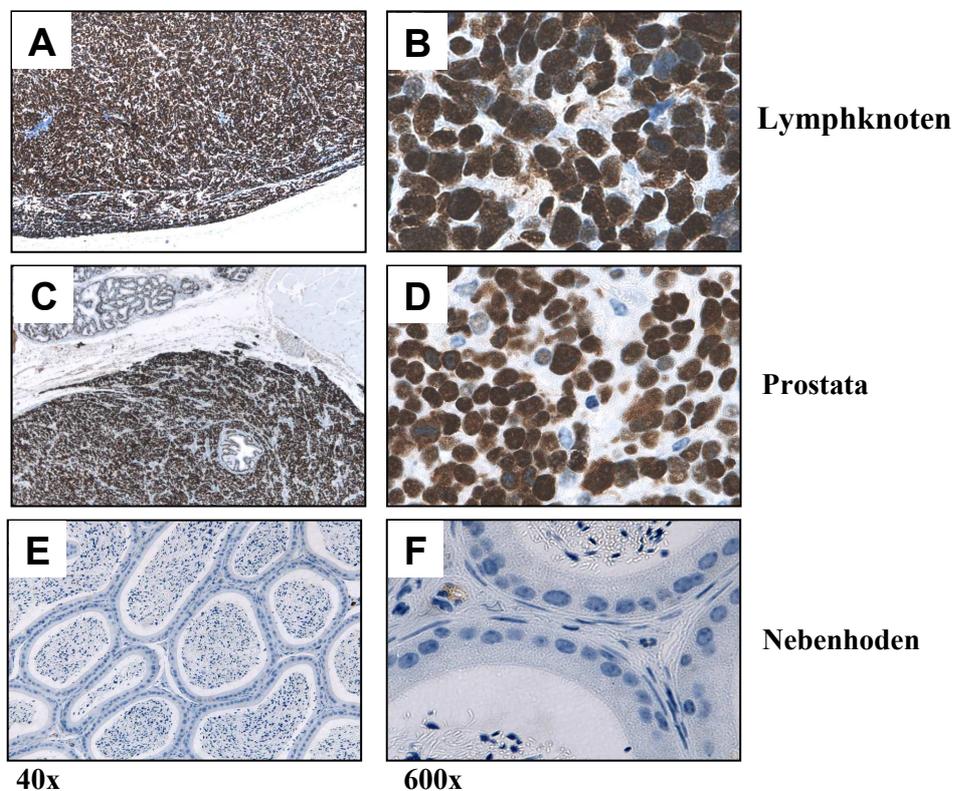


Abb. 3.6: Immunhistochemische Analyse zur Expression des transgenen SV40 T-Ag in Metastasen von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen. Zur Überprüfung, ob die gebildeten Metastasen in den Organen der doppelt und einfach transgenen TRAMP-Mäuse vom transgenen Prostata-Primärtumor abstammen, wurde eine immunhistochemische Analyse mit einem SV40 T-Ag-spezifischen Antikörper durchgeführt. Dazu wurden die Organe sowie der Urogenitaltrakt der Mäuse präpariert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden dann mit einem SV40 T-Ag-Antikörper behandelt. In den Lymphknotenmetastasen der LPXN/TRAMP-Mäuse können starke Signale für SV40 T-Ag in den Zellkernen detektiert werden (A. 40fache Vergrößerung, B. Ausschnitt aus A, 600fache Vergrößerung). Als Positivkontrolle, und um nachzuweisen, dass das SV40 T-Ag-Transgen in dem Prostata-Tumor stabil ist, wurde eine SV40 T-Ag-Färbung an Prostatagewebe durchgeführt. In den Ausschnitten C (40fache Vergrößerung) und D (600fache Vergrößerung) ist deutlich zu

erkennen, dass die Expression von SV40 T-Ag im Prostata tumor vorhanden ist. Ausschnitt E (40fache Vergrößerung) und Ausschnitt F (600fache Vergrößerung) zeigen in der Negativkontrolle, dass die Expression von SV40 T-Ag nicht im Nebenhoden zu detektieren ist und somit ausschließlich auf die Prostata und die aus dem Tumor stammenden metastasierenden Zellen beschränkt ist.

3.1.2 LPXN erhöht die Progression von Prostatakarzinomen in kastrierten TRAMP-Mäusen

Bei der Progression des Prostatakarzinoms nimmt der Androgenrezeptor (AR) eine bedeutende Stellung ein [Heinlein und Chang, 2004]. Dabei wird beschrieben, dass vor allem eine erhöhte AR-Aktivität die Entwicklung vom androgen-abhängigen zum androgen-unabhängigen Rezidiv fördert. Dieses androgen-unabhängige Stadium ist ebenfalls Ergebnis und Problem der humanen Antiandrogen-Therapie.

Kaulfuss *et al.* konnten 2008 zeigen, dass LPXN *in vitro* mit dem Androgenrezeptor sowohl interagiert als auch dessen transkriptionelle Aktivität erhöht. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob LPXN auch in die Progression androgen-unabhängiger Prostata tumore involviert ist, z.B. durch die Koaktivierung des AR.

Um das Tumorwachstum nach Androgen-Unterdrückung *in vivo* zu imitieren, wurden die Versuchsmäuse einer Kastration unterzogen (Material und Methoden, 2.28). Das operative Entfernen der Testes resultierte in einem vollkommenen Androgenentzug (siehe 3.1.2.1). Jeweils 20 Tiere doppelt transgener LPXN/TRAMP-Mäuse der Linie #19, einfach transgener TRAMP-Kontrollmäuse sowie einfach transgener LPXN-Mäuse wurden im Alter von acht Wochen kastriert. In der Folgezeit wurden die Größe der Prostata tumore durch wöchentliches Abtasten der unteren Bauchregion und der Gesundheitszustand der Tiere beobachtet. Kachektische Tiere oder Tiere mit einer TumorgroÙe von ca. 1500-2000mm³ wurden abgetötet und die Prostata, Leber, Lunge, Niere, Milz und gegebenenfalls die Lymphknoten herauspräpariert und in Formalin fixiert (Abb. 3.7). Nach der Einbettung in Paraffin wurden die Gewebeschnitte histopathologisch in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Schweyer (Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung Pathologie) analysiert.

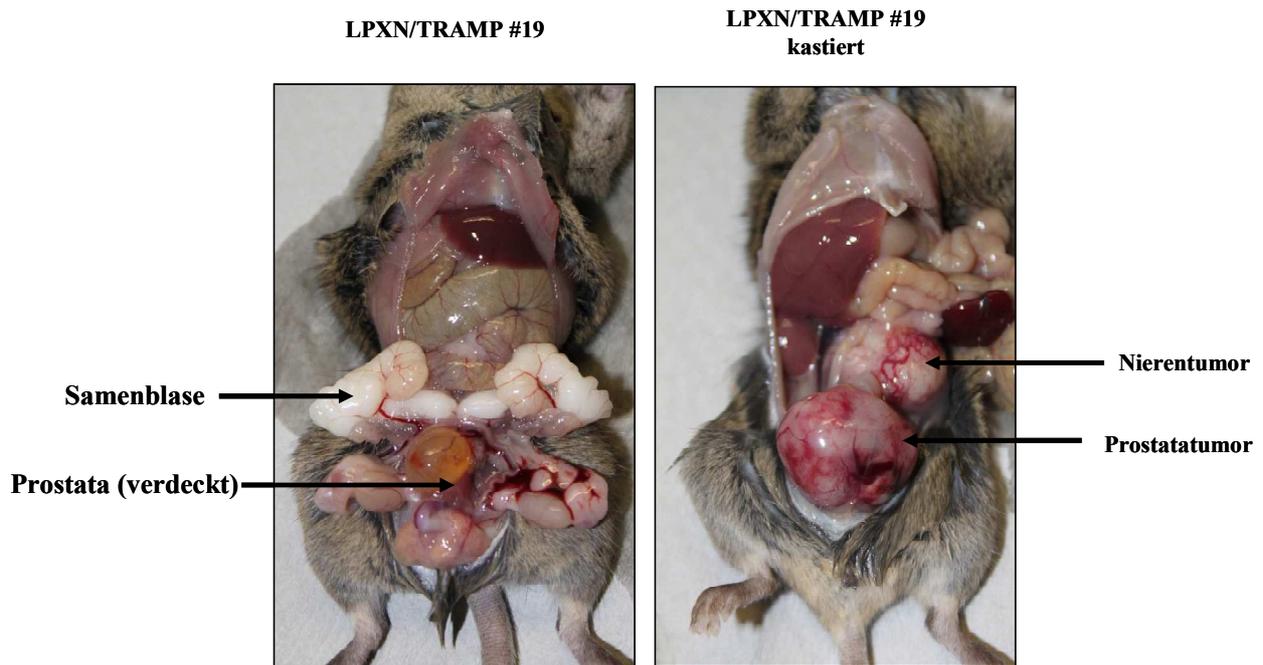


Abb. 3.7: Präparation von kastrierten doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen. Bei der Kastration der Tiere werden die Testes operativ entfernt. Der dadurch entstehende Androgenentzug resultiert in einer Verkümmern der Samenblasen (vergl. LPXN/TRAMP #19 und LPXN/TRAMP #19 kastriert). Tiere mit einem Tumolvolumen von ca. 1500-200mm³ wurden unabhängig vom Alter abgetötet (LPXN/TRAMP #19 kastriert). Prostata, Leber, Lunge, Niere, Milz und gegebenenfalls Lymphknoten wurden herauspräpariert und in Formalin fixiert. Anschließend wurden zur Analyse der Morphologie von allen Organen Gewebeschnitte angefertigt.

3.1.2.1 Überprüfung der Expression des transgenen SV40 T-Ag in den kastrierten Mäusen als Indiz für den Erfolg der Kastration

Bei der Präparation der Mäuse wurde von allen Organen Gewebestücke für RNA- und Proteinisierungen konserviert. Nach der Isolierung des Gesamt-Proteins wurde eine Western Blot-Analyse mit einem SV40 T-Ag-spezifischen Antikörper durchgeführt. SV40 T-Ag und LPXN stehen unter der Kontrolle des AR-abhängigen Probasin-Promotors der Ratte. Eine erfolgreiche Kastration und damit ein Entzug der Androgene sollte in einem Verlust der Expression des SV40 T-Ag (und LPXN) resultieren. Die Western Blot-Analyse zeigt, dass, wie erwartet, vier Tage nach der Kastration die Expressionsstärke des SV40 T-Ag zurückging. Vier Wochen nach der Kastration konnte jedoch wieder eine SV40 T-Ag-Expression detektiert

werden. Im Prostatatumor, vier Monate nach der Kastration, konnte ebenfalls SV40 T-Ag nachgewiesen werden. Als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen HSC70 verwendet (Abb. 3.8).

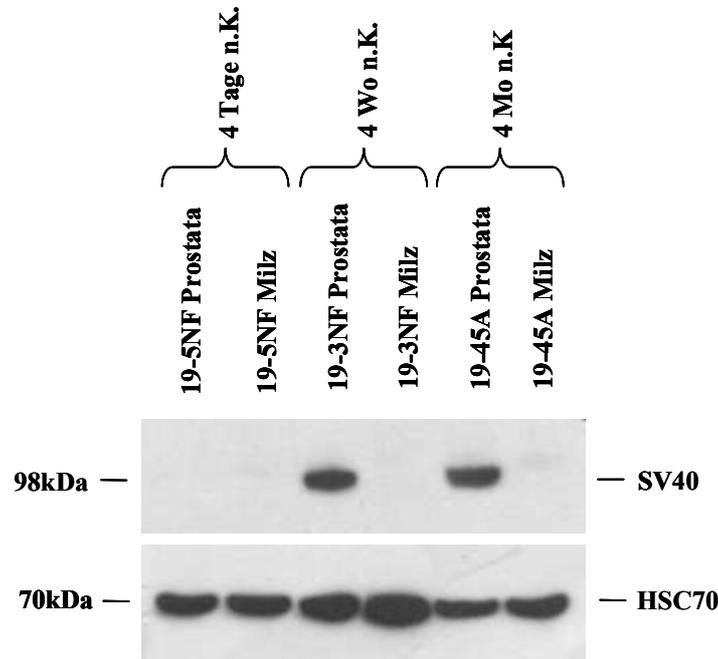


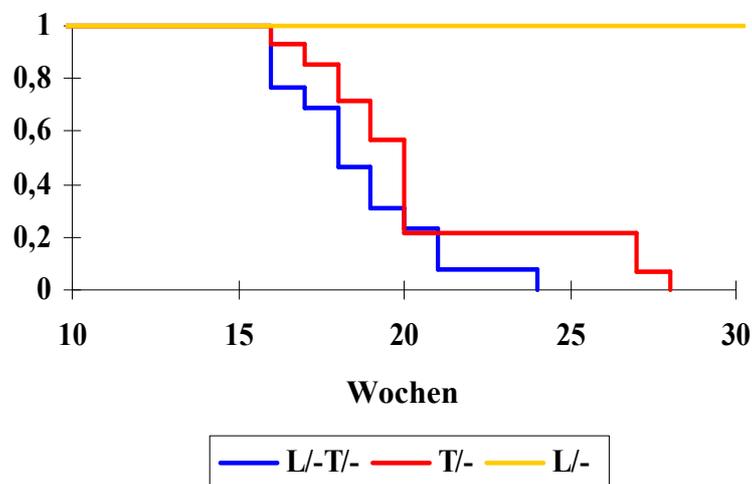
Abb. 3.8: Western Blot-Analyse zur Expression des SV40 T-Ag in den Prostatae kastrierter LPXN/TRAMP-Mäuse. Doppelt transgene LPXN/TRAMP-Mäuse wurden vier Tage (19-5NF), vier Wochen (19-3NF) und vier Monate (19-45A) nach der Kastration abgetötet und die Prostatae herauspräpariert. Anschließend wurde aus den Prostatageweben Gesamt-Protein isoliert und 50 µg für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Detektion des SV40 T-Ag erfolgte mit einem SV40 T-Ag-Antikörper, der bei der für SV40 T-Ag erwarteten Größe von 98 kDa eine spezifische Bande darstellt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen HSC70 verwendet. Vier Wochen sowie vier Monate nach der Kastration konnte die Expression von SV40 T-Ag in den Prostatae der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäuse 19-3NF und 19-45A nachgewiesen werden. Wie erwartet, geht die Expression des SV40 T-Ag direkt nach der Kastration zunächst zurück (19-5NF).

3.1.2.2 Analyse der Tumorentwicklung in kastrierten doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen

Die kastrierten doppelt (L/-T/-) und einfach (T/-) transgenen Versuchstiere wurden erst präpariert, wenn sich ihr Gesundheitszustand verschlechterte oder wenn der Prostatatumor eine definierte Größe erreicht hatte. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Präparation wurde notiert und daraus eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve erstellt. Es kann festgestellt werden, dass in den

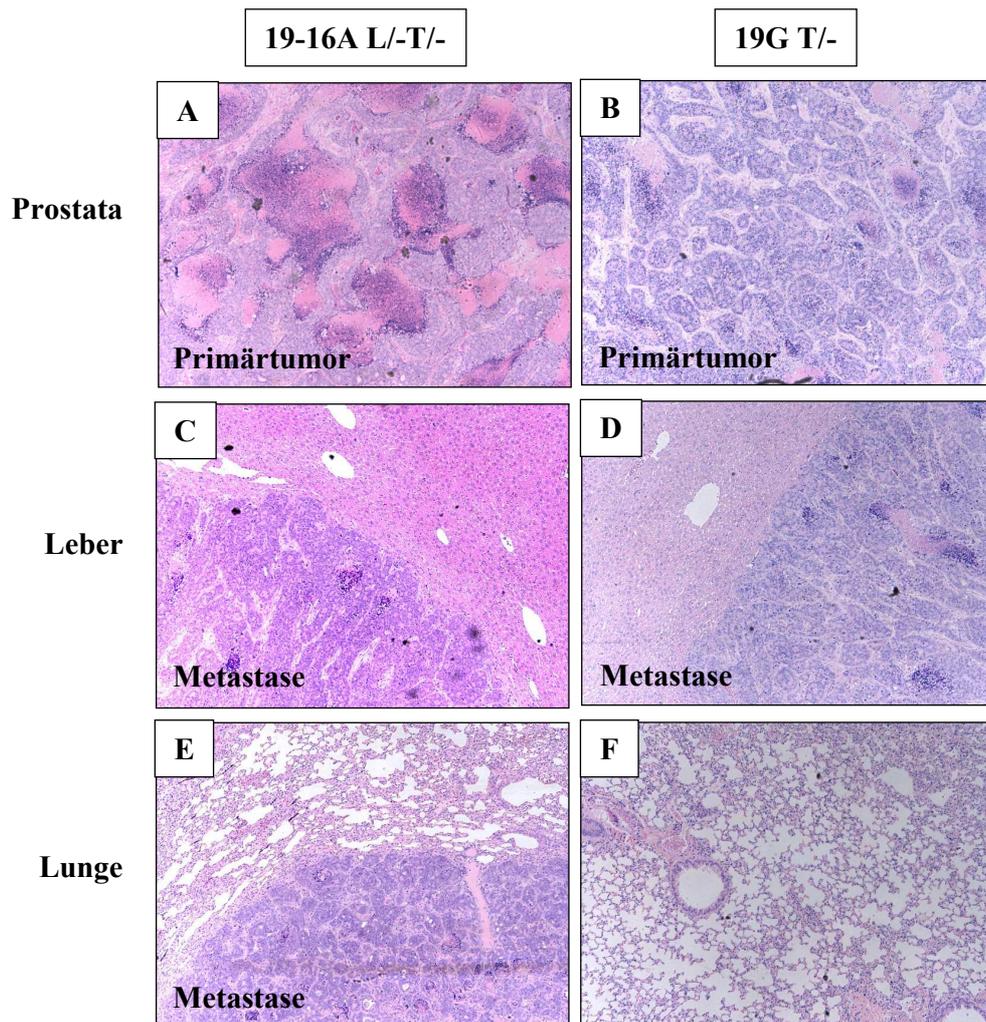
doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 18,7 Wochen ein noch aggressiverer Verlauf der Tumorprogression stattfindet. Die einfach transgenen TRAMP-Mäuse erreichten ein durchschnittliches Lebensalter von 20,6 Wochen (Abb. 3.9). Durch die Untersuchung der Gewebeschnitte wurde die Bildung von Metastasen in den entnommenen Organen beobachtet. In 64% der untersuchten doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäuse konnten Metastasen in Lunge, Leber, Niere oder Lymphknoten detektiert werden (Abb. 3.9 und Abb. 3.10). Da es durch Infektionen der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäuse #20 zu einer Verminderung der kastrationsfähigen Tiere kam, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt diese Linie nicht mit in die Statistik einfließen. Als Kontrolltiere wurden die Mäuse der einfach transgenen LPXN-Linie kastriert und im Alter von 56 Wochen abgetötet. Bis dato deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch den Androgenentzug die Tumorprogression, einschließlich der Bildung von Metastasen, sowohl in den doppelt transgenen LPXN/TRAMP- als auch in den einfach transgenen TRAMP-Mäusen beschleunigt ist. In den doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen verläuft dennoch die Tumorprogression durch die Überexpression von LPXN aggressiver.

Kumulative Überlebensfunktion



	Anzahl der Tiere	Mittlere Überlebensdauer	Standardabweichung	Untergrenze (95%)	Obergrenze (95%)	Metastasen
L/-T/-	14	18,7	0,654	17,4	20,0	64%
T/-	14	20,6	1,025	18,6	22,6	64%
L/-	10	56,0				0%

Abb. 3.9: Kaplan-Meier-Kurve zur statistischen Analyse der Überlebensrate doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse nach Kastration. Die kumulative Überlebensfunktion der doppelt transgenen LPXN/TRAMP- ($L/-T/-$), einfach transgenen TRAMP- ($T/-$) und einfach transgenen LPXN- ($L/-$) Mäuse zeigt, dass die Kurve der $L/-T/-$ Mäuse (blau) zu jedem Zeitpunkt vor der Kurve der $T/-$ Kontrollmäuse liegt. Während die mittlere Überlebensdauer der $L/-T/-$ Mäuse bei 18,7 Wochen liegt, ist das durchschnittlich erreichte Alter der $T/-$ Mäuse 20,6 Wochen. Die $L/-$ Kontrollmäuse, welche keinen Prostatatumor entwickeln, wurden im Alter von 56 Wochen abgetötet. In 64% der $L/-T/-$ und $T/-$ Mäuse konnten Metastasen in Lunge, Leber oder Lymphknoten detektiert werden.



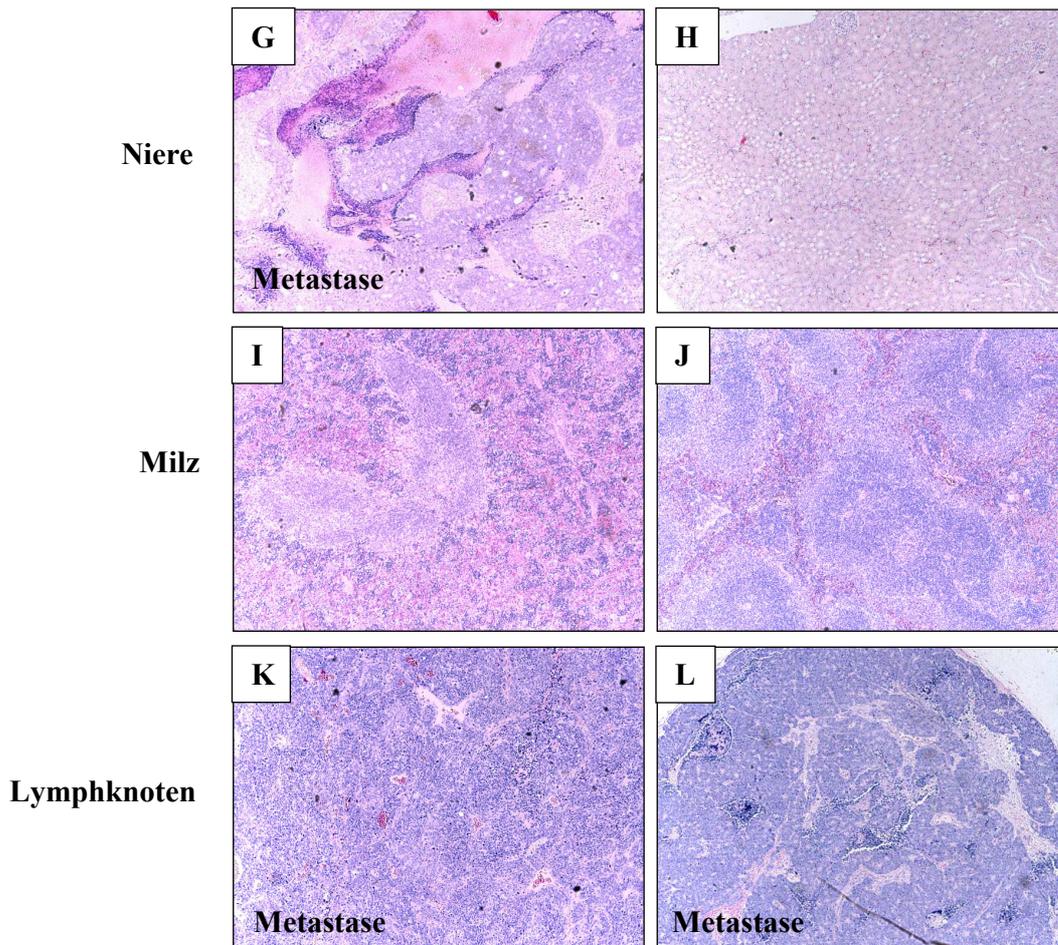


Abb. 3.10: Histopathologische Analyse zur Überprüfung der morphologischen Veränderung der Organe von doppelt (L/-T/-) und einfach (T/-) transgenen kastrierten Mäusen. Allen kastrierten Mäusen wurde nach dem Abtöten ein Teil des Prostatatumors, der Leber, der Lunge, der Niere, der Milz und ggf. die Lymphknoten herausgenommen, in Formalin fixiert und HE-Schnitte angefertigt. In allen bisher untersuchten Mäusen konnte ein schlecht differenzierter Prostatatumor, sowie in 64% der doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäuse Metastasen in Leber, Lunge, Niere oder Lymphknoten beobachtet werden. Stellvertretend werden hier die HE-Schnitte der Mäuse 19-16A (L/-T/-) und 19G (T/-) dargestellt. In den HE-Schnitten der L/-T/-Maus 19-16A konnten Metastasen in Leber, Lunge, Niere und Lymphknoten detektiert werden (C, E, G, K). In den HE-Schnitten der T/- Maus 19G konnten Metastasen in Leber und in den Lymphknoten beobachtet werden. Alle Abbildungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.2 Einfluss von LPXN auf das Migrations- und Invasionsverhalten von primären Prostatakarzinomzellen

Die *in vivo*-Daten, die aus den bisherigen Versuchen gewonnen werden konnten, lassen eindeutig den Schluss zu, dass LPXN die Progression der TRAMP-Tumore beschleunigt. Weiterhin erhöht LPXN die Entwicklung von Metastasen in Lymphknoten, Leber, Lunge und Niere. Um diese Daten auch *in vitro* zu bestätigen, wurden Primärzellen aus den murinen Prostatakarzinomen etabliert und näher charakterisiert.

3.2.1 Etablierung einer Primärzellkultur aus Prostatatumoren doppelt transgener LPXN/TRAMP- und einfach transgener TRAMP-Mäuse

Zur funktionellen Analyse von LPXN *in vitro* wurde aus den Tumoren der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäuse (L/-T-) und der einfach transgenen TRAMP-Kontrollmäuse (T/-) Primärzellen isoliert und in Kultur gebracht (siehe Material und Methoden, 2.17.2). Zur Überprüfung der Ausbeute epithelialer Primärzellen nach der Isolierung wurden die Zellen auf einem Objektträger ausplattiert, fixiert und immunzytochemisch mit einem SV40 T-Ag-Antikörper analysiert, da nur die Epithelzellen der Prostata das SV40 Transgen überexprimieren (Abb. 3.11). Die Zellklone 72A und 83A aus Tumoren der L/-T/- Mäuse und die Zellklone 27F und 45F aus Tumoren der T/- Mäuse wiesen den höchsten Anteil von Epithelzellen (90-100%) auf und wurden für die folgenden Experimente verwendet.

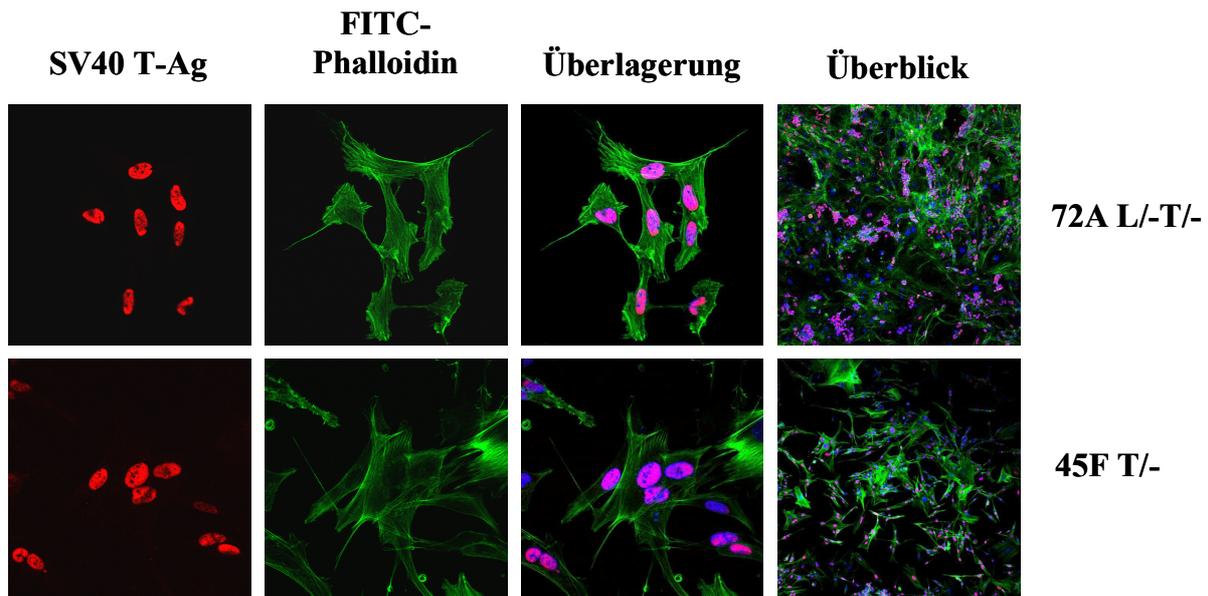


Abb. 3.11: Immunzytochemische Analyse zur Darstellung des Epithelzell-Anteils in den Primärzellkulturen [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Zur Untersuchung der progressiven Eigenschaften von LPXN in TRAMP-Tumoren wurden primäre Zellkulturen etabliert. Dazu wurden aus den Tumoren doppelt transgener LPXN/TRAMP- (L/-T/-) und einfach transgener TRAMP- (T/-) Mäuse die Prostatatumore herauspräpariert und die Zellen isoliert. Die doppelt transgenen Primärzellklone L/-T/- (83A und 72A, hier 72A L/-T/-) und die einfach transgenen Primärzellklone T/- (27F und 45F, hier 45F T/-) wiesen die höchste Ausbeute an SV40 T-Ag-positiven und damit an Epithelzellen auf. Zur Visualisierung des F-Aktins des Zytoskeletts wurden die Zellen mit FITC-Phalloidin (grün) behandelt. Die Kerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Die Überlagerung zeigt eine deutliche SV40 T-Ag-Färbung in den Kernen. Bis auf die Überblick-Bilder (100fache Vergrößerung) wurden alle Bilder in 600facher Vergrößerung aufgenommen.

Als weitere Kontrolle und zum Nachweis der bestehenden LPXN-Expression in den Primärzellen aus den doppelt transgenen Prostatatumoren wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Während die SV40 T-Ag-Expression in allen isolierten Primärzellen zu erkennen ist, kann die Expression des transgenen LPXN (tLPXN-cmyc, 60 kDa) ausschließlich in den Zellklonen 83A und 72A (L/-T/-) nachgewiesen werden. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet (Abb. 3.12).

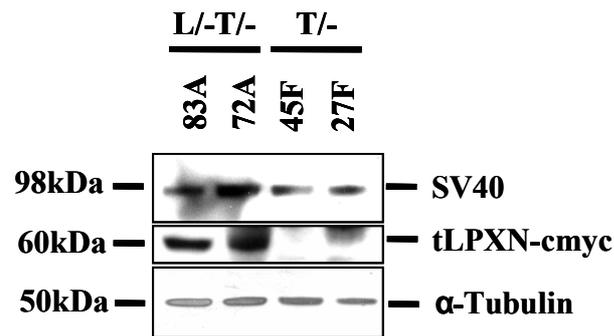


Abb. 3.12: Western Blot-Analyse zur Detektion des transgenen LPXN-cmyc in Primärzellen von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Aus den Primärzellklonen 83A und 72A der doppelt transgenen LPXN/TRAMP- (L/-T/-) Mäuse sowie 45F und 27F der einfach transgenen TRAMP (T/-) Mäuse wurde Protein isoliert und jeweils 70 µg für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Mit einem spezifischen SV40 T-Ag -Antikörper konnte in allen Zellen das transgene SV40 T-Ag bei einer Größe von 98 kDa nachgewiesen werden. Die Detektion des transgenen LPXN (tLPXN-cmyc) in den Primärzellen (83A L/-T/- und 72A L/-T/-) erfolgte mit einem LPXN-spezifischen Antikörper. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde die Membran mit einem α-Tubulin Antikörper hybridisiert.

3.2.2 LPXN erhöht das Migrations- und Invasionsverhalten von primären PCa-Zellen

Die Aggressivität von Tumorzellen, aus der eine beschleunigte Tumorprogression resultiert, ist durch eine verstärkte Migration bzw. Invasion gekennzeichnet [Grossmann *et al.*, 2001; Bogenrieder *et al.*, 2003]. Um zu untersuchen, wie sich das Migrations- und Invasionsverhalten der doppelt transgenen Primärzellen auf Grund der Überexpression von LPXN im Vergleich zu den einfach transgenen Primärzellen ändert, wurden ein *Scratch*-Assay und ein Matrigel-Invasions-Assay (siehe Material und Methoden, 2.18) durchgeführt. Im *Scratch*-Assay ist das Zuwachsen der durch eine gelbe Spitze zugefügten Wunde einer geschlossenen Zellschicht ein Indiz für das Migrationsverhalten von Zellen. Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen, zeigen die doppelt transgenen Primärzellen durch die Überexpression von LPXN im Vergleich zu den einfach transgenen Primärzellen ein deutlich aggressiveres Migrationsverhalten. 24 h nach Beginn des Versuchs konnte bei dem 83A L/-T- Zellklon eine fast geschlossene Zellschicht beobachtet werden, während bei dem 45F T/- Zellklon die Verletzung der Zellschicht noch deutlich zu erkennen war (Abb. 3.13 A). Nach dreimaliger

Wiederholung des *Scratch*-Assays für alle Zelllinien konnte ein statistisch relevantes, dreifach höheres Migrationsverhalten der doppelt transgenen Primärzellen 83A L/-T/- und 72A L/-T/- im Vergleich zu den einfach transgenen Primärzellen 27F T/- und 45F T/- ermittelt werden (Abb. 3.13 B).

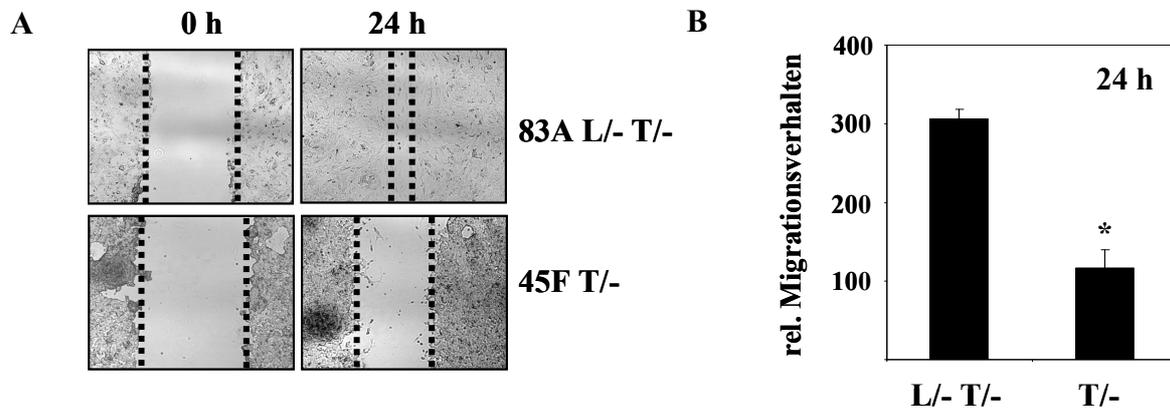


Abb. 3.13: Erhöhte Migrationsfähigkeit durch die Überexpression von LPXN [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Jeweils zwei verschiedene Primärzellklone von doppelt transgenen LPXN/TRAMP (L/-T/-)- sowie TRAMP (T/-)-Tumoren wurden mittels *Scratch*-Assay auf ihre Migrationsfähigkeit untersucht (hier 82A L/- T/- und 45F T/-). Unmittelbar nachdem der *Scratch* gezogen wurde sowie nach 24 h, wurden die Zellen unterhalb einer Markierung fotografiert. A. Anschließend wurde die Breite des *Scratches* zu beiden Zeitpunkten errechnet und durch die Differenz der beiden Werte die Migrationsfähigkeit ermittelt. B. Das Diagramm beschreibt den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Der p -Wert (*) wurde durch den *paired Student's t-test* ermittelt und betrug $p \leq 0.04$.

Die invasiven Eigenschaften der Primärzellen wurden mit Hilfe des Matrigel-Invasionsassays analysiert. Der Boden einer Matrigel-Invasions-Kammer ist eine mit Matrigel bedeckte Membran. 8 μm große Poren in dieser Membran ermöglichen es invasiven Zellen, auf die Unterseite der Membran zu gelangen. Diese invasiven Zellen wurden fixiert, gefärbt und analysiert. Dafür wurden die gleiche Anzahl einfach (T/-) und doppelt (L/-T/-) transgener Zellen in jeweils einer Matrigel-Invasions-Kammer für 24 h ausplattiert. Für die Zellklone 83A L/-T/- und 72A L/-T/- konnte im Vergleich zu den Zellklonen 27F T/- und 45F T/- ein zweifach höheres Invasionsverhalten beobachtet werden (Abb. 3.14). Diese stärkere Invasionsbereitschaft der doppelt transgenen L/-T/- Primärzellen ist auf die Überexpression von LPXN zurückzuführen und unterstreicht die Beobachtungen der verstärkten Progression des PCa in dem doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mausmodell.

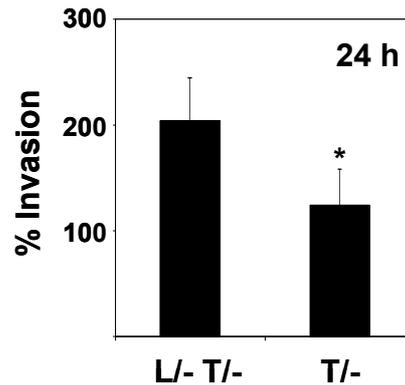


Abb. 3.14: Die erhöhte Tumorprogression resultiert aus den durch LPXN erhöhten invasiven Eigenschaften der murinen PCa-Zellen [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Mit Hilfe eines Matrigel-Invasionsassays wurde die Invasivität der doppelt transgenen Primärzellen L/-T/- (83A und 72A) mit den einfach transgenen Primärzellen T/- (27F und 45F) verglichen. Die Primärzellen der doppelt transgenen Mäuse zeigten dabei eine zweifach höhere Invasivität als die Primärzellen der einfach transgenen Mäuse. Das Diagramm beschreibt den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Der p -Wert (*) wurde durch den *paired Student's t-test* ermittelt und betrug $p \leq 0.04$.

Die vorangegangenen *in vivo*- und *in vitro*- Experimente zeigen deutlich, dass LPXN in die Progression von Prostatakarzinomen involviert ist. Diese Beobachtungen führten zu der Frage, wie LPXN die Progression von Prostatakarzinomen beeinflussen kann. Verschiedene Möglichkeiten sollen hier vorgestellt und im Weiteren durch Ergebnisse bestätigt werden.

1. Hypothese: LPXN hat einen direkten Einfluss auf die Regulation verschiedener Gene
2. Hypothese: LPXN interagiert mit Proteinen, die die Zellmigration/ Invasion fördern
3. Hypothese: LPXN beeinflusst die Zelladhäsion
4. Hypothese: LPXN ist in Signalwege involviert, welche die Zellprogression beeinflussen

1. Hypothese: LPXN hat einen direkten Einfluss auf die Regulation verschiedener Gene

3.3 LPXN reguliert die Expression von verschiedenen Genen

3.3.1 Die Expression des Zelladhäsions-Moleküls p120CTN korreliert negativ mit der LPXN-Expression

Im Rahmen der biologischen Dissertation von Frau Dr. Kaulfuß [2006] wurde in einem Zelladhäsionsarray die differentielle Expression von 96 Zelladhäsions-relevanten Genen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression untersucht. Dabei konnte für p120CTN gezeigt werden, dass es in den PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145 mit verminderter LPXN-Expression stärker exprimiert wird als in den jeweiligen Kontrollzellen. Mittels quantitativer *real time* PCR- und Western Blot-Analyse konnte die erhöhte Expression von p120CTN nach Herunterregulierung der LPXN-Expression durch spezifische siRNA-Oligonukleotide in den PCa-Zellen bestätigt werden [Kaulfuß, 2006].

Weiterhin konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene demonstriert werden, dass nach induzierbarer Überexpression von LPXN durch das *Tet-on*-System in den PCa-Zellen LNCaP [Kaulfuß, 2006] die Expressionszunahme von LPXN direkt mit der Expressionsabnahme von p120CTN korreliert [Beckemeyer, 2007].

3.3.1.1 Überexpression von LPXN in PCa-Zelllinien korreliert mit der Expressionsabnahme von p120CTN

Um durch eine zweite Methode zu bestätigen, dass eine Abnahme der p120CTN-Expression in PCa-Zellen mit der Überexpression von LPXN korreliert, wurde das TAT-Transduktions-System [Becker-Hapak *et al.*, 2001, Material und Methoden, 2.16] verwendet. Das TAT-Transduktions-System wurde bereits zur Untersuchung der morphologischen Veränderungen von PCa-Zellen nach Überexpression von LPXN angewendet [Beckemeyer, 2007]. Das TAT-LPXN-EGFP-StrepTag- (TAT-LPXN) Fusionsprotein und als Kontrolle das TAT-EGFP-StrepTag- (TAT-EGFP) Fusionsprotein wurden für 24 h in einer Endkonzentration von 1 μ M

auf die zu analysierenden PCa-Zellen gegeben. Eine daraus resultierende Repräsentation von TAT-LPXN in den Zellen konnte mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden (Abb. 3.15).

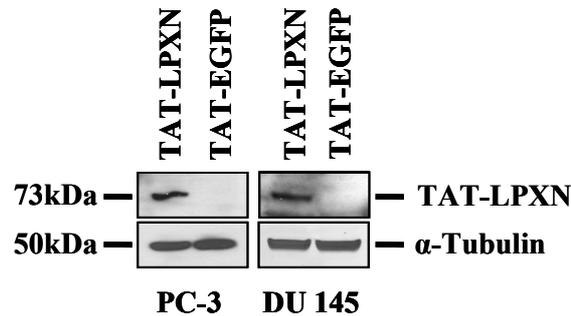


Abb. 3.15: Überexpression von LPXN durch das TAT-Transduktions-System in PCa-Zelllinien [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Die PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145 wurden entweder mit dem TAT-LPXN-EGFP-Fusionsprotein (TAT-LPXN) oder als Kontrolle mit dem TAT-EGFP-Fusionsprotein (TAT-EGFP) transduziert. 24 h nach der Transduktion wurde von den Zellen Gesamt-Protein isoliert und 50 μ g für die Western Blot-Analyse verwendet. Zur Detektion des TAT-LPXN-EGFP-Fusionsproteins (73 kDa) wurde ein Antikörper gegen LPXN (283G) verwendet. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin eingesetzt.

Anschließend wurde die Expression von p120CTN in DU 145-Zellen nach Transduktion mit TAT-EGFP bzw. TAT-LPXN analysiert. Wie in Abbildung 3.16 zu erkennen ist, resultiert eine LPXN-Repräsentation (TAT-LPXN) im Vergleich zur Kontrolle in einer deutlich verringerten Expression von p120CTN auf Proteinebene.

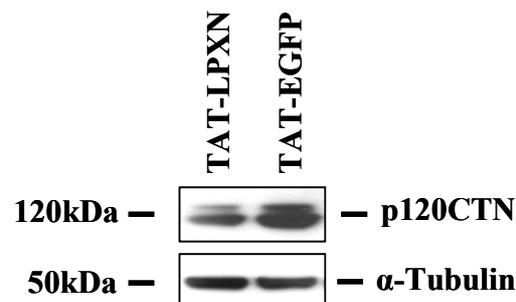


Abb. 3.16: Nachweis der p120CTN-Expression nach Transduktion von PCa-Zellen mit TAT-LPXN [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Die 24stündige Transduktion von DU 145 PCa-Zellen mit dem TAT-LPXN-EGFP-Fusionsprotein (TAT-LPXN) resultiert im Western Blot in einer deutlichen Expressionsabnahme von p120CTN. Zellen, die hingegen als Kontrolle unter gleichen Bedingungen mit dem TAT-EGFP-Fusionsprotein transduziert wurden, zeigen auf Grund der nicht erhöhten LPXN-Repräsentation keine verringerte p120CTN-Expression. Die Transduktion mit anschließender Western Blot-Analyse wurde als Triplet durchgeföhrt. Verwendet wurde ein p120CTN-spezifischer Antikörper, der eine spezifische Bande bei der für p120CTN erwarteten Größe von 120 kDa darstellt. Ein Antikörper gegen α -Tubulin diente als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

Um auszuschließen, dass das im TAT-LPXN-Fusionsprotein enthaltene EGFP bzw. der Strep-Tag Einfluss auf die Funktion von LPXN ausüben, wurden drei Plasmide (pCMV-LPXN-His (LPXN-His), pCMV-LPXN-Myc (Myc-LPXN), pEGFP-LPXN (EGFP-LPXN)) zur Überexpression von verschiedenen getaggten LPXN-Fusionsproteinen in PC-3-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurden die Leervektoren verwendet. 48 h nach der Transfektion wurde Gesamt-Protein isoliert und eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 3.17). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Überexpression der jeweiligen LPXN-Fusionsproteine in einer verringerten Expression von p120CTN in PCa-Zellen resultiert.

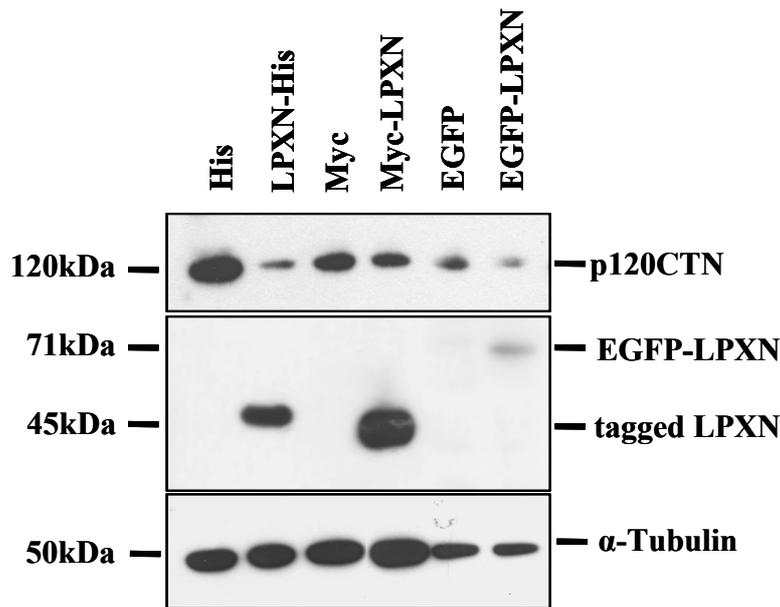
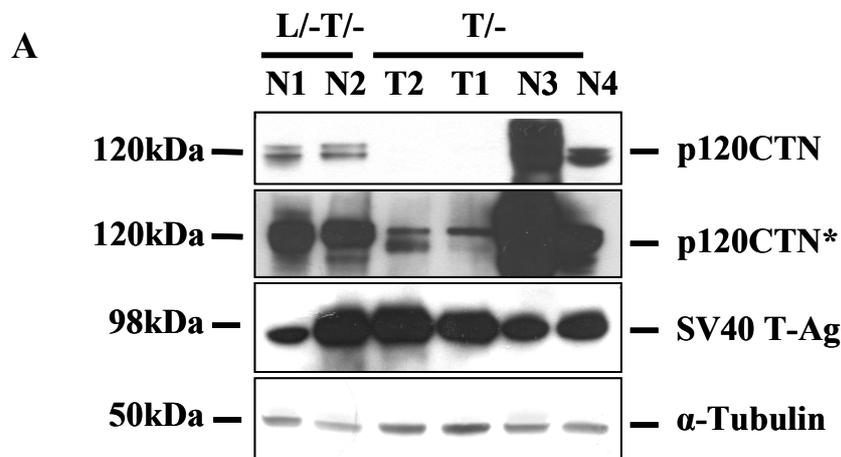


Abb. 3.17: Western Blot zur Expressions-Analyse von p120CTN nach Überexpression von verschiedenen getaggten LPXN-Fusionsproteinen [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. PC-3-Zellen wurden für 48 h mit Plasmiden transfiziert, die spezifisch für die Fusionsproteine LPXN-His, Myc-LPXN und EGFP-LPXN kodieren. Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Leervektoren verwendet. Anschließend wurde Gesamt-Protein isoliert und 50 µg für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Zunächst wurde die Membran mit einem Antikörper gegen LPXN (283G) hybridisiert, wodurch die entsprechenden LPXN-Fusionsproteine (ca. 45 kDa, 71 kDa) detektiert werden konnten. Zur Darstellung der p120CTN-Expression wurde ein Antikörper gegen p120CTN verwendet (120 kDa). Die Hybridisierung mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper bestätigt die aufgetragene Proteinmenge.

3.3.1.2 Expression von p120CTN im LPXN/TRAMP-Mausmodell

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von LPXN in den PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145 zu einer verminderten Expression des Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls p120CTN führt. Um zu untersuchen, ob diese Korrelation auch auf das biologisch relevante *in vivo*-Modell übertragbar ist, wurde die Expressionsstärke von p120CTN zunächst in den Prostatae von LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäusen (normales Prostatagewebe und Tumorgewebe) untersucht. Dafür wurden je zwei zehn Wochen alte Tiere der doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mauslinie und der TRAMP-Kontrolllinie abgetötet und die Prostata herauspräpariert. Diese Tiere hatten zu diesem Zeitpunkt noch keinen Prostatatumor entwickelt. Anschließend wurde eine Western Blot-Analyse mit einem p120CTN-spezifischen Antikörper durchgeführt. Zusätzlich wurden isolierte Proteine aus zwei Tumoren einfach transgener TRAMP-Mäuse aufgetragen. Im humanen PCa ist die p120CTN-Expression im Vergleich zum Normalgewebe bei 50% der Fälle herunterreguliert [Kallakury *et al.*, 2001a, b]. Aus der Western Blot-Analyse geht hervor, dass die p120CTN-Expression auch in den Tumoren des TRAMP-Mausmodells herunterreguliert wird und damit dieses Mausmodell für die Analyse des Einflusses von LPXN auf p120CTN verwendet werden kann. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass auch *in vivo* allein die Überexpression von LPXN (L/-T/-) im Normalgewebe der Prostata (N1, N2) zu einer verminderten Expression von p120CTN führt (Abb. 3.18 A). Die densitometrische Auswertung von drei Western Blot-Experimenten bestätigte, dass im Normalgewebe der Prostata von LPXN/TRAMP-Mäusen die p120CTN-Expression um 50% reduziert ist (Abb. 3.18 B).



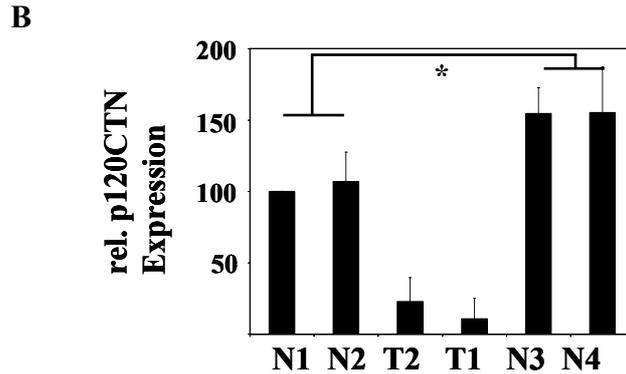


Abb. 3.18: Western Blot zur Expressions-Analyse von p120CTN im Normal- und im Tumorgewebe von doppelt (L/-T/-) und einfach (T-) transgenen TRAMP-Mäusen [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. A. Für die Western Blot-Analyse wurde Gesamt-Protein aus normalem Prostatagewebe von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-(L/-T/-) und einfach transgenen TRAMP-Mäusen (T/-) sowie aus Tumorgewebe von T/- Mäusen isoliert. Die Expression von p120CTN ist im Normalgewebe der Prostata (N1, N2) doppelt transgener L/-T/- Mäuse im Vergleich zu einfach transgenen T/- Mäusen durch die Überexpression von LPXN signifikant reduziert. Weiterhin ist eine starke Expressionsabnahme von p120CTN im Prostatatumorgewebe (T1, T2) im Vergleich zum Normalgewebe der Prostata (N3, N4) in T/- Mäusen zu beobachten. Dabei handelt es sich nicht um einen kompletten Verlust der p120CTN-Expression, wie die Darstellung einer längeren Belichtungsdauer zeigt (p120CTN*). Weiterhin wurde SV40 T-Ag zur Kontrolle des verwendeten Prostatamaterials abgebildet. Zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin eingesetzt. B. Die densitometrische Analyse demonstriert eine 50%ige Reduktion der p120CTN-Expression im Normalgewebe von L/-T/- Mäusen im Vergleich zu T/- Mäusen. Der Mittelwert \pm Standardabweichung wurde von drei unabhängigen Western Blots berechnet. Der p -Wert (*) wurde durch den *paired Student's t-test* ermittelt und betrug $p \leq 0.01$.

Der Einfluss von LPXN auf die Expression von p120CTN im Tumorgewebe von doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen wurde im Vergleich zum Tumorgewebe von einfach transgenen TRAMP-Mäusen mittels Western Blot untersucht. Dazu wurden LPXN/TRAMP-Mäuse der Linien #19 und #20, sowie TRAMP-Mäuse im Alter zwischen 20 und 30 Wochen abgetötet, die Prostatatumore herauspräpariert und Gesamt-Protein isoliert. Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen ist, liegt eine signifikant reduzierte Expression von p120CTN in den Tumoren der LPXN/TRAMP-Mäuse im Vergleich zu den TRAMP-Mäusen vor. Dieser Expressionsunterschied bestätigt wiederum die negative Korrelation der LPXN- und der p120CTN-Expression.

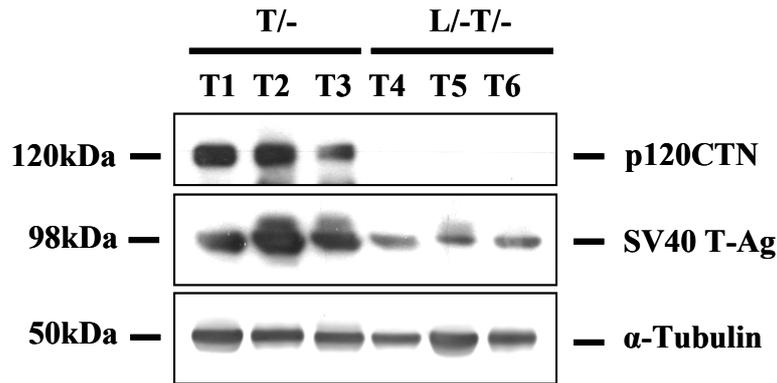


Abb. 3.19: Western Blot zur Expressions-Analyse von p120CTN im Tumorgewebe von doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäusen [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Jeweils drei L^{-T^{-/-}}- bzw. T^{-/-}- Mäuse wurden abgetötet und die Prostatatumore herauspräpariert. Anschließend wurde Gesamt-Protein isoliert und 50 µg für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Mit einem p120CTN-Antikörper konnte eine spezifische Bande bei 120 kDa detektiert werden. Um nachzuweisen, dass das verwendete Material aus der Prostata stammt, wurde zusätzlich ein Antikörper gegen SV40 T-Ag verwendet. Die aufgetragene Protein-Menge wurde mit einem α-Tubulin-spezifischen Antikörper untersucht. Durch die Überexpression von LPXN ist in den Tumoren der L^{-T^{-/-}}- Mäuse eine deutliche Herunterregulierung der p120CTN-Expression im Vergleich zu den T^{-/-}- Mäusen zu erkennen.

3.3.1.3 Expression von p120CTN in Primärzellen von LPXN/TRAMP-Tumoren

Die im Mausmodell erhaltenen Ergebnisse zur differentiellen Expression von p120CTN nach LPXN-Überexpression sollten in murinen Primärzellen *ex vivo* überprüft werden. Wie bereits in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, exprimieren nur die Zellklone 83A L^{-T^{-/-}}- und 72A L^{-T^{-/-}}-, welche aus den Tumoren doppelt transgener LPXN/TRAMP-Mäuse isoliert wurden, das transgene tLPXN-cmyc. Mit einem spezifischen Antikörper gegen p120CTN konnte in diesen Zellen in einer Western Blot-Analyse eine verminderte Expression von p120CTN festgestellt werden. Die Zellklone, welche das transgene tLPXN-cmyc nicht exprimierten (27F T^{-/-}- und 45F T^{-/-}-), zeigten hingegen eine stärkere p120CTN-Expression (Abb. 3.20).

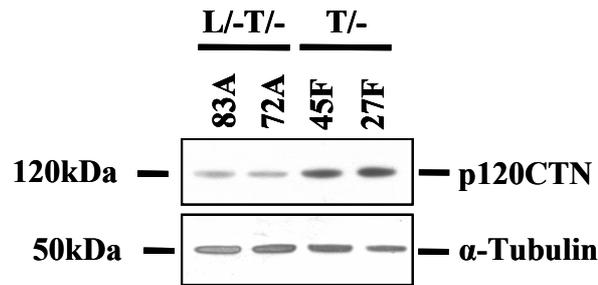


Abb. 3.20: Western Blot zur Analyse der herunterregulierten p120CTN-Expression in den Primärzellen doppelt transgener LPXN/TRAMP-Mäuse im Vergleich zu den Primärzellen einfach transgener TRAMP-Mäuse [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Aus den Primärzellklonen 83A und 72A, welche aus den doppelt transgenen L/-T/- Mäusen hervorgegangen sind, sowie aus den Primärzellklonen 45F und 27F, welche aus den einfach transgenen T/- Mäusen hervorgegangen sind, wurde Gesamt-Protein isoliert und 30 µg für die Westen Blot-Analyse eingesetzt. Ein p120CTN-spezifischer Antikörper wurde zur Detektion des p120CTN bei einer Größe von 120 kDa verwendet. Die Überprüfung der eingesetzten Proteinmenge erfolgte mit einem Antikörper gegen α -Tubulin. Durch die Überexpression von LPXN in den doppelt transgenen Primärzellen 83A und 72A ist eine deutlich verminderte Expression des Zell-Zell-Adhäsionsproteins p120CTN zu verzeichnen.

3.3.2 Analysen zur Funktion von p120CTN

3.3.2.1 Herunterregulierung von p120CTN in den PCa-Zelllinien mittels RNA-Interferenz

Kann p120CTN als Vermittler der LPXN-induzierten verstärkten Progression der PCa-Zellen fungieren? Zur Beantwortung dieser Frage wurden die etablierten PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145 zunächst mit drei verschiedenen p120CTN-spezifischen Duplex-siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Ein siRNA-Oligonukleotid, welches spezifisch für das Luciferase-Gen ist, wurde bei jedem Experiment als Kontrolle eingesetzt. Für den *knockdown* der p120CTN-Expression wurden zwei bzw. drei (si-p120CTN1, si-p120CTN2, si-p120CTN3) verschiedene siRNAs getestet. Die Ergebnisse in Abbildung 3.21 zeigen, dass 72 h nach der Transfektion mit p120CTN-spezifischer siRNA sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene ein deutlicher *knockdown* der p120CTN-Expression in PC-3-Zellen zu verzeichnen ist. Zur simultanen Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression wurden die Zellen mit beiden siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Es ist zu erkennen, dass dadurch der Effekt der Hochregulation von p120CTN durch die alleinige Reduktion der LPXN-Expression aufgehoben

werden kann. Da sich nach mehrfacher Wiederholung der Experimente für die p120CTN-spezifische siRNA 3 (si-p120CTN3) die größte Effizienz in der Herunterregulierung der p120CTN-Expression ergab, wurde für alle weiteren Versuche diese siRNA eingesetzt.

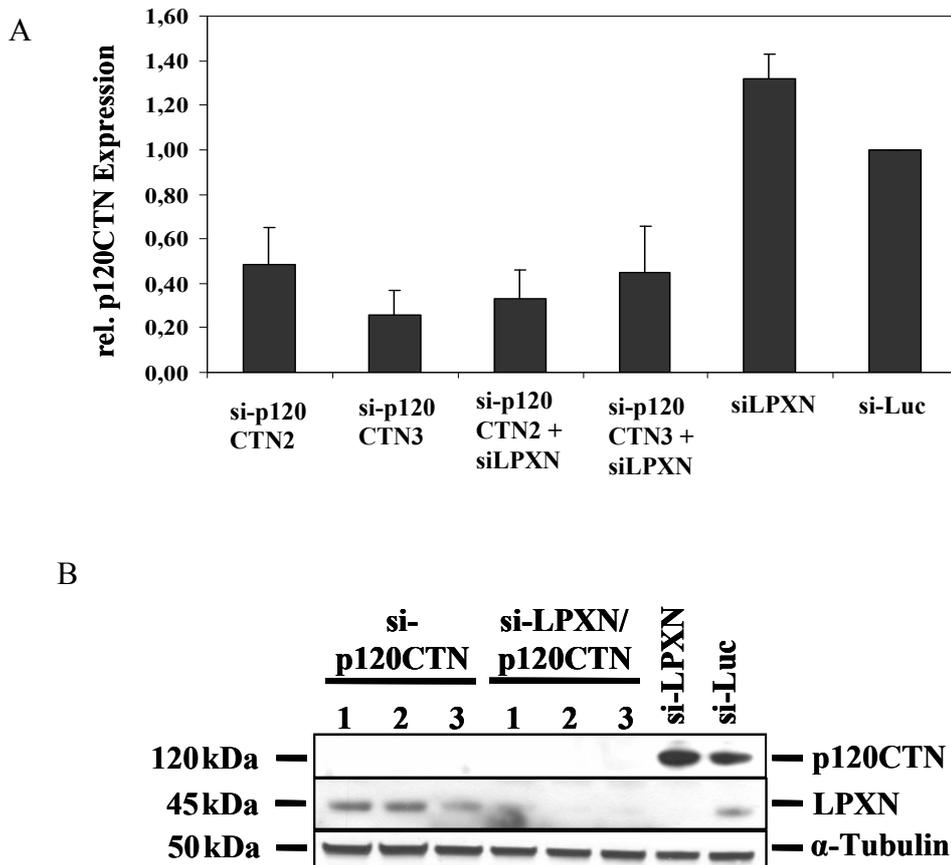


Abb. 3.21: Quantitative *real time* PCR sowie Western Blot-Analyse zum Nachweis der Herunterregulation von p120CTN und LPXN in PC-3-Zellen [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. A. PC-3-Zellen wurden zur Herunterregulierung der p120CTN- bzw. LPXN-Expression mit spezifischen siRNAs transfiziert. Für die quantitative *real time* PCR-Analyse wurde nach 72 h Gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit spezifischen p120CTN-Primern konnten die p120CTN-Transkripte in der PCR amplifiziert werden. Abgeglichen gegen zwei *Housekeeping*-Gene ergab sich für jede cDNA-Probe eine relative p120CTN-Expression. B. Für die Western Blot-Analyse wurde nach den Transfektion der PC-3-Zellen mit den jeweiligen siRNAs Gesamt-Protein isoliert und 30 μ g eingesetzt. Mittels p120CTN-spezifischem Antikörper konnte in allen Zellen, welche mit p120CTN-spezifischer siRNA (sip120CTN1, sip120CTN2, sip120CTN3) transfiziert wurden, eine Herunterregulierung der p120CTN-Expression detektiert werden. Weiterhin wurde zur Detektion von LPXN ein spezifischer LPXN-Antikörper verwendet. Die Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper.

3.3.2.2 Verstärkte Migration und Invasion in PCa-Zellen nach Herunterregulierung der p120CTN-Expression

Nachdem die Funktionalität der siRNA-Oligonukleotide bestätigt werden konnte, sollten die Migrations- und Invasionseigenschaften der PCa-Zellen nach Herunterregulierung der p120CTN-Expression untersucht werden. Zusätzlich sollten diese Eigenschaften analysiert werden, wenn die Expression beider Proteine, LPXN und p120CTN, herunterreguliert sind. Dafür wurden ein *scratch*-Assay und ein Matrigel-Invasionsassay durchgeführt (Material und Methoden 2.18, 2.21). Für den *scratch*-Assay wurden 48 h nach Herunterregulierung der Expression der Zielgene LPXN und p120CTN die Zellen in einer 12-Well-Platte so ausplattiert, dass sich nach 24 h eine geschlossene Zellschicht gebildet hatte. Anschließend wurde eine Wunde zugefügt und diese oberhalb und unterhalb einer Markierung fotografiert und gemessen. Nach 24 h wurden die Zellen wiederum oberhalb und unterhalb der Markierung fotografiert.

Wie in Abbildung 3.22 zu erkennen ist, haben PC-3-Zellen, bei denen die p120CTN-Expression herunterreguliert wurde, eine stark erhöhte Migrationsfähigkeit. Die zugefügte Wunde in der Zellschicht war bereits nach 24 h nicht mehr zu erkennen. Im Gegensatz hierzu stehen die PCa-Zellen, bei denen die LPXN-Expression herunterreguliert wurde. Im Vergleich zu den mit Luciferase-siRNA transfizierten Kontrollzellen konnte hier eine verminderte Migrationsfähigkeit beobachtet werden. Der gleichzeitige *knockdown* der Expression von p120CTN und LPXN resultierte in einer Aufhebung der Effekte der einzelnen Herunterregulierungen. Die Breite der bestehenden Wunde unterscheidet sich kaum von derjenigen der Kontrollzellen.

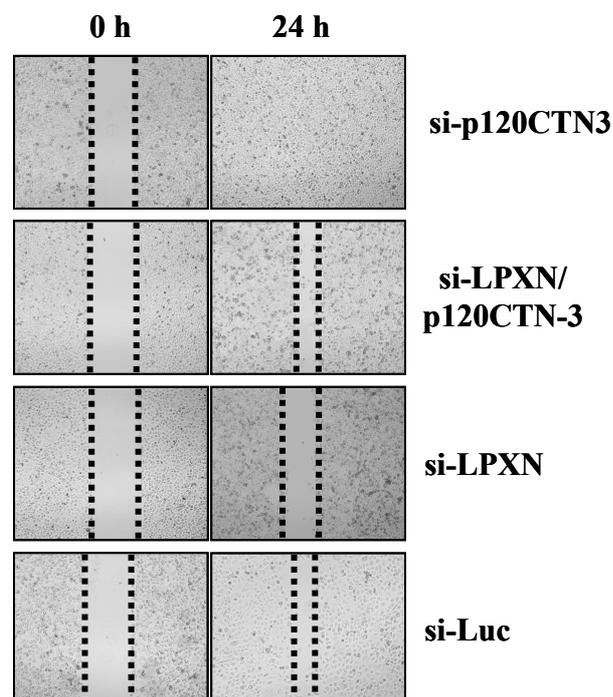


Abb. 3.22: Scratch-Assay zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von PC-3-Pa-Zellen nach Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression [aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. In einem *scratch*-Assay wurde die direkte Migrationsfähigkeit von PC-3-Zellen nach p120CTN *knockdown*, LPXN *knockdown* und dem simultanen *knockdown* der p120CTN- und LPXN-Expression ermittelt. In eine geschlossene Zellschicht von p120CTN-siRNA-, LPXN-siRNA-, p120CTN- und LPXN-siRNA- sowie Luciferase-siRNA (Kontrolle) transfizierten Zellen wurde mit einer gelben Spitze eine Wunde eingefügt. Das Zusammenwachsen der Wunde wurde unter einem inversen Mikroskop in 40facher Vergrößerung beobachtet und fotografiert. Nach 24 h konnte in den p120CTN-siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine stark erhöhte und in den LPXN-siRNA-transfizierten Zellen eine stark verminderte Migrationsfähigkeit der Zellen beobachtet werden. Nach *knockdown* sowohl der p120CTN als auch der LPXN-Expression erfolgt eine Aufhebung der Effekte, da die Zellen eine ähnliche Migrationsfähigkeit wie die Kontrollzellen zeigen.

Die Invasionsfähigkeit der Pca-Zellen wurde mit einem Matrigel-Invasionsassay analysiert (siehe Material und Methoden, 2.18). PC-3-Zellen wurden dafür mit spezifischer siRNA gegen p120CTN, LPXN bzw. p120CTN und LPXN zusammen und Luciferase transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in eine Matrigel-Invasions-Kammer gegeben, die eine mit Matrigel bedeckte Membran (8 µm Poren) enthielt. Nach 24 h Inkubation wurden die invasiven Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert, angefärbt und gezählt. Nach Herunterregulierung der p120CTN-Expression konnte eine um 34% erhöhte Invasivität der PC-3-Zellen im Vergleich zu den Luciferase-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden. Nach dem *knockdown* der LPXN-Expression hingegen konnte eine verminderte Invasivität der Zellen gezeigt werden [Kaulfuß *et al.*, 2008]. Wurde die Expression beider Gene, p120CTN und LPXN, herunterreguliert, konnte wie auch in der Migrationsfähigkeit eine Aufhebung der jeweiligen Einzeleffekte beobachtet werden (Abb. 3.23).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Expressionsverlust von p120CTN die progressiven Eigenschaften des Pca unterstützt und dass p120CTN ein Vermittler der LPXN-induzierten Migrations- und Invasionsfähigkeit darstellt.

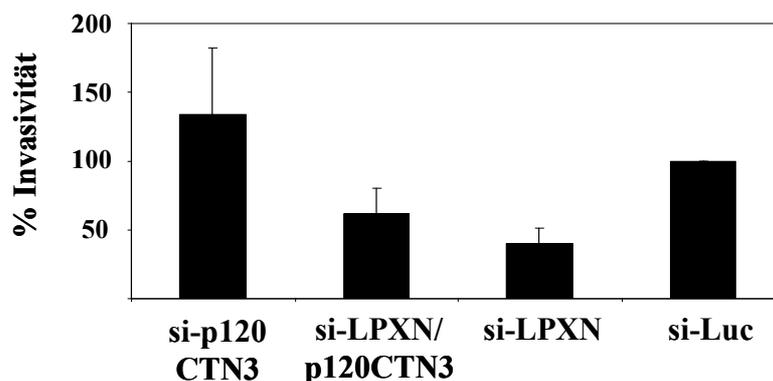


Abb. 3.23: Invasionsassay zur Bestimmung der invasiven Eigenschaften von PC-3-Zellen nach Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. PC-3-Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen p120CTN (si-p120CTN3), LPXN (si-LPXN) und p120CTN und LPXN zusammen (si-LPXN/si-p120CTN3) transfiziert. Kontrollzellen wurden mit siRNA transfiziert, die spezifisch gegen das Luciferase-Gen gerichtet ist. Nach 48 h wurden die Zellen jeweils in einer Matrigel-Invasions-Kammer ausplattiert und für 24 h inkubiert. Der Expressionsverlust von p120CTN bewirkt in den Zellen eine erhöhte invasive Eigenschaft im Vergleich zu Kontrollzellen, während der Expressionsverlust von LPXN in den Zellen eine geringere invasive Fähigkeit hervorruft. Zellen, in denen sowohl die Expression von p120CTN als auch LPXN herunterreguliert ist, unterscheiden sich nur unwesentlich in der Invasionsfähigkeit von den Kontrollzellen. Der Mittelwert \pm Standardabweichung wurde von drei unabhängigen Invasions-Assays berechnet.

3.3.2.3 Änderung der subzellulären Lokalisation von β -Catenin nach Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN-Expression

β -Catenin ist wie p120CTN eine Komponente des Zell-Zell-Adhäsionskomplexes. Im Gegensatz zu p120CTN ist β -Catenin jedoch nicht fest an die Membran gebunden, sondern pendelt zwischen Membran und Kern. An der Membran ist β -Catenin für die Zellstabilität mitverantwortlich, während es im Kern die Transkription verschiedener Zielgene des Wnt-Signalweges reguliert [Brembeck *et al.*, 2006]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Änderung der Lokalisation von β -Catenin mit der Prognose des PCa und dem Expressionslevel von p120CTN assoziiert ist [Jaggi *et al.*, 2005; Perez-Moreno und Fuchs, 2006; Whitaker *et al.*, 2008]. Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin in PC-3-Zellen nach Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression analysiert. Dazu wurden die PC-3-Zellen mit LPXN-spezifischer siRNA, p120CTN-spezifischer siRNA und in Kombination mit siRNA gegen LPXN und p120CTN transfiziert. Als Kontrolle wurde eine Luciferase-spezifische siRNA verwendet. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf einem Glasobjektträger ausplattiert. Nach einer weiteren Kultivierung von 24 h wurden die Zellen mit 4% Formalin fixiert und eine immunzytochemische Analyse mit einem β -Catenin-spezifischem Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 3.24 zu erkennen ist, resultiert ein *knockdown* der p120CTN-Expression in PC-3-Zellen in einer Akkumulation von β -Catenin im Kern. Ein *knockdown* der LPXN-Expression hingegen resultiert fast ausschließlich in der Lokalisation von β -Catenin an der Zytoplasmamembran. Bei gleichzeitiger Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression heben sich die beobachteten Einzeleffekte wieder auf und β -Catenin

lokalisiert im Zytoplasma, an der Membran und im Kern. Die gleiche Lokalisation von β -Catenin ist ebenfalls in den Kontrollzellen zu erkennen.

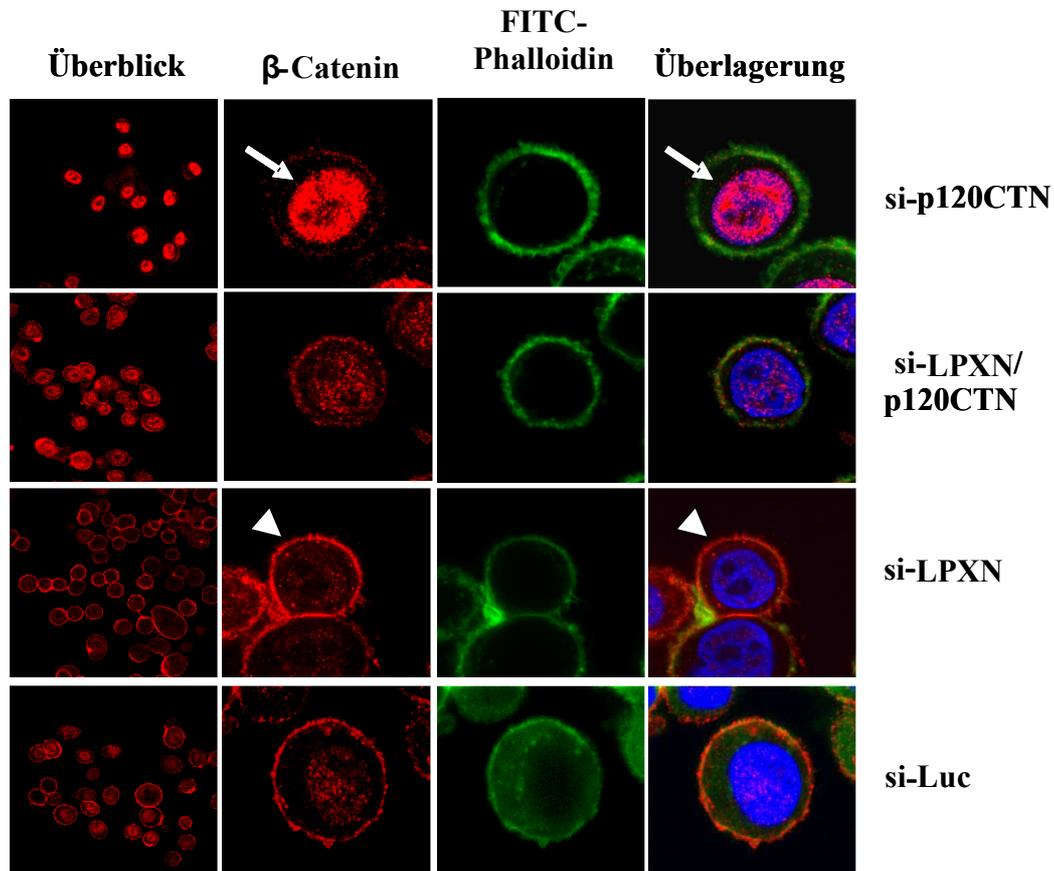


Abb. 3.24: Immunzytochemische Analyse zur Lokalisation von β -Catenin in PCa-Zellen nach Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. PC-3-Zellen wurden mit den in der Abbildung angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h auf Glasobjektträgern ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit einem β -Catenin-spezifischem Antikörper behandelt. Das Zytoskelett wurde mit FITC-Phalloidin visualisiert, die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. In der Überlagerung ist deutlich zu erkennen, dass ein p120CTN *knockdown* (si-p120CTN3) eine Lokalisation von β -Catenin im Kern bewirkt, während ein LPXN *knockdown* (siLPXN) in einer ausschließlichen Lokalisation von β -Catenin an der Zytoplasmamembran resultiert. Nach Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN-Expression (siLPXN/p120CTN3) kann eine Lokalisation von β -Catenin sowohl an der Membran als auch im Kern detektiert werden. Diese β -Catenin-Verteilung ist ebenfalls in den Kontrollzellen (siLuc) zu beobachten. Alle Bilder wurden mit 600facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend weiter vergrößert (bis auf die Überblickbilder).

Die Akkumulation von β -Catenin im Kern ist, wie in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, abhängig von der Abwesenheit von p120CTN an der Plasmamembran. PC-3-Zellen mit einer Expression von p120CTN an der Membran zeigen eine deutliche Lokalisation von β -Catenin sowohl an der Membran als auch im Kern. Ist jedoch die Expression von p120CTN herunterreguliert, lokalisiert β -Catenin ausschließlich im Kern (Abb. 3.25).

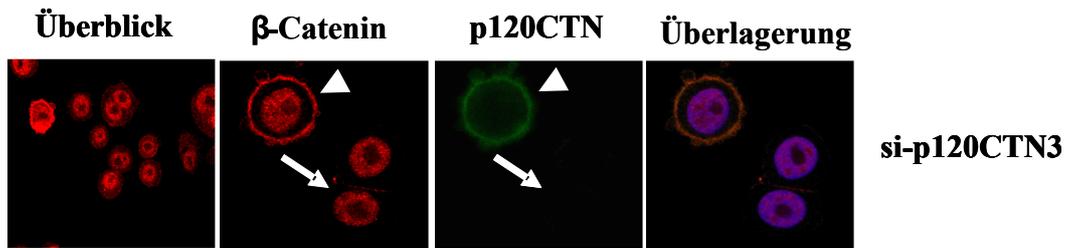


Abb. 3.25: Immunzytochemische Analyse zur Lokalisation von β -Catenin in PC-3-Zellen bei An- und Abwesenheit von p120CTN [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Bei Anwesenheit von p120CTN an der Zellmembran (Blockpfeil) konnte eine Verteilung von β -Catenin sowohl im Kern als auch in der Zytoplasmamembran detektiert werden. Bei Abwesenheit der p120CTN-Expression ist eine ausschließliche Lokalisation von β -Catenin im Kern zu erkennen. Das Überblicksbild wurde mit 100facher Vergrößerung, die übrigen Bilder mit 600facher Vergrößerung aufgenommen.

3.3.2.4 Herunterregulierung der LPXN-Expression vermindert die Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7

Die Akkumulation von β -Catenin im Kern resultiert in der Transkription verschiedener Zielgene [Ichikawa *et al.*, 2006]. Ein Zielgen von β -Catenin ist z.B. die Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7). MMP-7 ist ein proteolytisches Enzym und in die Spaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix involviert. MMP-7 ist ebenfalls in der Lage, weitere MMPs zu aktivieren und wird daher mit der Tumordinvasion in Verbindung gebracht [Wang *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 1999]. Weiterhin konnte bereits demonstriert werden, dass MMP-7 in mehreren Karzinomen wie Lunge [Bolon *et al.*, 1997], Haut [Karelina *et al.*, 1994], Brust [Heppner *et al.*, 1996] und Prostata [Pajouh *et al.*, 1991] überexprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.

Die Expression von MMP-7 in PC-3-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN- Expression wurde durch eine quantitative *real time* PCR-Analyse dargestellt. Dazu wurden die PC-3-Zellen mit LPXN-, p120CTN- und in Kombination mit LPXN- und p120CTN-spezifischer siRNA transfiziert und nach 72 h RNA isoliert. Als Kontrolle wurde RNA von Zellen isoliert, die mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert wurden. Anschließend wurde die RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in der quantitativen *real time* PCR-Analyse eingesetzt. Wie in Abbildung 3.26 zu erkennen ist, resultiert die Herunterregulierung der LPXN-Expression in einer reduzierten Expression von MMP-7. Die Herunterregulierung der p120CTN-Expression, welche mit einer Akkumulation von β -Catenin

im Kern assoziiert ist, resultiert hingegen in einer erhöhten MMP-7-Expression. Der Doppel *knockdown* der LPXN- und p120CTN-Expression resultiert in keiner signifikanten Veränderung der MMP-7-Expression im Vergleich zu den Luciferase-siRNA transfizierten Kontrollzellen.

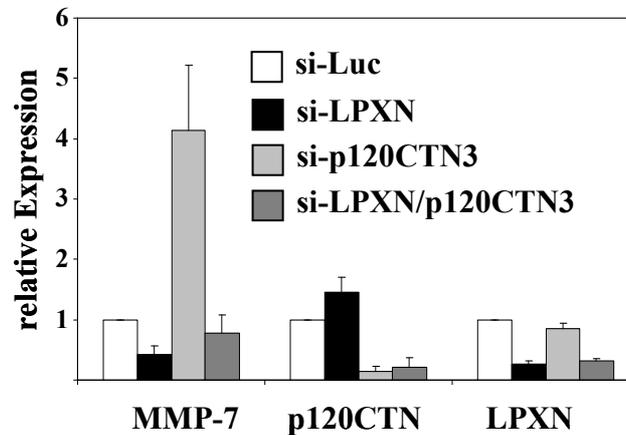


Abb. 3.26: Expressionsverlust von LPXN und p120CTN in PC-3-PCa-Zellen resultiert in einer veränderten Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7 [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. Um die Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7 zu untersuchen, wurden PC-3-Zellen mit siRNA gegen LPXN (si-LPXN), p120CTN (si-p120CTN3), LPXN und p120CTN (si-LPXN/si-p120CTN3) und Luciferase (si-Luc) transfiziert. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die quantitative *real time* PCR-Analyse demonstriert ein Expressionsverlust von MMP-7 nach Herunterregulierung der LPXN-Expression und eine verstärkte Expression von MMP-7 nach Herunterregulierung der p120CTN-Expression. Der Mittelwert \pm Standardabweichung wurde von drei unabhängigen quantitativen *real time* PCR-Analysen berechnet.

3.3.2.5 Überexpression von LPXN erhöht die Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7

Um zu zeigen, dass die Expression von MMP-7 ebenfalls ansteigt, wenn die Expression von LPXN in den PC-3-Zellen hochreguliert wird (gleichzusetzen mit der Herunterregulierung der p120CTN-Expression), wurde eine quantitative *real time* PCR-Analyse durchgeführt. Dafür wurden die PC-3-Zellen zunächst mit Plasmiden zur Expression von LPXN-Fusionsproteinen transfiziert und nach 48 h Gesamt-RNA isoliert. Nach einer DNase-Behandlung wurde die RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in der quantitativen *real time* PCR-Analyse eingesetzt. Wie in Abbildung 3.27 zu erkennen ist, konnte eine zwei- bis dreifache Hochregulierung der MMP-7-Expression nach Überexpression von LPXN nachgewiesen werden.

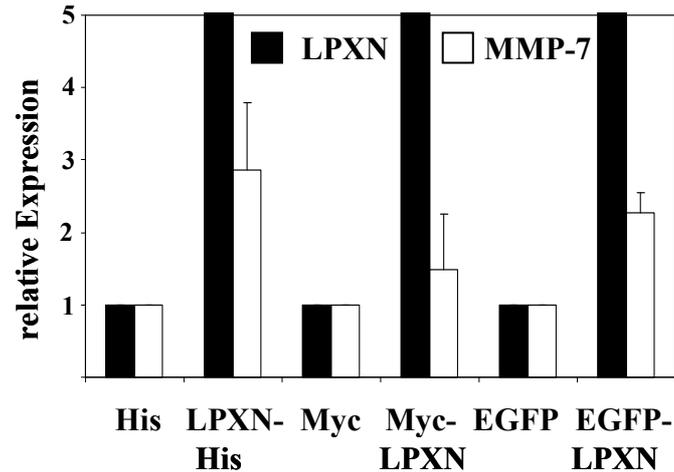


Abb. 3.27: Quantitative *real time PCR*-Analyse zur Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7 nach Überexpression von LPXN [mod. aus Kaulfuß *et al.*, 2009]. PC-3-Zellen wurden mit Plasmiden zur Überexpression von verschiedenen LPXN-Fusionsproteinen (LPXN-His, Myc-LPXN, EGFP-LPXN) und den entsprechenden Kontrollplasmiden (His, Myc, EGFP) transfiziert. Nach 48 h wurde Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die anschließende quantitative *real time PCR*-Analyse verdeutlicht eine erhöhte Expression von MMP-7 nach Überexpression von LPXN durch verschiedene LPXN-Fusionsproteine. Die relative Expression von LPXN und MMP-7 in den Kontroll-transfizierten Zellen wurden jeweils gleich 1 gesetzt. Der Mittelwert \pm Standardabweichung wurde von drei unabhängigen quantitativen *real time PCR*-Analysen berechnet.

3.3.3 *Whole genome expression microarray* zur Ermittlung von Kandidatengen, welche durch LPXN während der Tumorprogression reguliert werden

Um gezielt weitere Kandidatengene zu identifizieren, auf dessen Regulation LPXN während der Progression des PCa Einfluss nehmen könnte durch, wurde ein *whole genome expression* Array in Zusammenarbeit mit dem Transkriptomanalyselabor unter der Leitung von Dr. Gabriela Salinas-Riester (Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. In diesem Microarray wurde die Expression von Genen in den Tumoren von doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäusen miteinander verglichen. Dafür wurden von jeder Versuchstiergruppe (L/-T/- #20 und T/-) unabhängig vom Alter drei Mäuse präpariert, die einen erbsengroßen (10 mm³) Tumor entwickelt hatten. Diese definierte Größe des Tumors wurde genau eingehalten, um ein einheitliches Progressionsstadium zu gewährleisten. Ein Teil der präparierten Tumore wurde jeweils für eine histopathologische Analyse zunächst in Formalin fixiert und ein anderer Teil des Tumors wurde für eine RNA-

Isolierung bei -80°C eingefroren. Wie in Abbildung 3.28 dargestellt, wurden die angefertigten Gewebeschnitte der Prostatatumore mit HE angefärbt und anschließend in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Schweyer (Abteilung Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) ausgewertet. Alle für den Array verwendeten Mäuse (L/-T/- #20 13F, 16F, 20F und T/- 27G, 36G, 44G) hatten zum Zeitpunkt der Präparation einen schlecht differenzierten Tumor (PDC) entwickelt, wobei keine Metastasen in Leber, Lunge, Niere, Milz oder Lymphknoten detektiert werden konnten.

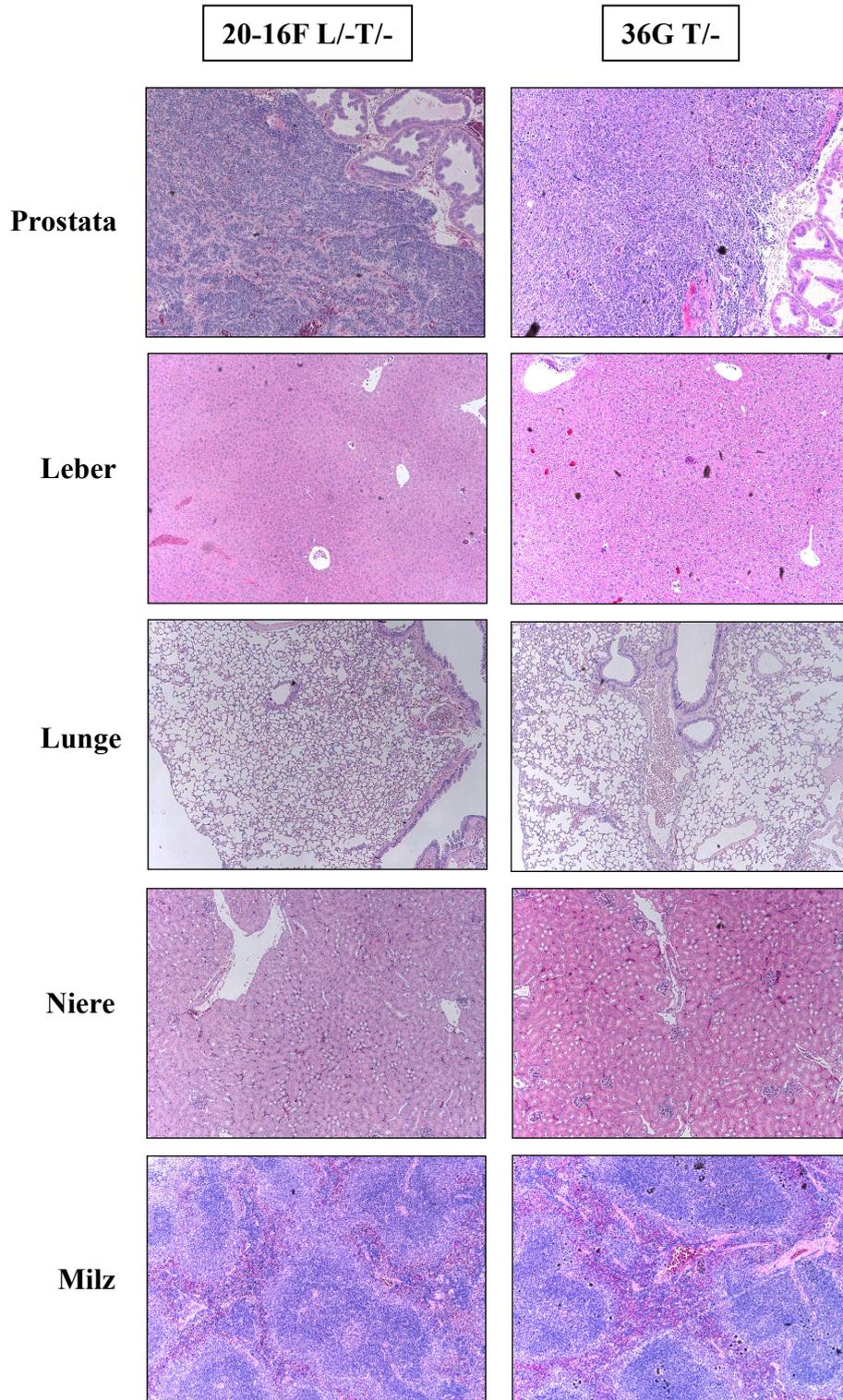


Abb. 3.28 Histopathologische Analyse zur Überprüfung der morphologischen Veränderung der Organe von doppelt (L/-T/-) und einfach (T/-) transgenen Mäusen. Jeweils drei Tiere der doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Mäuse wurden mit einem PCa-Volumen von ca. 10 mm³ präpariert, ein Teil des Prostata Tumors, der Leber, der Lunge, der Niere und der Milz herausgenommen, in Formalin fixiert und HE-Schnitte angefertigt. In allen sechs Mäusen (hier stellvertretend dargestellt 20-16F L/-T/- und 36G T/-) konnten ein schlecht differenziertes Karzinom der Prostata und keine Metastasen festgestellt werden. Alle Abbildungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.

Nach der histopathologischen Auswertung der HE-Schnitte wurde der Microarray durchgeführt. Dafür wurde zunächst aus den isolierten Tumoren RNA aufgereinigt und wie unter 2.25 beschrieben weiter behandelt. Die statistische Auswertung der Array-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Lennart Opitz (Transkriptomanalyselabor, Universitätsmedizin Göttingen). Wie in Tabelle 3.1 aufgelistet, konnten von den fast 21000 aufgespotteten Genen auf dem Microarray nur vier Kandidaten ermittelt werden, welche mindestens um den Faktor 0,6 dereguliert ist (L/-T/- vs. T/-) und bei denen die Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives Ergebnis unter 99,94% (FDR = false discovery rate) liegt.

Tab. 3.1 Ergebnisse des cDNA-Microarrays für Tumore mit Überexpression von LPXN L/-T/- im Vergleich zu Kontrolltumoren T/-. Es konnten nur vier potentielle Kandidaten ermittelt werden, bei denen die Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives Ergebnis unter 99,94% liegt.

Symbol	Name	L/-T/- vs. T/-	FDR
D430039N05Rik	RIKEN cDNA D430039N05 gene	-1,05	56,64%
Cbs	cystathionine beta-synthase	-0,84	56,64%
Ccdc109b	coiled-coil domain containing 109B	1,19	59,19%
Hopx	HOP homeobox	1,65	71,54%
Isl2	insulin related protein 2 (islet 2)	-0,62	99,94%
Ephb1	Eph receptor B1	-0,77	99,94%
Rarb	retinoic acid receptor, beta	-1,10	99,94%

Zur Überprüfung der im Microarray ermittelten, in der Tabelle 3.1 gelb hinterlegten, putativen Kandidatengene wurde eine quantitative *real time* PCR-Analyse durchgeführt. Dafür wurde von der im Array verwendeten RNA cDNA synthetisiert und diese in der quantitativen *real time* PCR eingesetzt. Für die Gene *Isl-2*, *Ephb1* und *Rarb*, welche eine „falsch positiv“ Wahrscheinlichkeit von 99,94% aufwiesen, konnte keine signifikante Herunterregulierung der Genexpression in den Tumoren der doppelt transgenen Mäuse (L/-T/-) nachgewiesen werden. Für die Gene *Cbs* und *Hopx* hingegen konnte eine Abnahme bzw. Zunahme der Expression in den Tumoren der doppelt transgenen Mäuse (L/-T/-) bestätigt werden. Die in dem Diagramm aufgezeigten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert der Genexpression der Tumore der doppelt transgenen Mäuse (L/-T/- #20 13F, 16F, 20F) im Vergleich zu den einfach transgenen Mäusen (T/- 27G, 36G, 44G). Die quantitative *real time* PCR-Analyse wurde als Duplikat durchgeführt (Abb. 3.29).

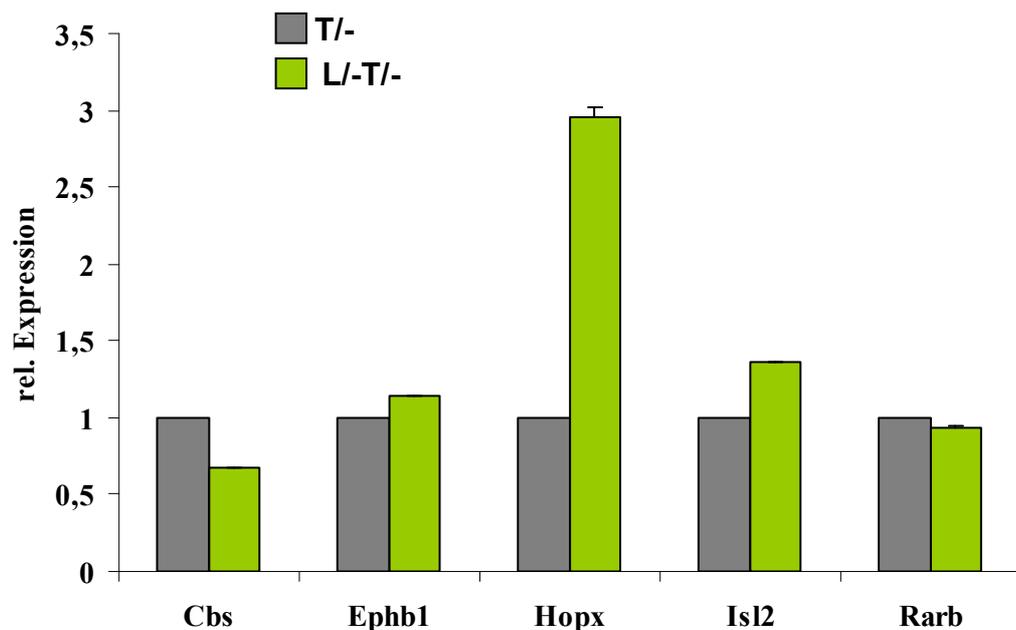


Abb. 3.29: Quantitative *real time* PCR-Analyse zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem cDNA-Microarray. Die in dem Array verwendete RNA aus den Tumoren der doppelt transgenen (L/-T/- #20 13F, 16F, 20F) und einfach transgenen Mäuse (T/- 27G, 36G, 44G) wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und für die quantitative *real time* PCR-Analyse eingesetzt. Für die Gene *Ephb1*, *Isl2* und *Rarb* konnte der Expressionsverlust in den doppelt transgenen Tumoren (L/-T/-) nicht bestätigt werden. Die Abnahme der Expression von *Cbs* und die Zunahme der Expression von *Hopx* in den doppelt transgenen Tumoren (L/-T/-) konnte hingegen gezeigt werden. Die quantitative *real time* PCR-Analyse wurde doppelt durchgeführt und jeweils der Mittelwert der Versuche angegeben. Die Genexpression in den Tumoren der einfach transgenen Mäuse (T/-) wurde gleich 1 gesetzt und die Genexpression der doppelt transgenen Mäuse (L/-T/-) dazu in Relation gebracht.

2.Hypothese: LPXN interagiert mit Proteinen, die die Zellmigration/ Invasion fördern

3.4 Caldesmon als Interaktionspartner von LPXN

Während meiner Diplomarbeit wurde zur Identifizierung von Interaktionspartnern von LPXN ein *Yeast-two-Hybrid-Screening* durchgeführt. Dafür wurde von der Firma *Clontech* eine humane Prostata cDNA-Bibliothek erworben, welche gebunden an eine Bindedomäne als „Beuteprotein“ fungierte. LPXN wurde in einen Vektor mit Aktivierungsdomäne kloniert und diente als „Köderprotein“. Das Aktin-bindende Protein Caldesmon konnte dabei als putativer Interaktionspartner von LPXN identifiziert werden [Beckemeyer, 2007].

Durch alternatives *splicing* von Caldesmon entstehen fünf verschiedene Isoformen [Hayashi *et al.*, 1992]. Während Isoform1 (h-Cald) als in Muskelzellen vorkommende Isoform beschrieben wird (90 – 150 kDa), treten die Isoformen 2-5 (l-Cald) mit einem geringeren Molekulargewicht (60 – 80 kDa) in Nichtmuskelzellen auf. In den Nichtmuskelzellen lokalisiert Caldesmon an den Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien des Zytoskeletts, wobei es ein bedeutender Faktor in der Organisation und Stabilisation des Mikrofilament-Netztes ist [Sobue *et al.*, 1991]. Es ist bereits bekannt, dass die Phosphorylierung von Caldesmon zu einer Inaktivierung des Proteins führt. Dies wiederum führt zu einer Destabilisierung des gesamten Zytoskeletts [Li *et al.*, 2009].

Da die Interaktion von LPXN und Caldesmon bislang nur mittels gerichteten *Yeast-two-Hybrid*-Experiments bestätigt wurde, war es Gegenstand weiterer Experimente diese Interaktion zu verifizieren.

3.4.1 Expression von Caldesmon in PCa-Zelllinien

Die Expression von Caldesmon in den etablierten PCa-Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP wurde mittels Northern Blot und Western Blot untersucht (Abb. 3.30). Sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene kann die stärkste Expression von Caldesmon in der androgen-unabhängigen PCa-Zelllinie PC-3 nachgewiesen werden. Im Northern Blot wurde zur Bestätigung der eingesetzten RNA-Menge eine Sonde gegen β -Aktin, im Western Blot zur Überprüfung der eingesetzten Proteinmenge ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet.

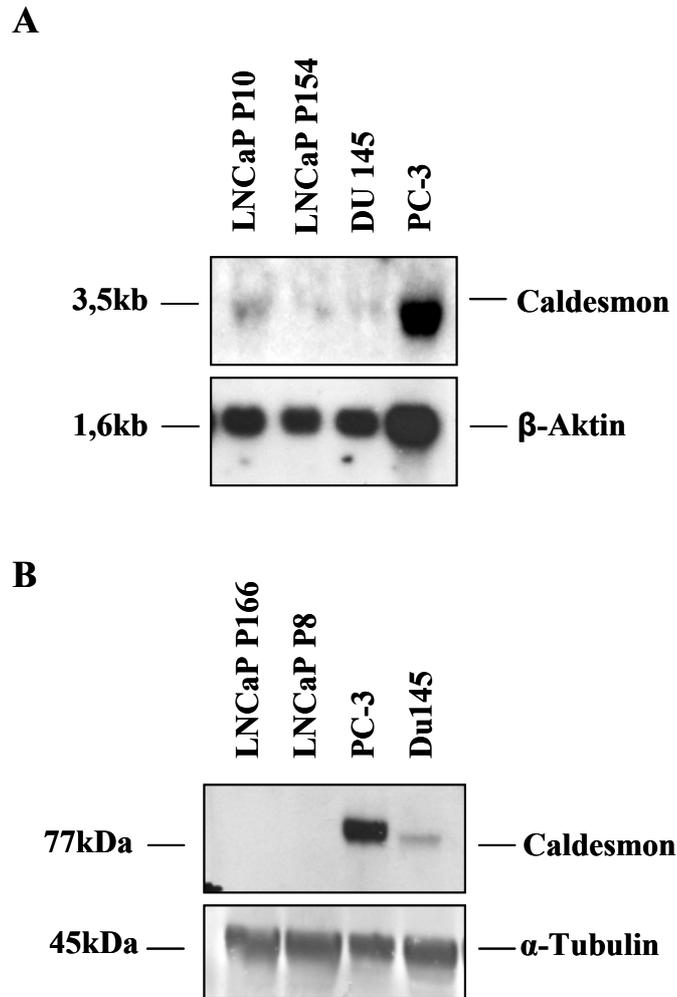


Abb. 3.30: Expression von Caldesmon in verschiedenen PCa-Zelllinien. Zur Untersuchung der Expression von Caldesmon in PCa-Zelllinien wurden eine Northern Blot- und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Zur Detektion von Caldesmon wurde die Northern Blot-Membran mit einer Caldesmon-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Die eingesetzte RNA-Konzentration wurde durch eine β -Aktin-Sonde überprüft. Im Western Blot wurde ein Caldesmon-Antikörper verwendet, der eine spezifische Bande bei der für Caldesmon erwarteten Größe von 77 kDa darstellt. Zur Überprüfung der eingesetzten Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin eingesetzt. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene konnte die stärkste Expression von Caldesmon in der PCa-Zelllinie PC-3 nachgewiesen werden.

3.4.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Caldesmon in den PCa-Zellen PC-3

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Caldesmon in den PCa-Zellen PC-3 wurden diese auf Glasobjektträgern ausplattiert und nach 24 h fixiert. Anschließend wurde zur Detektion von Caldesmon eine Immunzytochemie mit einem Caldesmon-spezifischen

Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 3.31 abgebildet, lokalisiert Caldesmon in den untersuchten PC-3-Zellen an den F-Aktin-Filamenten, welche hier zusätzlich durch FITC-Phalloidin angefärbt wurden.

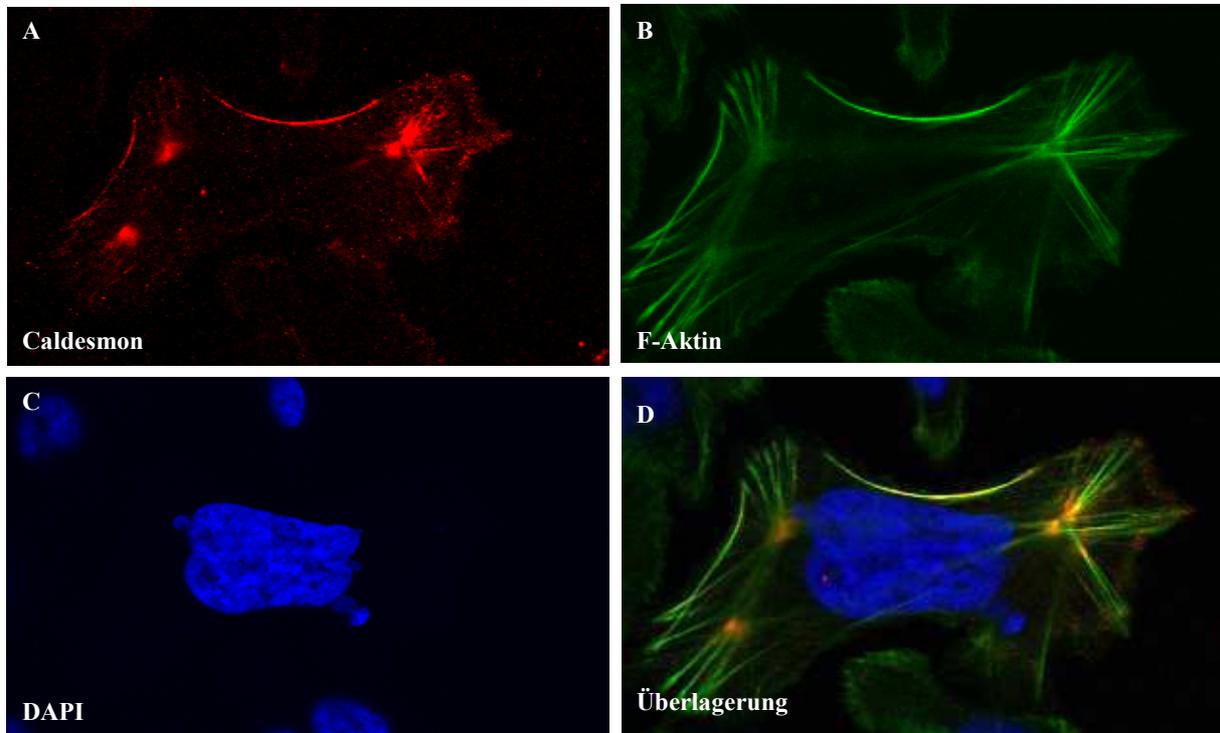


Abb. 3.31: Immunzytochemische Analyse zur subzellulären Lokalisation von Caldesmon in PC-3. A. PC-3-Zellen wurden auf Glasobjektträgern ausplattiert und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und Caldesmon mit einem spezifischen Antikörper detektiert. B. Die Visualisierung des Zytoskeletts erfolgte mit FITC-Phalloidin (F-Aktin). C. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Orange-Färbung in der Überlagerung weist auf eine Lokalisation von Caldesmon an den F-Aktin-Filamenten hin. Alle Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit 600facher Vergrößerung aufgenommen.

3.4.3 Subzelluläre Kolo­kalisierung von LPXN und Caldesmon in den PCa-Zellen PC-3

Um nachzuweisen, dass die subzelluläre Lokalisation von LPXN mit der Lokalisation von Caldesmon übereinstimmt, wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Zuvor wurden die PCa-Zellen PC-3 mit pEGFP-Caldesmon (Material und Methoden 2.8.7) transfiziert. Gleichzeitig erfolgte eine Transfektion der Zellen mit pCMV-LPXN-cmyc (Material und Methoden 2.8.7). Zur Detektion des Fusionsproteins LPXN-cmyc wurde ein cmyc-spezifischer Antikörper

verwendet. Die Überlagerung der Grün- und Rotfärbung zeigt deutlich, dass Caldesmon und LPXN am Ende der F-Aktin-Filamente, den *focal adhesion sites*, kolokalisieren (Abb. 3.32).

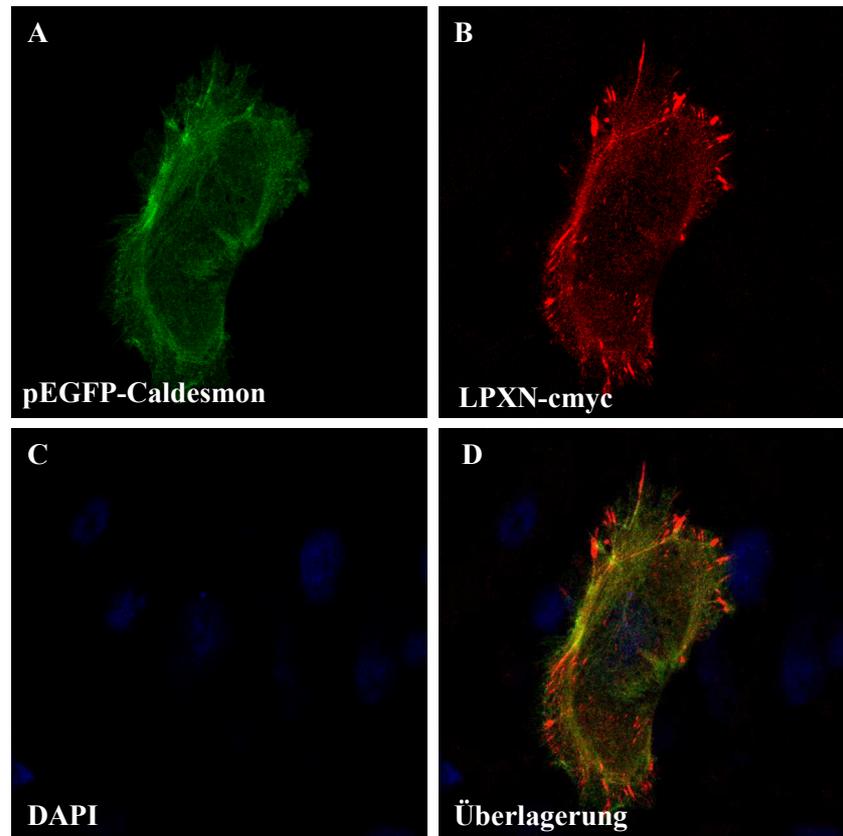


Abb. 3.32: Kolokalisation von LPXN und Caldesmon in den PCa-Zellen PC-3. Mittels Immunzytochemie konnte eine subzelluläre Kolokalisation von LPXN und Caldesmon in den PC-3-Zellen festgestellt werden. Dafür wurden die Zellen mit den Plasmiden zur Überexpression von EGFP-Caldesmon und LPXN-cmyc kotransfiziert, auf einem Glasobjektträger ausplattiert und nach 24 h fixiert. LPXN-cmyc wurde mit einem cmyc-spezifischen Antikörper detektiert. A. Die Überlagerung der kotransfizierten Zellen zeigt eine Lokalisation sowohl von Caldesmon als auch von LPXN an den Enden der F-Aktin-Filamente, den *focal adhesion sites*. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Die Bilder wurden mit einem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop mit einer 600fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.4.4 Interaktionsnachweis von LPXN und Caldesmon durch ein GST-*Pulldown*-Experiment

Ein Experiment, um die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen LPXN und Caldesmon nachzuweisen, stellt der GST-*Pulldown* dar. Dafür wurde LPXN zunächst als Gluthation-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt (Material und Methoden, 2.27.2). Um zu untersuchen, mit welchem Bereich von LPXN die Interaktion mit

Caldesmon stattfindet, wurden GST-Konstrukte generiert, die einerseits nur die LIM-Domäne (GST-LPXN-LIM) von LPXN und andererseits nur die LD-Motive (GST-LPXN-LD) von LPXN (Material und Methoden 2.8.7) enthielten. Gleichzeitig wurden PC-3-Zellen zur Überexpression von Caldesmon mit pEGFP-Caldesmon transfiziert. Nach der Aufreinigung des GST-LPXN Fusionsproteins und der Isolierung des Gesamtproteins der transfizierten PC-3-Zellen wurden diese zusammen inkubiert. Durch die bestehende Interaktion von LPXN und Caldesmon konnte der gesamte (GST-LPXN)-(EGFP-Caldesmon)-Komplex anschließend an die Gluthation-Sepharose binden. Nicht gebundenes Protein wurde durch nachfolgende Waschschrte entfernt. Die Elution der Komplexe von der Gluthation-Sepharose erfolgte mittels reduziertem Gluthation. Nach der Isolierung des gebundenen Proteins wurde eine Western Blot-Analyse mit einem Caldesmon-spezifischen Antikörper und zur Überprüfung der erfolgreichen Aufreinigung mit einem GST-spezifischen Antikörper durchgeführt. In einem Kontrollansatz wurde das Protein der transfizierten PC-3-Zellen mit GST-Protein inkubiert. Wie in Abbildung 3.33 dargestellt, konnte eine Interaktion von Caldesmon mit LPXN (GST-LPXN), genauer mit der LD-Domäne von LPXN (GST-LPXN-LD), nachgewiesen werden.

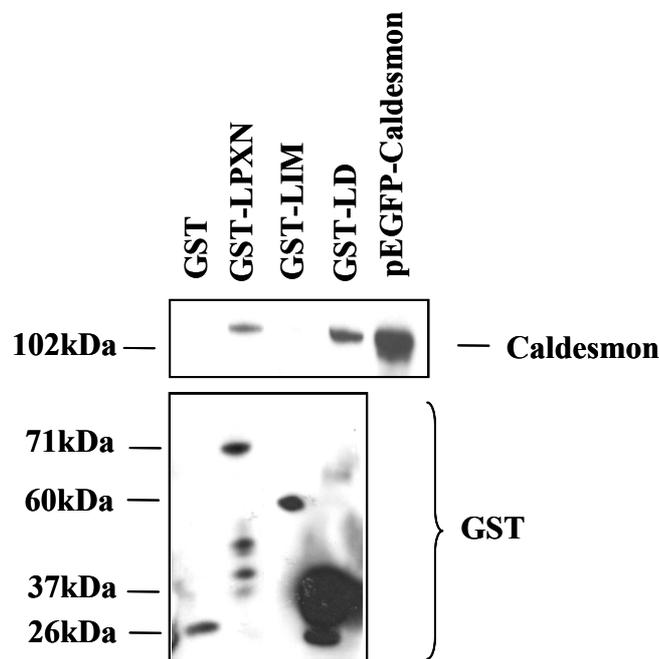


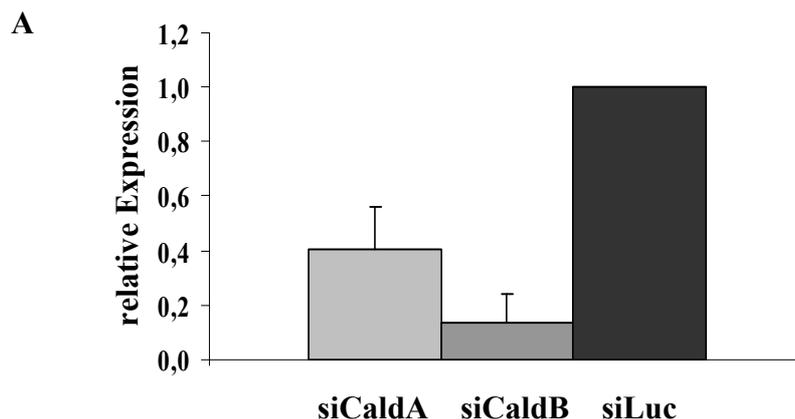
Abb. 3.33: GST-Pull-down zur Bestätigung der Interaktion von LPXN und Caldesmon. PC-3-Zellen wurden mit einem pEGFP-Caldesmon-Plasmid transfiziert und nach 48 h Gesamt-Protein isoliert. Anschließend wurden mit den in Bakterien überexprimierten Fusionsproteinen (GST-LPXN, GST-LPXN-LIM, GST-LPXN-LD, GST) und dem Gesamt-Protein der Zellen ein GST-Pull-down durchgeführt. Nach Aufreinigung der Proteine wurde zur

Überprüfung der Interaktion von LPXN und Caldesmon eine Western Blot-Analyse mit einem Caldesmon-spezifischen Antikörper durchgeführt. Für das gesamte LPXN (GST-LPXN) sowie die LD-Domäne von LPXN (GST-LD) konnte für Caldesmon eine Interaktion mit LPXN bestätigt werden. In der Negativkontrolle (GST) wurde keine Bande in der für EGFP-Caldesmon erwarteten Größe (102 kDa) detektiert. Als Positivkontrolle der Western Blot-Analyse und als Überprüfung der erfolgreichen Überexpression von EGFP-Caldesmon in PC-3-Zellen wurde zusätzlich der *Input* (EGFP-Caldesmon) aufgetragen. Die Überprüfung der aufgereinigten GST-Fusionsproteine erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit einem GST-Antikörper.

3.4.5 Analysen zur Funktion von Caldesmon

3.4.5.1 Herunterregulierung der Expression von Caldesmon in PCa-Zelllinien mittels RNA-Interferenz

Die Funktion von Caldesmon in den PCa-Zelllinien wurde durch die Herunterregulierung der Expression untersucht. Dazu wurden PC-3-Zellen mit zwei verschiedenen Caldesmon-spezifischen Duplex-siRNA-Oligonukleotiden transfiziert (siCaldA und siCaldB). Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Duplex-siRNA-Oligonukleotid transfiziert, welches spezifisch gegen das Luciferase-Gen gerichtet ist (Material und Methoden 2.22.2). 72 h nach der Transfektion wurden Gesamt-RNA bzw. Gesamt-Protein isoliert. Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend für eine quantitative *real time* PCR-Analyse eingesetzt. 50 µg des isolierten Gesamt-Proteins wurden für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Aus der Abbildung 3.34 ergibt sich, dass sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene eine spezifische Herunterregulierung der Caldesmon-Expression durch die siRNA-Oligonukleotide erfolgt. In der quantitativen *real time* PCR-Analyse konnte eine Reduktion der Caldesmon-Expression um 60% (siCaldA) bzw. 85% (siCaldB) ermittelt werden.



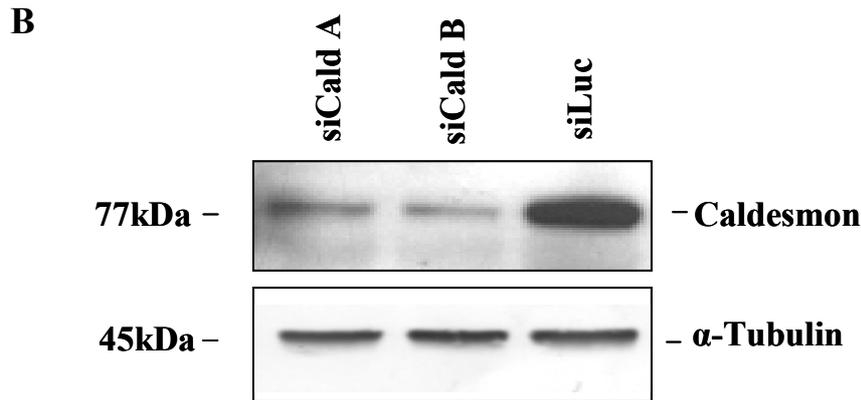


Abb. 3.34 Quantitative *real time* PCR-Analyse und Western Blot-Analyse zur Bestätigung der herunterregulierten Caldesmon-Expression in PC-3-Zellen nach Transfektion mit spezifischer siRNA. Zur Herunterregulierung der Caldesmon-Expression wurden PC-3-Zellen mit Caldesmon-spezifischer siRNA (siCaldA, siCaldB) und als Kontrolle gegen das Luciferase-Gen transfiziert. A. Die quantitative *real time* PCR-Analyse bestätigt einen *knockdown* der Caldesmon-Expression durch die siRNA um 60% (siCaldA) bzw. 85% (siCaldB). Dabei wurde jeweils die relative Expression von Caldesmon, abgeglichen gegen ein *Housekeeping*-Gen ermittelt. B. Auf Proteinebene konnte ebenfalls eine spezifische Herunterregulierung der Caldesmon-Expression nach Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA demonstriert werden. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurde die Western Blot-Membran mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper hybridisiert.

3.4.5.2 Verstärkte Zellmigration von PC-3- und DU 145-PCa-Zellen nach Herunterregulierung der Caldesmon-Expression

Da Caldesmon an den Stressfasern des Zytoskeletts lokalisiert ist und ein bedeutender Faktor in der Organisation und Stabilisation des Mikrofilament-Netzwerkes darstellt, stellte sich die Frage, ob Caldesmon, ebenso wie LPXN, in die Migrationsfähigkeit der PCa-Zellen involviert ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Migrationsassay durchgeführt. Dazu wurden PC-3-Zellen zunächst mit Caldesmon-spezifischer siRNA und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden 80000 Zellen in einer Transwell-Migrations-Kammer ausplattiert und anschließend für weitere 24 h inkubiert. Während dieser Zeit konnten die migrierenden Zellen auf die andere Seite der PET-Membran gelangen. Nach der Inkubationszeit wurden die in der Kammer verbliebenen Zellen entfernt und die Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert und angefärbt. Danach wurde die Membran vorsichtig aus der Kammer geschnitten und auf einem Objektträger eingedeckelt.

Unter einem Mikroskop wurden Zellen in 5 Sichtfeldern in 200facher Vergrößerung ausgezählt (Material und Methoden, 2.21). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Wie in Abbildung 3.35 zu erkennen, weisen sowohl die PC-3- als auch die DU 145-PCa-Zellen nach Herunterregulierung der Caldesmon-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen eine erhöhte Migrationsfähigkeit auf (A + B).

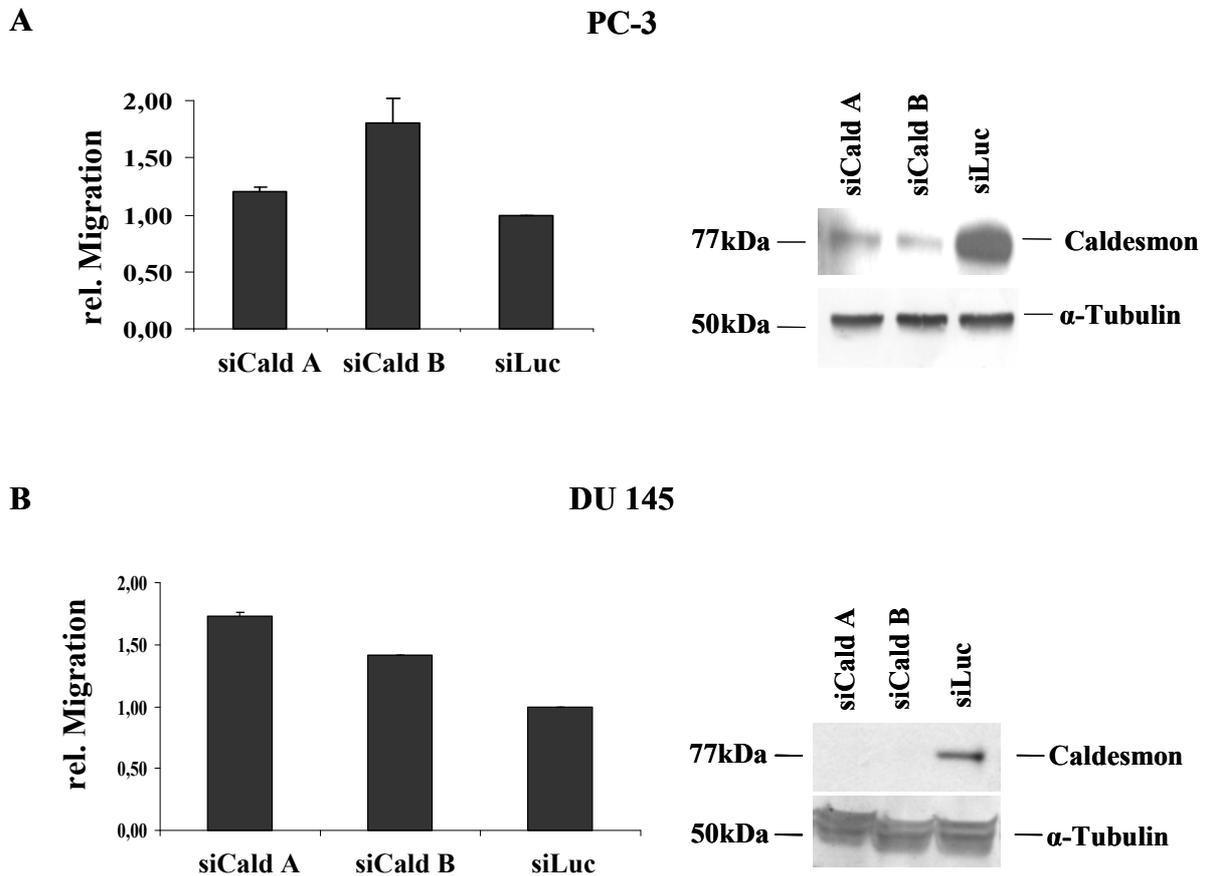


Abb. 3.35: Migrationsassay zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit von PC-3- und DU 145-PCa-Zellen nach Herunterregulierung der Caldesmon-Expression. Die Migrationsfähigkeit von PC-3- und DU 145-Zellen wurde durch einen Transwell-Migrationsassay überprüft. Dafür wurde die Expression von Caldesmon in den PCa-Zellen mittels siRNA herunterreguliert (siCaldA, siCaldB). Als Kontrolle wurden die Zellen mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert (siLuc). Die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde dadurch bestimmt, wie viele Zellen während einer Inkubationszeit von 24 h durch eine PET-Membran hindurchwandern konnten. Das Auszählen von fünf verschiedenen Sichtfeldern unter dem Mikroskop ergab das mittlere Migrationsverhalten der Zellen. Die Versuche wurden jeweils als Triplet durchgeföhrt und der Mittelwert einschließlich der Standardabweichung grafisch dargestellt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Herunterregulierung der Caldesmon-Expression in den PC-3- und DU 145-PCa-Zellen wurde eine Western Blot-Analyse durchgeföhrt. Dazu wurde zur Detektion von Caldesmon ein spezifischer Caldesmon-Antikörper, zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet.

3.4.5.3 Caldesmon hat keinen Einfluss auf die Proliferation von PCa-Zellen

Eine weitere Eigenschaft von Caldesmon ist die Regulation des Zellzyklus durch eine Beschleunigung des Eintritts in die M-Phase [Kordowska *et al.*, 2005]. Um zu überprüfen, ob Caldesmon in die Proliferation von PC-3- und DU 145-PCa-Zellen involviert ist, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt, bei dem die Zunahme der Lebendzellzahl während einer Zeitspanne von 72 h gemessen wurde (siehe Material und Methoden 2.19). Die Expression von Caldesmon in den Zelllinien PC-3 und DU 145 wurde für diese Analyse herunterreguliert und anschließend wurde im Abstand von 24 h die Umsetzung eines Tetrazolium-Gemischs durch die metabolisch aktiven Zellen bei 490 nm gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Proliferations-Verhalten der Caldesmon siRNA-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Sowohl in PC-3- als auch in DU 145-Zellen nimmt Caldesmon keinen Einfluss auf die Proliferation (Abb. 3.36).

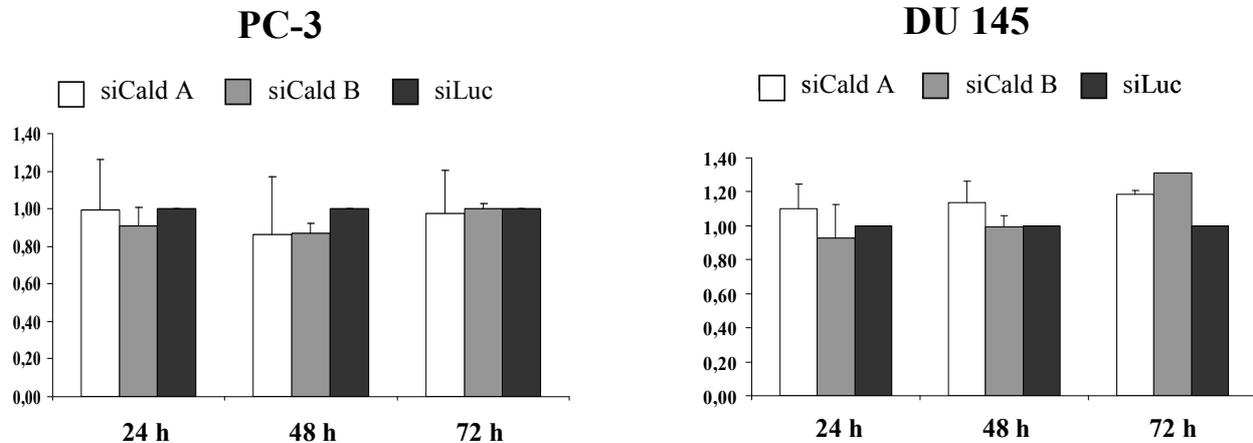


Fig. 3.36: Caldesmon nimmt keinen Einfluss auf die Proliferation der PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145. PC-3- und DU 145-Zellen wurden mit siRNA gegen Caldesmon (siCaldA und siCaldB) und als Kontrolle gegen Luciferase (siLuc) transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen für die Proliferationsmessung in 96-Well-Platten ausplattiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Abstand von 24 h mit einem MTS-Assay bestimmt. In beiden Zelllinien resultiert die Herunterregulierung der Caldesmon-Expression in keiner sichtbaren Veränderung des Proliferationsverhaltens.

3.4.6 Analysen zur Expression von Caldesmon in Abhängigkeit der LPXN-Expression

Die Expressionsstärke von LPXN und Caldesmon in den PCa-Zelllinien korreliert sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene (siehe 3.4.1 und Kaulfuß *et al.*, 2008). Daher besteht die Möglichkeit, dass eine Form der Interaktion zwischen den beiden Proteinen die gegenseitige oder einseitige Regulation der Expression ist. Um dies zu untersuchen, wurde in den PC-3 PCa-Zellen die Expression von LPXN mittels siRNA herunterreguliert. Kontrollzellen wurden gleichzeitig mit Luciferase-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurde aus den Zellen Gesamt-Protein isoliert und 50 µg für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Analyse der Caldesmon-Expression in diesen Zellen wurde mit einem Caldesmon-spezifischen Antikörper durchgeführt. In Abbildung 3.37 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Expressionsstärke von Caldesmon nicht durch eine herunterregulierte LPXN-Expression verändert.

Weiterhin wurde eine Western Blot-Analyse mit Proteinen der LPXN-überexprimierenden Primärzellklone (83A und 72A) aus den doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen durchgeführt. Als Kontrolle dienten die Proteine der Primärzellklone aus den einfach transgenen TRAMP-Mäusen (27F und 45F). Diese Western Blot-Analyse bestätigt ebenfalls, dass die Expression von Caldesmon nicht in Abhängigkeit zur LPXN-Expression reguliert wird. Auch nach Überexpression von LPXN ist keine Veränderung des Expressionslevels von Caldesmon zu erkennen. Beide Western Blot-Analysen wurden dreimal wiederholt (Abb. 3.37).

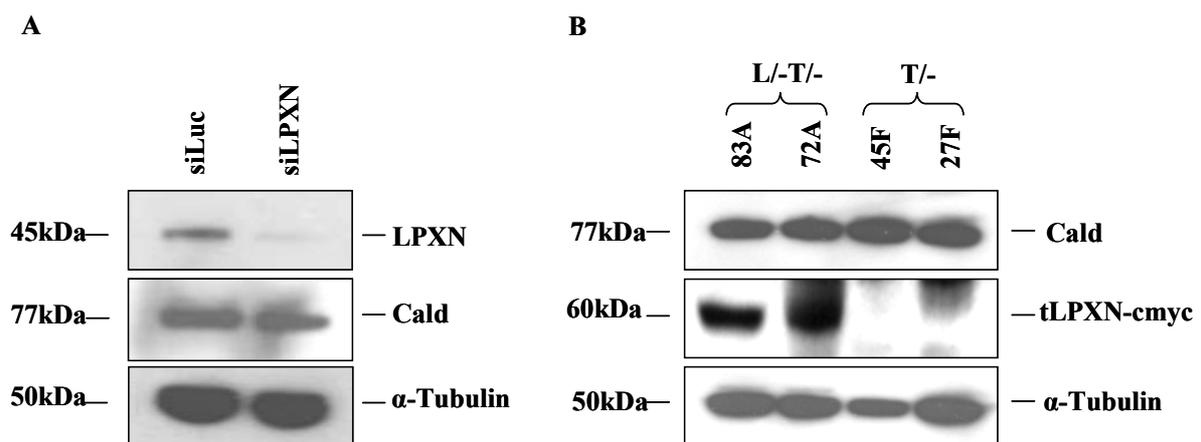


Abb. 3.37: LPXN hat keinen Einfluss auf die Expressionsstärke von Caldesmon. PC-3-PCa-Zellen wurden zur Herunterregulierung der LPXN-Expression mit spezifischer siRNA transfiziert. A. Nach 72 h wurde Gesamt-Protein isoliert und 50 µg für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Mit einem Caldesmon-Antikörper

konnte bei 77 kDa eine spezifische Bande detektiert werden. Die verminderte LPXN-Expression führte nicht zu einer deregulierten Caldesmon-Expression. Zum Nachweis der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet. Die Herunterregulierung der LPXN-Expression konnte durch Hybridisierung der Membran mit einem LPXN-Antikörper bestätigt werden. B. Die Expression von Caldesmon wurde zusätzlich in den LPXN-überexprimierenden Primärzellen der doppelt transgenen Mäuse (T/-L/-, 83A und 72A) im Vergleich zu den einfach transgenen Mäusen (T/-, 45F und 27F) untersucht. Der verwendete Caldesmon-Antikörper detektiert keinen Unterschied im Expressionslevel von Caldesmon in Abhängigkeit zur LPXN-Expression. Zur Detektion des transgenen tLPXN-cmyc wurde ein LPXN-Antikörper verwendet. Die aufgetragene Proteinmenge wurde mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper kontrolliert.

3.4.7 Analysen zur Phosphorylierung von Caldesmon in Abhängigkeit zur LPXN-Expression

LPXN ist ein Adapterprotein und bildet somit eine Plattform, von der verschiedene Signalwege ausgehen können. LPXN ist z.B. in der Lage, Kinasen zu rekrutieren, welche wiederum Caldesmon phosphorylieren könnten. Es ist bereits beschrieben worden, dass Caldesmon ein Substrat der CDC2-Kinase sowie von ERK1/2 MAPK [Li *et al.*, 2009; Hai *et al.*, 2005] ist und dass Caldesmon durch die Phosphorylierung in einen inaktiven Zustand übergeht. Das bedeutet, dass phosphoryliertes Caldesmon von den Aktin-Filamenten dissoziiert, das Zytoskelett destabilisiert wird und die Zellen z.B. eine größere Migrationsfähigkeit entwickeln.

Um zu untersuchen, ob der Phosphorylierungsstatus von Caldesmon abhängig ist von der Expressionsstärke von LPXN, wurden PC-3-PCa-Zellen mit LPXN- und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde die Zellen durch 24stündigen Serumentzug synchronisiert und durch erneute Serumgabe für vier Stunden zum Wachstum angeregt. Anschließend wurde Gesamt-Protein aus den Zellen isoliert und 50 μ g für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Die Membran wurde mit einem Antikörper hybridisiert, der spezifisch nur die phosphorylierte Form von Caldesmon erkennt. Um zu überprüfen, ob die Gesamt-Proteinmenge von Caldesmon in beiden Proben nicht voneinander abweicht, wurde die Membran zusätzlich mit einem Antikörper inkubiert, der sowohl die phosphorylierte als auch die nicht-phosphorylierte Form von Caldesmon detektiert. Wie in Abbildung 3.38 zu erkennen ist, nimmt die Proteinmenge an phosphoryliertem Caldesmon nach LPXN

knockdown (siLPXN) im Vergleich zu den Kontrollen (siLuc) stark ab. Gleichzeitig bleibt die Menge des insgesamt exprimierten Caldesmon in beiden Zellen konstant.

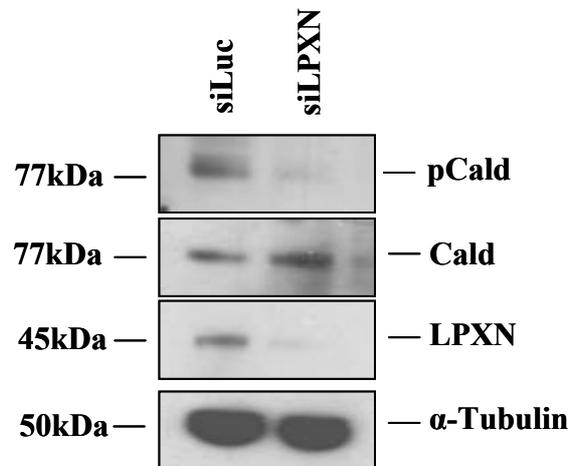


Abb. 3.38: Western Blot-Analyse zur Phosphorylierung und Expression von Caldesmon in PC-3-PCa-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression. PC-3-PCa-Zellen wurden mit spezifischer LPXN- bzw. Luciferase-siRNA transfiziert, nach insgesamt 72 h Gesamt-Protein isoliert und 50 μ g für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Zunächst wurde ein Antikörper eingesetzt, der nur die phosphorylierte Form von Caldesmon erkennt (pCald). Anschließend wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form von Caldesmon detektiert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Herunterregulierung der LPXN-Expression wurde ein Antikörper gegen LPXN eingesetzt. Die aufgetragene Proteinmenge wurde mit einem α -Tubulin-spezifischen Antikörper überprüft. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach dem *knockdown* der LPXN-Expression der Phosphorylierungsgrad von Caldesmon stark abnimmt.

3. Hypothese: LPXN beeinflusst die Zelladhäsion

3.5 LPXN beeinflusst die Zelladhäsion und die Zytoskelett-Organisation

Die Migration und Invasion von PCa-Zellen wird maßgeblich von den adhäsiven Eigenschaften der Zelle zur extrazellulären Matrix (ECM) bestimmt. Zelloberflächenrezeptoren sind dafür verantwortlich, die extrazellulären Signale einzufangen und diese an das Zytoskelett weiterzugeben. Da LPXN ein Adapterprotein ist, könnte es ein wichtiges Bindeglied zwischen den Zelloberflächenrezeptoren und den intrazellulären Signalwegen darstellen und somit die adhäsiven Eigenschaften einer Zelle mitbestimmen.

3.5.1 Analyse der Zelladhäsion und –organisation nach LPXN-Herunterregulierung *in vitro*

3.5.1.1 Verringerte Zelladhäsion und Zellzahl nach Herunterregulierung der LPXN-Expression

Zur Bestimmung des Einflusses von LPXN auf die adhäsiven Eigenschaften der Zellen wurde ein Zelladhäsions-Assay durchgeführt (Material und Methoden 2.20). Dafür wurden PC-3 PCa-Zellen mit LPXN-spezifischer siRNA und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. Jeweils zwei Wells eines Glasobjektträgers wurden für 2 h mit dem Matrixmoleküle Fibronectin beschichtet, während zwei Wells unbeschichtet blieben. Die transfizierten Zellen wurden darauf ausplattiert und nach 1 h bzw. 2 h wurden die adhären Zellen fixiert. Mittels Immunzytochemie wurde das Zytoskelett visualisiert und die Zellen auf ihre Anzahl und Größe hin analysiert. Wie in Abbildung 3.39 zu erkennen ist, konnten von den Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression weniger Zellen auf Fibronectin beschichteten Objektträgern adhären als von den Kontrollzellen (siLuc). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Zellen nach LPXN *knockdown* eine geringere Zelloberfläche aufweisen als die Kontrollzellen. Während das Zytoskelett der hier abgebildeten PC-3-Kontrollzellen nach 2 h bereits weit ausgebreitet ist und einen festen Kontakt zur Matrix

aufgebaut hat, sind die Zellen mit LPXN *knockdown* noch rund und ohne weitere Zellfortsätze.

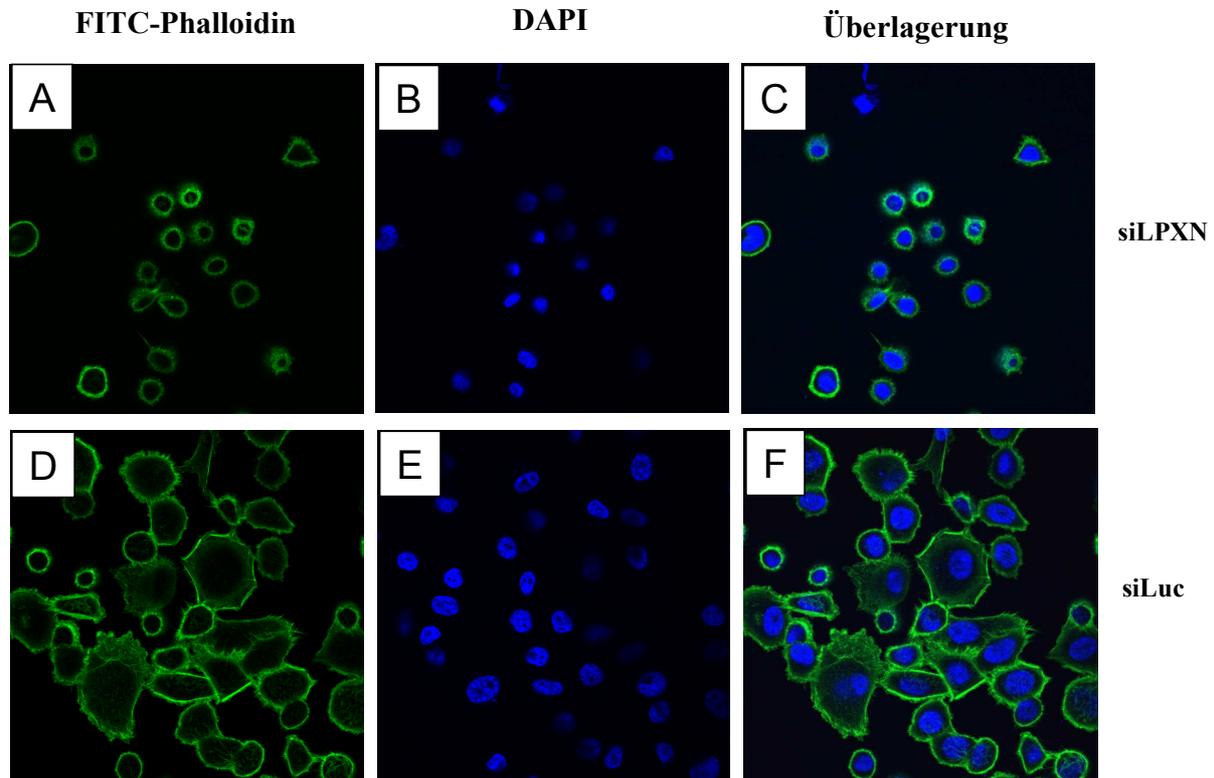


Abb. 3.39: Immunzytochemie zur Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften von PC-3-Prostatakarzinomzellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression. PC-3-Zellen wurden mit LPXN-(siLPXN) und Luciferase-spezifischer (si.Luc) siRNA transfiziert und nach 72 h für 2 h auf Fibronectin-beschichteten Glasobjektträgern ausplattiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zur Visualisierung des Zytoskeletts mit FITC-gekoppeltem Phalloidin behandelt, das die F-Aktin-Fasern anfärbt (FITC-Phalloidin) (A + D). Die Kerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht (B + E). Die Herunterregulierung der LPXN-Expression äußert sich in einer geringeren Anzahl adhärenter Zellen sowie einer verminderten Zelloberfläche der adhärenter Zellen (C und F). Alle Bilder wurden mit einem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop in 600facher Vergrößerung aufgenommen.

Als Kontrolle wurden die transfizierten Zellen (siLPXN und siLuc) nach dem Ausplattieren für einen längeren Zeitraum (24 h) inkubiert. In Abbildung 3.40 wird deutlich, dass sich die adhärenter Zellen sowohl in der Größe als auch in der Anzahl nach 24 h nicht mehr voneinander unterscheiden.

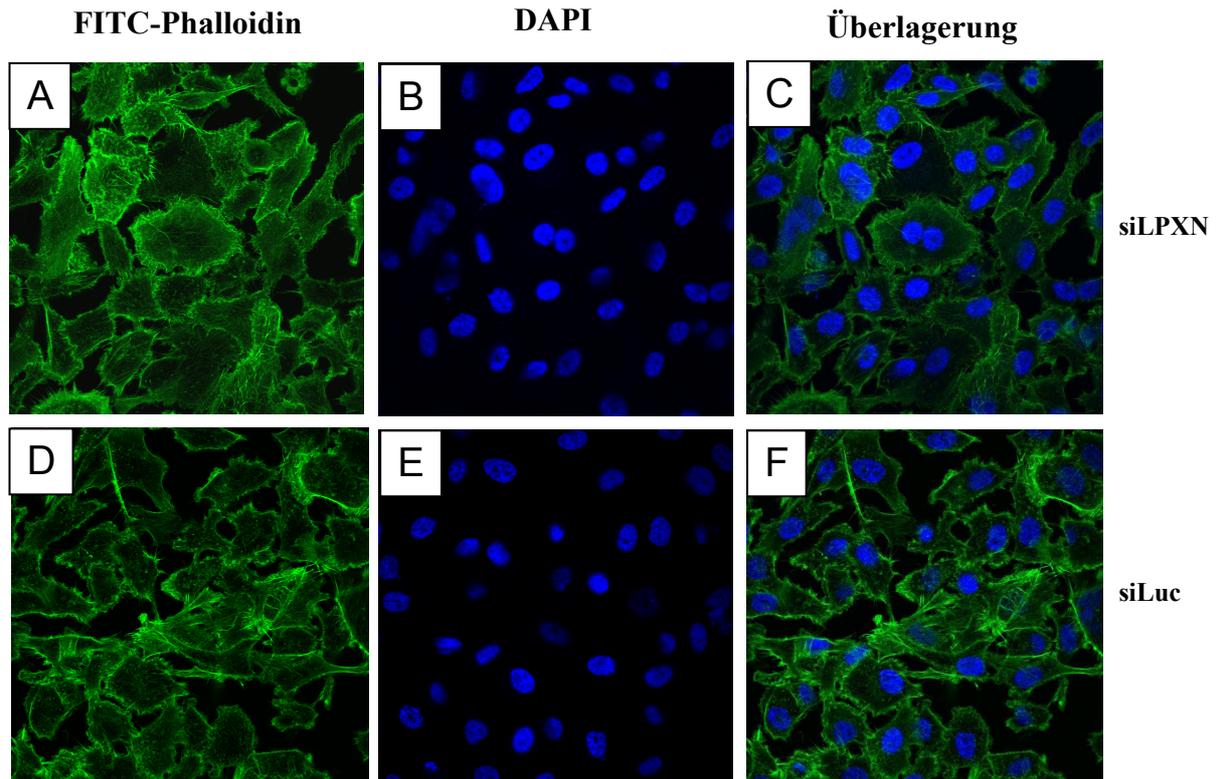
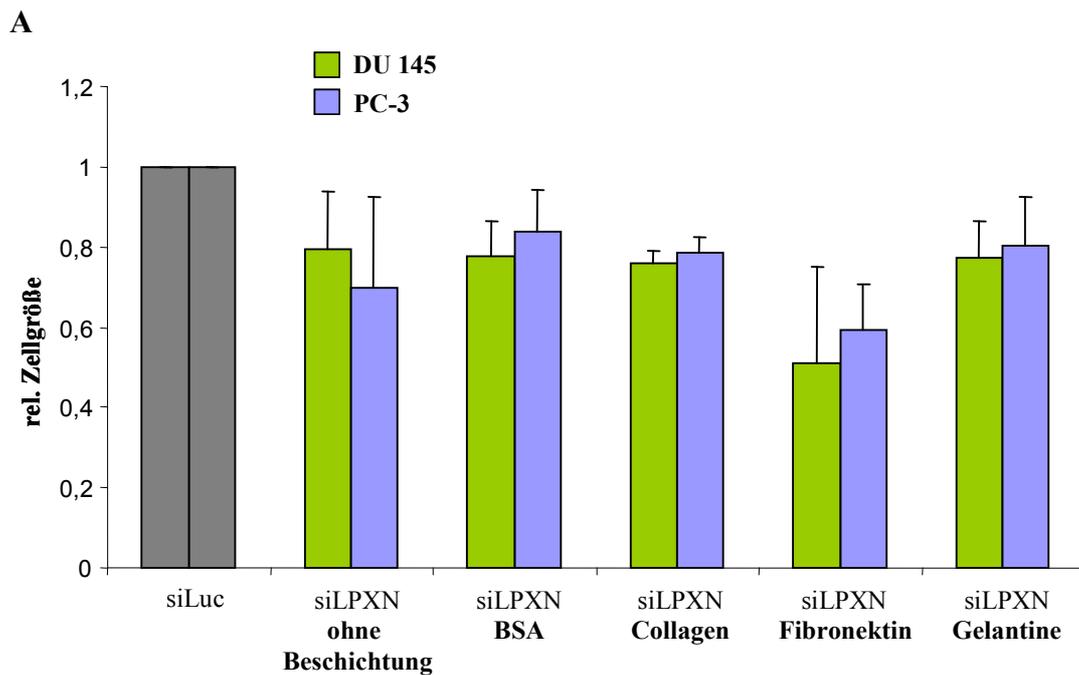


Abb. 3.40: Immunzytochemie zur Analyse der adhäsiven Eigenschaften von PC-3-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression. PC-3-Zellen wurden für 72 h mit LPXN- (siLPXN) und Luciferase- (siLuc) spezifischer siRNA transfiziert und anschließend für 24 h auf einem Objektträger ausplattiert. Nach der Fixierung wurde das Zytoskelett mit FITC-Phalloidin visualisiert (A und D) und die Kerne mit DAPI gefärbt (B und E). Nach 24 h können keine Unterschiede in der Zellzahl bzw. Zellgröße der adhärenen Zellen (siLPXN vs. siLuc) beobachtet werden. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalem *Lasescanning*-Mikroskop mit einer 600fachen Vergrößerung aufgenommen.

Zur Untersuchung der adhäsiven Eigenschaften der Zellen auf verschiedenen beschichteten Glasobjektträgern wurden diese für jeweils 2 h auf den Matrixmolekülen Fibronectin, Rattenschwanz-Collagen (Collagen), Bovines Serum-Albumin (BSA) und Gelatine inkubiert. Zwei Wells eines Glasobjektträgers blieben unbeschichtet. Anschließend wurden LPXN- und Luciferase-siRNA transfizierte PC-3- und DU 145-Zellen ausplattiert und die adhärenen Zellen nach 2 h fixiert. Das Zytoskelett wurde mit FITC-Phalloidin sichtbar gemacht und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Jeweils fünf Sichtfelder der fünf verschiedenen Beschichtungen der LPXN- bzw. Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen wurden ausgezählt und jeweils die Zelloberfläche aller Zellen ermittelt. Die Versuche wurden als Triplet durchgeföhrt und der Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet. Die Anzahl bzw. die durchschnittliche Oberfläche der Luciferase-transfizierten Zellen der jeweiligen Beschichtung wurden gleich 1 gesetzt und dazu jeweils die Anzahl bzw. Oberfläche der

LPXN siRNA-transfizierten Zellen in Relation gebracht. In der Abbildung 3.41 A ist zu erkennen, dass die relative Oberfläche der Zellen mit LPXN *knockdown* auf Fibronectin-beschichteten Objektträgern den größten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigt. Weiterhin ist in Abbildung 3.41 B deutlich zu sehen, dass auf allen Beschichtungsmaterialien nach Herunterregulierung der LPXN-Expression eine verminderte Zellzahl adhärenter Zellen zu verzeichnen ist. Durch den Verlust der LPXN-Expression verlieren die Zellen demnach die Adhäsionseigenschaften zu der ECM, was sowohl zu einer reduzierten Zellzahl als auch einer reduzierten Zelloberfläche führt.

Zusätzlich konnte mit Hilfe von Invasionskammern, die mit den ECM-Komponenten Fibronectin, Collagen I, Collagen IV und Laminin beschichtet waren, demonstriert werden, dass nach Herunterregulierung der LPXN-Expression die Invasionsfähigkeit der Zellen am stärksten in den Fibronectin-beschichteten Kammern reduziert ist [Kaulfuß *et al.*, 2009].



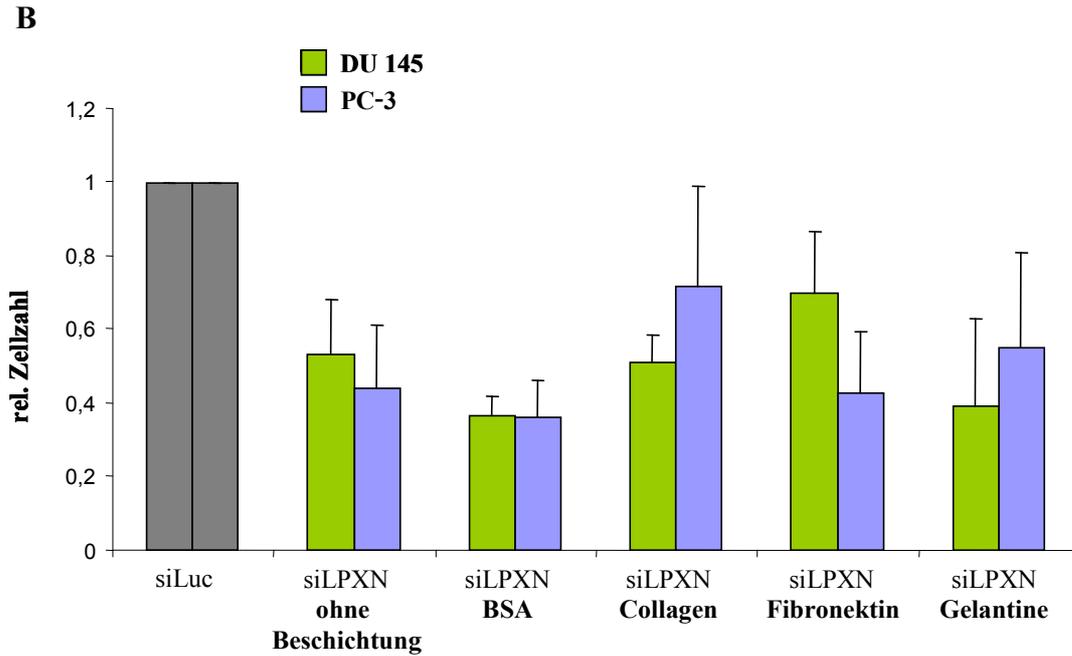
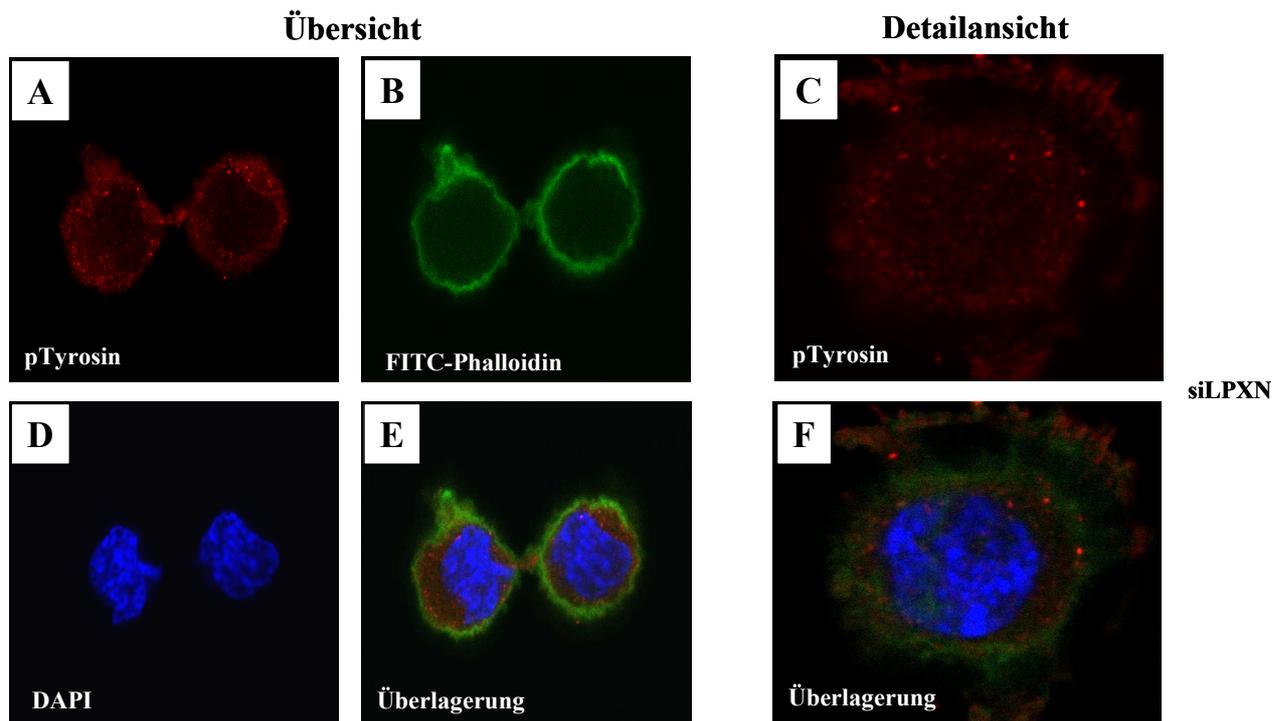


Abb. 3.41: Verlust der adhäsiven Eigenschaften von PC-3- und DU 145-PCa-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression. LPXN-siRNA- und Luciferase-siRNA-transfizierte PC-3- und DU 145-Zellen wurden auf Glasobjektträgern ausplattiert, welche zuvor mit Bovinem Serum-Albumin (BSA), Rattenschwanz-Collagen (Collagen), Fibronectin und Gelatine beschichtet wurden bzw. ohne Beschichtung blieben. Nach 2 h wurden die nicht adhärenen Zellen vorsichtig abgenommen und die restlichen Zellen fixiert. Anschließend konnten die Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop auf Zelloberfläche (A) und Anzahl (B) analysiert werden. Dabei wurden jeweils fünf Sichtfelder der fünf verschiedenen Beschichtungen der LPXN- bzw. Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen fotografiert und jeweils die Anzahl und Oberfläche der Zellen ermittelt. Die Anzahl bzw. die durchschnittliche Oberfläche der Luciferase-transfizierten Zellen der jeweiligen Beschichtung wurde gleich 1 gesetzt und dazu jeweils die Anzahl bzw. Oberfläche der LPXN-siRNA-transfizierten Zellen in Relation gebracht. Alle Versuche wurden als Triplett durchgeführt und der Mittelwert \pm Standardabweichung ermittelt.

3.5.1.2 Verringerte Bildung von *focal adhesion sites* nach Herunterregulierung der LPXN-Expression

Focal adhesion sites spielen bei der Zellmigration und Zelladhäsion eine bedeutende Rolle. Durch den Auf- und Abbau der *focal adhesion sites* entsteht eine dynamische Struktur, durch die die Zelle in der Lage ist, sich zu bewegen. Ob die Expressionsstärke des *focal adhesion proteins* LPXN allein dazu beitragen kann, dass die Bildung der *focal adhesion sites* während

der Zelladhäsion beeinflusst wird, wurde in einer immunzytochemischen Analyse untersucht. Dafür wurden LPXN- und Luciferase-transfizierte DU 145-PCa-Zellen auf Fibronektin-beschichteten Glasobjektträgern ausplattiert und nach einer Inkubationszeit von 2 h fixiert. Anschließend wurden die *focal adhesions sites* mit einem Antikörper gegen phospho-Tyrosin angefärbt. DU 145-Zellen, die mit LPXN-spezifischer siRNA transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zu den Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen deutlich definiertere und stärkere *focal adhesions sites* (Abb. 3.42).



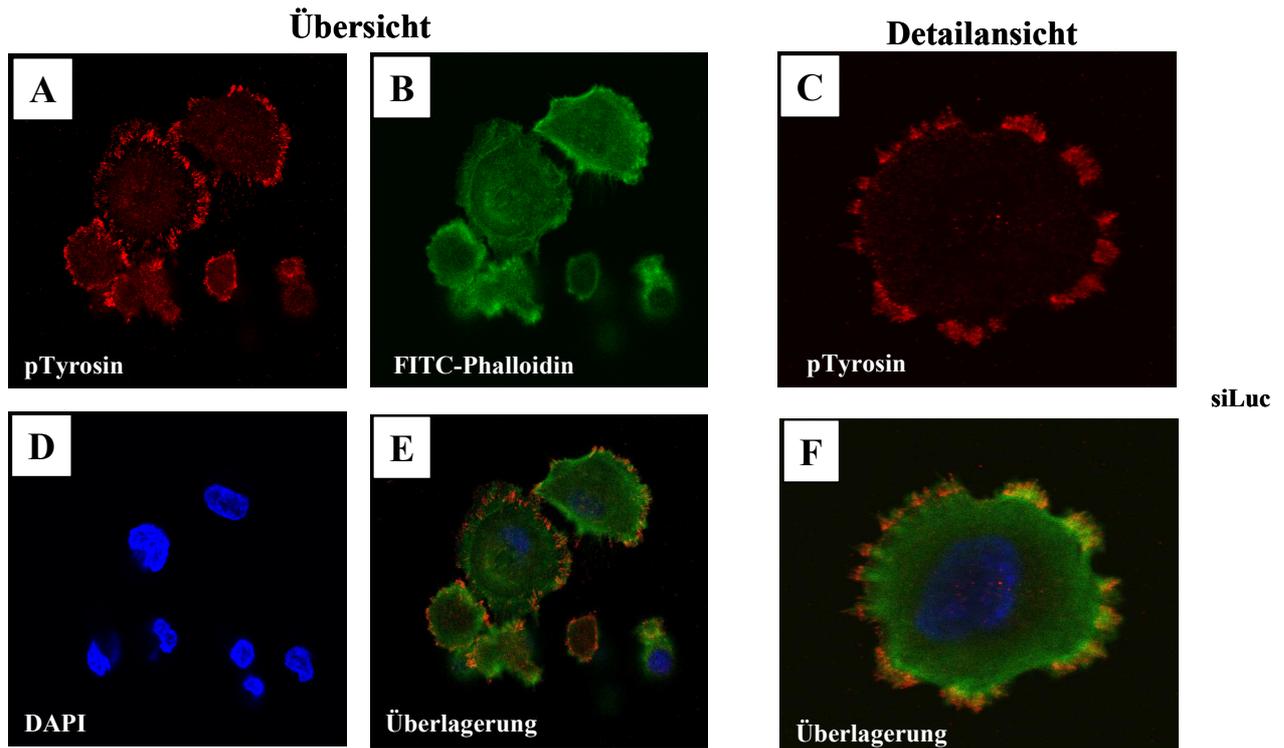


Abb. 3.42: Immunzytochemie zur Analyse der *focal adhesion sites* nach Herunterregulierung der LPXN-Expression. DU 145 PCa-Zellen wurden mit spezifischer siRNA gegen LPXN (siLPXN) und als Kontrolle gegen Luciferase (siLuc) transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen für 2 h auf einem Glasobjektträger ausplattiert und anschließend fixiert. Zur Detektion der *focal adhesion sites* wurde ein Antikörper gegen pTyrosin (A und C) verwendet, das Zytoskelett wurde mit FITC-Phalloidin (B) visualisiert und der Zellkern mit DAPI angefärbt (D). Die Detailansicht der Zellen (C und F) zeigt deutlich, dass die Herunterregulierung der LPXN-Expression in den DU 145-Zellen in einem Verlust der *focal adhesion sites* resultiert. Bei den Luciferase-transfizierten Zellen hingegen konnten große, definierte *focal adhesion sites* detektiert werden. Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop mit einer 600fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.5.1.3 „Blebbing“ der Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression

Beim näheren Betrachten der Morphologie der LPXN- und Luciferase-transfizierten PCa-Zellen fällt auf, dass die Zelle nach Herunterregulierung der LPXN-Expression und einer Adhäsionszeit von 2 h unregelmäßige Ausbuchtungen der Plasmamembran formt. Dieses als „blebbing“ bezeichnete Phänomen ist bei den Kontrollzellen nicht zu erkennen (Abb. 3.43).

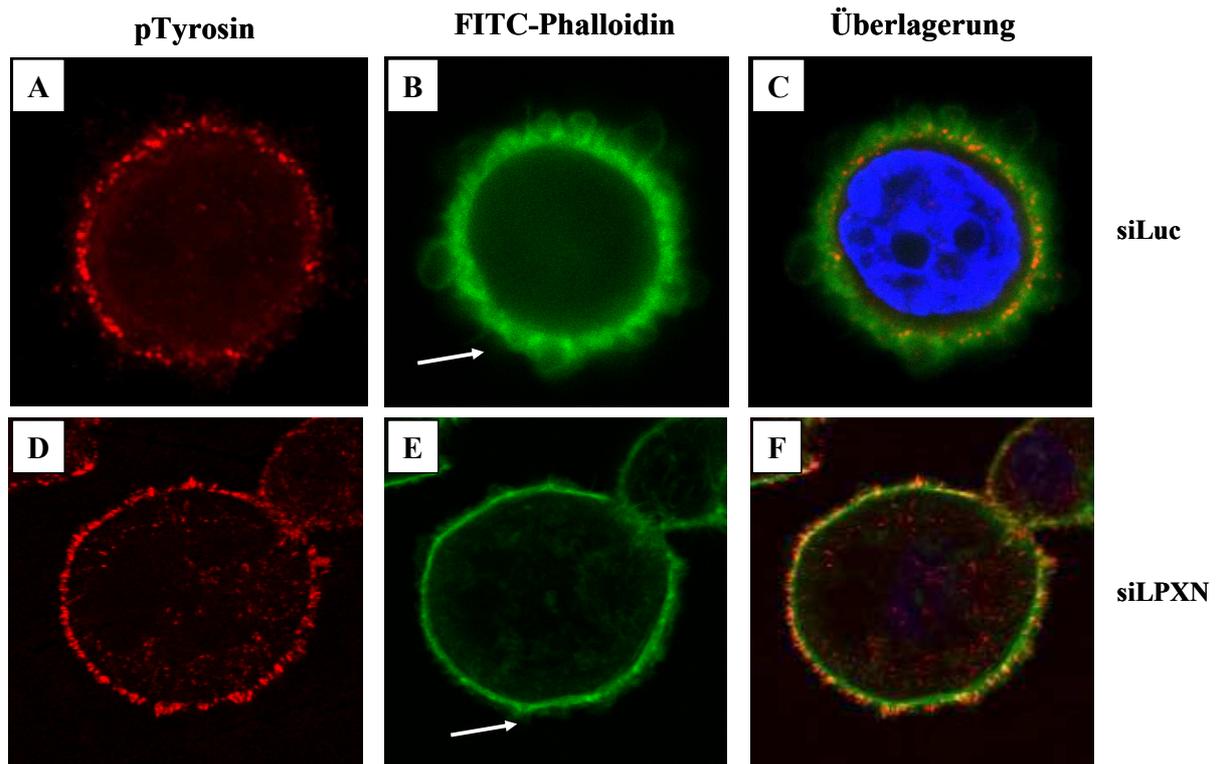


Abb. 3.43: Morphologie von PC-3-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression. LPXN siRNA-transfizierte und Luc siRNA-transfizierte PC-3-PCa-Zellen wurden für 2 h auf Glasobjektträgern ausplattiert, fixiert und anschließend mit einem phospho-Tyrosin-Antikörper behandelt (A und D). Das Zytoskelett wurde mit FITC-Phalloidin visualisiert (B und E) und der Kern mit DAPI angefärbt. Die Plasmamembran der LPXN siRNA-transfizierten Zellen (siLPXN) zeigt im Vergleich zu den Luc siRNA-transfizierten Zellen (siLuc) deutliche Ausbuchtungen der Plasmamembran (Pfeil B und E). Alle Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop bei 600facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend weiter vergrößert.

3.5.2 Analyse der Zelladhäsion und -organisation bei LPXN-Überexpression *ex vivo*

3.5.2.1 Erhöhte Zelladhäsion nach Überexpression von LPXN *ex vivo*

Da die Adhäsionseigenschaften der PCa-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression stark abnehmen, wurde in einem weiteren Versuch analysiert, ob die *in vitro*-Ergebnisse auch am Beispiel des Mausmodells bestätigt werden können. Dafür wurde ein Adhäsionsassay mit den aus den LPXN/TRAMP-Prostatatumoren isolierten Primärzellen

(Zellklon 83A) und als Kontrolle mit den aus den TRAMP-Prostatatumoren isolierten Primärzellen (Zellklon 27F) durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils auf Fibronectin-beschichteten und unbeschichteten Glasobjektträgern für 2 h ausplattiert und anschließend fixiert. Durch Färbung FITC-gekoppelten Phalloidin wurden die Zellen visualisiert. Die Überexpression von LPXN in den Primärzellen 83A L⁻/T⁻ bewirkt im Vergleich zu den Primärzellen 27F T⁻ eine verstärkte Zelladhäsion, welche sich in einer erhöhten Zellzahl und einer vergrößerten Zelloberfläche äußert (Abb. 3.44).

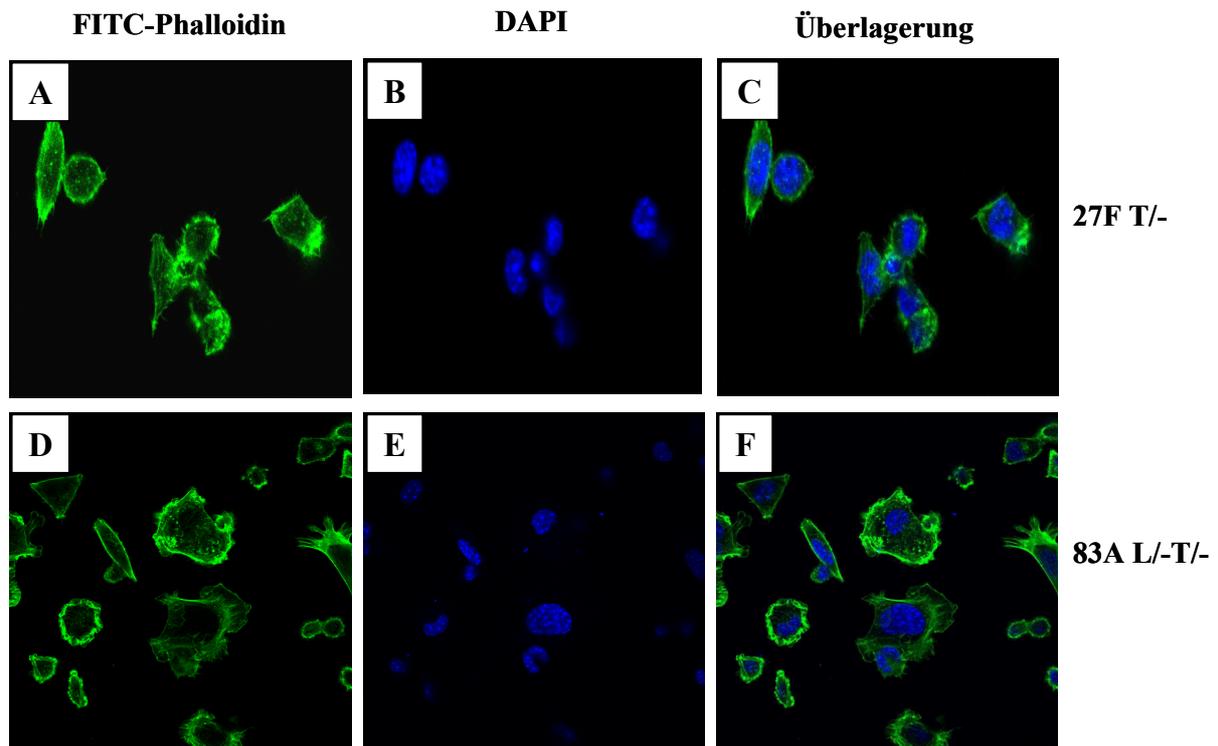


Abb. 3.44 Immunzytochemie zur Analyse der adhäsiven Eigenschaften von LPXN-überexprimierenden Primärzellen. Die Primärzellklone 27F (T⁻) und 83A (L⁻/T⁻) wurden für 2 h auf Fibronectin-beschichteten Glasobjektträgern ausplattiert. Nach der Fixierung wurde das Zytoskelett mit FITC-Phalloidin visualisiert und die Kerne mit DAPI gefärbt.

3.5.2.2 Verstärkte Bildung von *focal adhesion sites* nach LPXN-Überexpression

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die PCa-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression ihre Adhäsionsfähigkeit zur ECM verlieren und dass es zu einer verringerten Bildung der *focal adhesion sites* kommt. Um die Stärke der *focal adhesion sites* bei Überexpression von LPXN zu untersuchen, wurden die aus den doppelt (L/-T/-) und einfach (L/-) transgenen Mäusen isolierten Primärzellen verwendet. Diese wurden für 4 h auf Fibonektin-beschichteten Glasobjektträger ausplattiert, fixiert und anschließend immunhistochemisch analysiert. Mit einem phospho-Tyrosin Antikörper wurden die *focal adhesion sites* visualisiert. Die Abbildung 3.45 lässt deutlich erkennen, dass die LPXN-überexprimierenden Primärzellen 83A starke und ausgeprägte *focal adhesion sites* aufweisen, während in den Primärzellen 27F, welche aus den einfach transgenen Mäusen hervorgingen, kleinere und nicht sehr definierte *focal adhesion sites* detektiert werden konnten.

Sowohl nach Herunterregulierung der LPXN-Expression in den PCa-Zellen DU 145 als auch nach Überexpression von LPXN in den Primärzellen 83A korreliert die Stärke der *focal adhesion sites* direkt mit der LPXN-Expression.

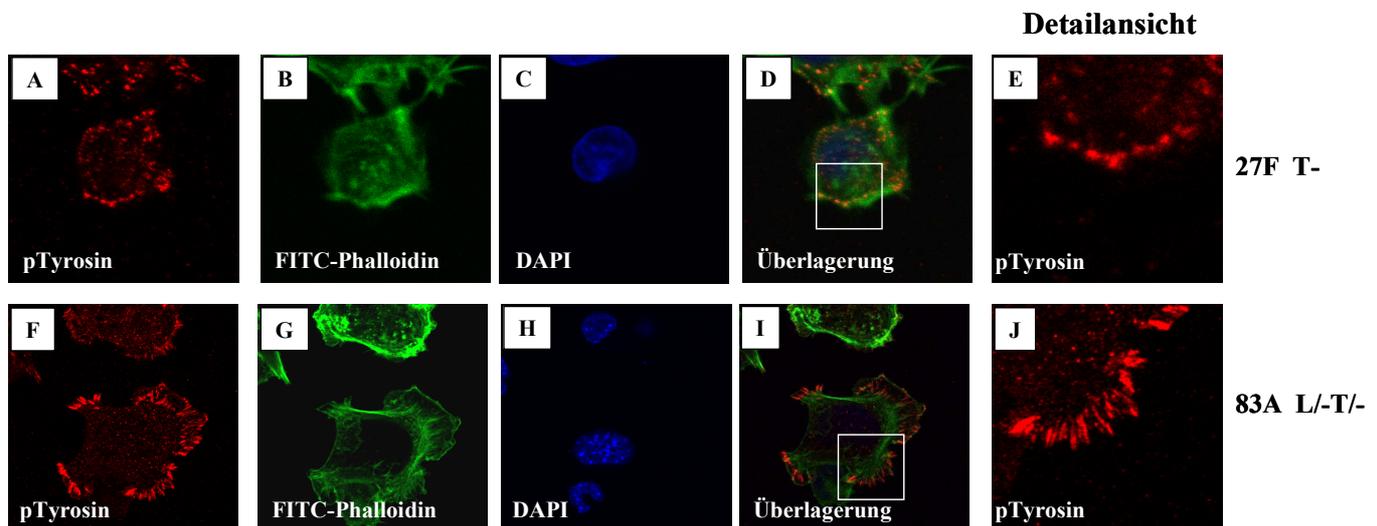


Abb. 3.45: Immunzytochemie zur Analyse der *focal adhesion sites* nach LPXN-Überexpression in Primärzellen aus Prostatatumoren. Die Primärzellklone 27F (einfach transgen T/-) und 83A (doppelt transgen L/-T/-) wurden für 4 h auf einem Fibronektin-beschichteten Glasobjektträger inkubiert und anschließend fixiert. Zur Detektion der *focal adhesion sites* wurde ein Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (pTyrosin) verwendet (A und F), das Zytoskelett wurde mit FITC-Phalloidin visualisiert (B und G) und der Zellkern mit

DAPI angefärbt (C und H). Die Detailansicht (E und J) verdeutlicht, dass nach Überexpression von LPXN (83A L/-) stärkere und definiere *focal adhesion sites* detektiert werden konnten im Vergleich zu den Kontrollzellen (27F T/-). Für sämtliche Aufnahmen wurde ein konfokales *Laserscanning*-Mikroskop verwendet. Die Bilder wurden in 600facher Vergrößerung aufgenommen, die Detailansichten wurden anschließend weiter vergrößert.

3.5.3 GST-Pulldown zur Analyse der Aktivität der Rho-GTPasen RhoA und Rac

Die Familie der Rho-GTPasen sind essentielle Regulatoren bei der Organisation des Zytoskeletts und damit bei der Zelladhäsion und -migration [Ridley *et al.*, 2003; Jaffe und Hall, 2005]. Die Rho-GTPase RhoA z.B. ist für die Ausbildung von *focal adhesion sites* und für die Kontraktion von Stressfasern verantwortlich. Rac hingegen ist an der Formation von Lamellipodien beteiligt, die Aktinfortsätze am mobilen Teil der Zelle darstellen [Ridley und Hall, 1992; Ridley *et al.*, 1992; Nobes und Hall, 1995].

Um zu überprüfen, ob durch die Herunterregulierung der LPXN-Expression eine Deregulation der Aktivierung/Deaktivierung der Rho-GTPasen RhoA und Rac bei der Zelladhäsion stattfindet, wurde die Aktivität der beiden GTPasen mittels eines *GST-Pulldowns* ermittelt. Die verwendeten Effektoren TRBD (*Rhotekin-binding domain*) und RBD (*Rac-binding domain*) können nur von RhoA bzw. Rac gebunden werden, wenn diese aktiviert sind (Material und Methoden 2.27.3).

3.5.3.1 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Die GST-Fusionsproteine GST-TRBD, GST-RBD und GST wurden in *E.coli* überexprimiert und anschließend wurde Gesamt-Protein isoliert. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mit Gluthation-Sepharose, an die nur die GST-Fusionsproteine binden können. Die Durchflüsse, die Waschschrte und die Eluate der Proteinaufreinigung wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt (Abb. 3.46) (Material und Methoden 2.15.6.). Wie zu erkennen ist, konnten die GST-Fusionsproteine aus dem Gesamt-Protein isoliert werden.

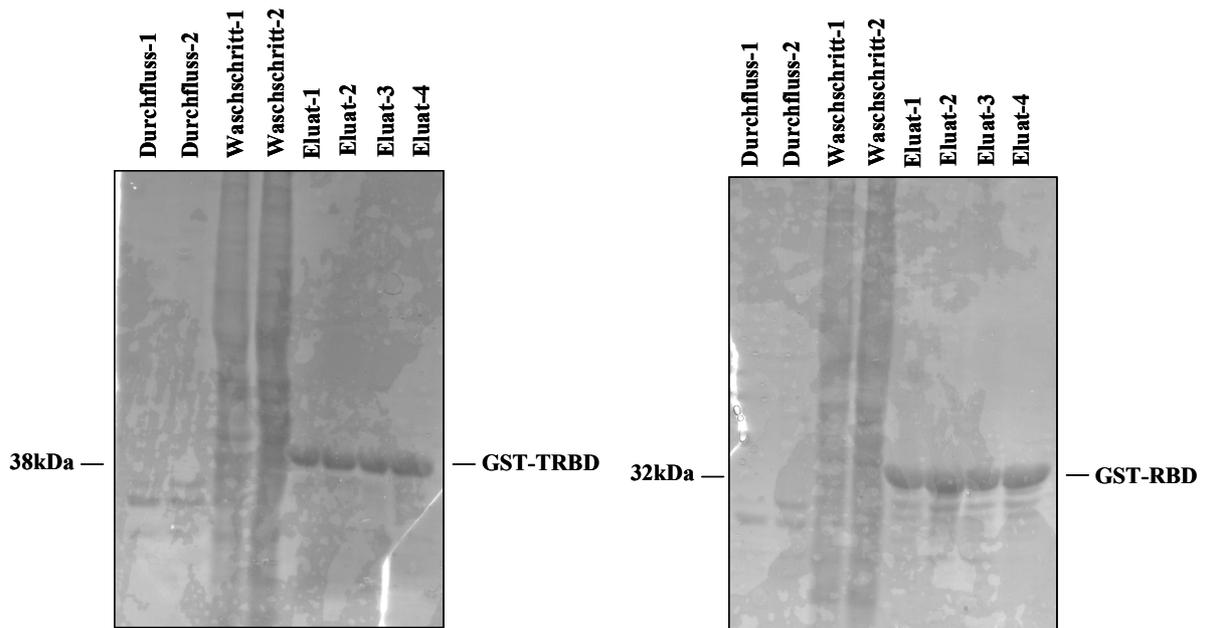


Abb. 3.46: Coomassie-Färbung eines SDS-Gels zur Überprüfung der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen. Die GST-Fusionsproteine GST-TRBD (38 kDa) und GST-RBD (32 kDa) wurden in *E.coli* überexprimiert und anschließend mit Gluthation-Sepharose aufgereinigt. Die Durchflüsse 1/2, die Waschschrifte1/2 und die Eluate1-4 der GST-TRBD und GST-RBD-Aufreinigung wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt.

3.5.3.2 GST-Pulldown mit den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen

PC-3-Zellen wurden mit LPXN- und als Kontrolle mit Luciferase-siRNA transfiziert und nach 72 h Gesamt-Protein isoliert. Dieses wurde mit den zuvor aufgereinigten und konzentrierten GST-Proteinen (GST-TRBD, GST-RBD, GST) inkubiert und über Gluthation-Sepharose aufgereinigt. Durch eine anschließende Western Blot-Analyse mit einem RhoA- bzw. Rac-spezifischen Antikörper konnte die Menge an aktivem RhoA bzw. Rac in den LPXN- und Luciferase-siRNA-transfizierten Zellen ermittelt werden. Wie in Abbildung 3.46 zu erkennen ist, konnte in den Kontrollzellen (siLuc) im Vergleich zu den Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression (siLPXN) vermehrt aktives RhoA nachgewiesen werden (Abb. 3.47 A). Im Gegensatz dazu konnte in den Kontrollzellen (siLuc) im Vergleich zu den Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression (siLPXN) weniger aktives Rac detektiert werden (Abb. 3.47 B). Als Positivkontrolle diente Protein von PC-3-Zellen, welches vor der Durchführung des GST-Pulldowns mit GTP aktiviert wurde (positiv) (Material und

Methoden, 2.27.4). Als Negativkontrolle wurde das Gesamt-Protein nur mit GST-Protein inkubiert, welches nicht an ein Effektorprotein gebunden war (negativ).

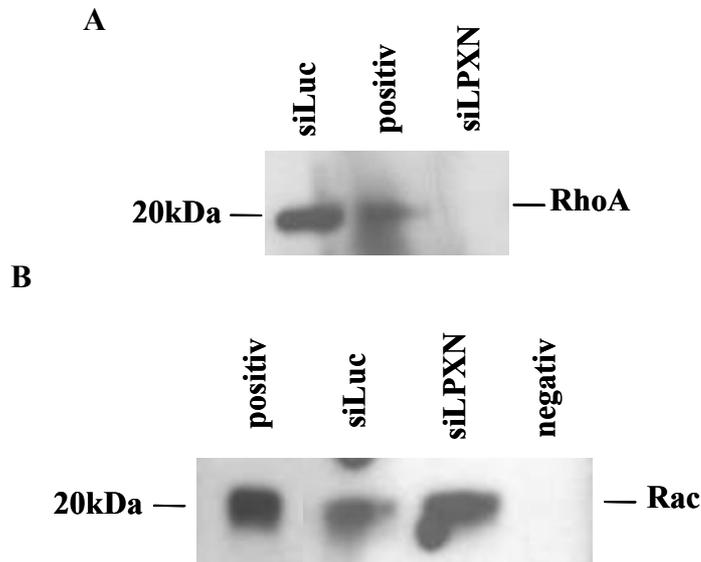


Abb. 3.47: GST-Pull-down zur Analyse des aktiven RhoA und Rac in PC-3-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression. Von PC-3-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression und von Kontrollzellen wurde nach vierstündiger Adhäsion Gesamt-Protein isoliert. Anschließend wurde mit dem Protein und dem RhoA-Effektorprotein TRBD bzw. mit dem Rac-Effektorprotein RBD ein GST-Pull-down durchgeführt. A. Die anschließende Western Blot-Analyse mit einem RhoA-spezifischen Antikörper zeigt eine verstärkte Aktivierung von RhoA in den Kontrollzellen (TRBD siLuc) im Vergleich zu den Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression (TRBD siLPXN). B. Eine Western Blot-Analyse mit einem Rac-spezifischen Antikörper demonstriert hingegen eine verstärkte Aktivierung von Rac in Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression (RBD siLPXN) im Vergleich zu den Kontrollzellen (TRBD siLuc).

4. Hypothese: LPXN ist in Signalwege integriert, welche die Zellprogression beeinflussen

3.6 Analysen zum Einfluss von LPXN auf die Phosphorylierung und Expression weiterer Gene

Es konnte bereits gezeigt werden, dass LPXN an der Migration, Invasion und Adhäsion von PCa-Zellen beteiligt ist. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass LPXN als Adapterprotein die Zelleigenschaften zwar vermittelt, aber diese nicht alleine ausführen kann. Daher stellt sich die Frage, welche Gene bzw. Proteine durch LPXN aktiviert oder deaktiviert werden, damit die zu beobachteten Effekte eintreten.

3.6.1 Durchführung eines Antikörper-Arrays

Zur Identifizierung von LPXN-vermittelten Signalwegen wurde von der Firma Kinexus ein Antikörper-Array durchgeführt. Dafür wurde zunächst die Expression von LPXN in der PCa-Zelllinie PC-3 mittels spezifischer siRNA (siLPXN) für 72 h herunterreguliert. Als Kontrolle wurde eine siRNA gegen Luciferase (siLuc) verwendet. Anschließend wurde Gesamt-Protein isoliert und die erfolgreiche Herunterregulierung der LPXN-Expression mittels Western Blot-Analyse überprüft (Abb. 3.48). Die Proteine von drei verschiedenen Transfektionen wurden überprüft, gepoolt und an die Firma Kinexus verschickt. Dort erfolgte die fluoreszierende Markierung des Gesamt-Proteins und anschließender Hybridisierung mit der Array-Membran (Material und Methoden 2.26).

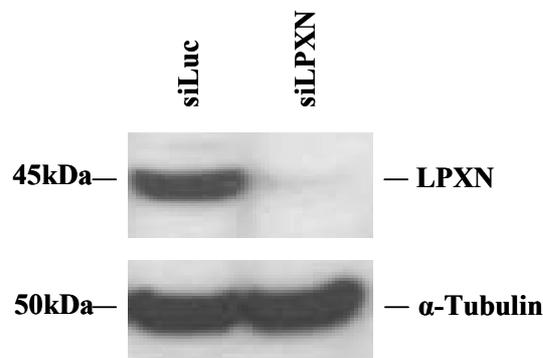


Abb. 3.48: Westen Blot-Analyse zur Überprüfung der LPXN-Expression nach Transfektion der Zellen mit spezifischer siRNA. Die Expression von LPXN in PC-3 PCa-Zellen wurde in drei verschiedenen Ansätzen für 72 h herunterreguliert. Anschließend wurde jede Transfektion mittels Westen Blot-Analyse auf eine herunterregulierte LPXN-Expression hin überprüft und dann gepoolt. Mit einem LPXN-spezifischen Antikörper konnte eine LPXN-Bande bei 45 kDa nur in den Luciferase-transfizierten Kontrollzellen detektiert werden. Ein Antikörper gegen α -Tubulin wurde für die Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge eingesetzt.

Nach der Auswertung der Ergebnisse konnten 18 Proteine identifiziert werden, welche mindestens um den Faktor 1,5 hoch- bzw. herunterreguliert wurden. Bei zehn Proteinen änderte sich die Expressionsstärke (Tab. 3.2) und bei acht Proteinen der Phosphorylierungsstatus (Tab. 3.3) nach Herunterregulierung der LPXN-Expression.

Tab 3.2: Ergebnisse des Antikörper-Arrays für PC-3 PCa-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression (siLPXN vs. siLuc). Aufgeführt sind ausschließlich die Proteine, bei denen eine Veränderung in der Expressionsstärke erfolgte.

Symbol	Phosphorylierungs-Stelle	Protein (kompletter Name)	fold change siLPXN/siLuc
KDEL receptor 1	Pan-spezifisch	ER lumen protein retaining receptor 1	2,39
Cyclin D1	Pan-spezifisch	Cyclin D1 (PRAD1)	2,16
Hsp90	Pan-spezifisch	Heat shock 90 kDa protein alpha/beta	2,12
Hsp90	Pan-spezifisch	Heat shock 90 kDa protein alpha/beta	2,10
PKCb1	Pan-spezifisch	Protein-serine kinase C beta 1	2,04
p21 CDKI1	Pan-spezifisch	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (MDA6)	0,55
CDK1 (CDC2)	Pan-spezifisch	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1	0,53
PKBb (Akt2)	Pan-spezifisch	Protein-serine kinase B beta	0,51
Yes	Pan-spezifisch	Yamaguchi sarcoma proto-oncogene-encoded tyrosine kinase	0,49
TAK1	Pan-spezifisch	TGF-beta-activated protein-serine kinase 1	0,47
GSK3a	Pan-spezifisch	Glycogen synthase-serine kinase 3 alpha	0,30

Tab. 3.3. Ergebnisse des Antikörper-Arrays für PC-3 PCa-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN-Expression (siLPXN vs. siLuc). Aufgeführt sind ausschließlich die Proteine, bei denen eine Veränderung im Phosphorylierungsstatus erfolgte.

Symbol	Phosphorylierungs-Stelle	Protein (kompletter Name)	<i>fold change</i> siLPXN/siLuc
HSP27	S82	Heat shock 27 kDa protein beta 1 (HspB1)	3,32
CaMK2a	T286	Calcium/calmodulin-dependent protein-serine kinase 2 alpha	2,41
EGFR	Y1197	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	1,86
4E-BP1	T45	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (PHAS1)	1,82
EGFR	T678	Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase	1,76
CDK1/2	Y15	Cyclin-dependent protein-serine kinase 1/2	1,75
PKCd	S645	Protein-serine kinase C delta	1,73
GRK2 (BARK1)	S670	G protein-coupled receptor-serine kinase 2	0,55

3.6.2 Überprüfung der Daten des Antikörper-Arrays

Zur Überprüfung der deregulierten Expression der gelb-markierten Proteine nach Herunterregulierung der LPXN-Expression wurde eine quantitative *real time* PCR-Analyse durchgeführt. Dafür wurden PC-3 Pka-Zellen zunächst mit LPXN-spezifischer und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 72 h wurde Gesamt-RNA isoliert und diese mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die Gene GSK3 α , KDELR1 und CDC2 konnte keine Bestätigung der Daten des Antikörper-Arrays auf RNA-Ebene erzielt werden. Für die Kinasen TAK1 und Yes hingegen ist auch in der quantitativen *real time* PCR-Analyse eine deutliche Herunterregulierung der Expression nach LPXN *knockdown* in den PC-3-Zellen nach 48 h und 72 h zu verzeichnen (Abb. 3.49).

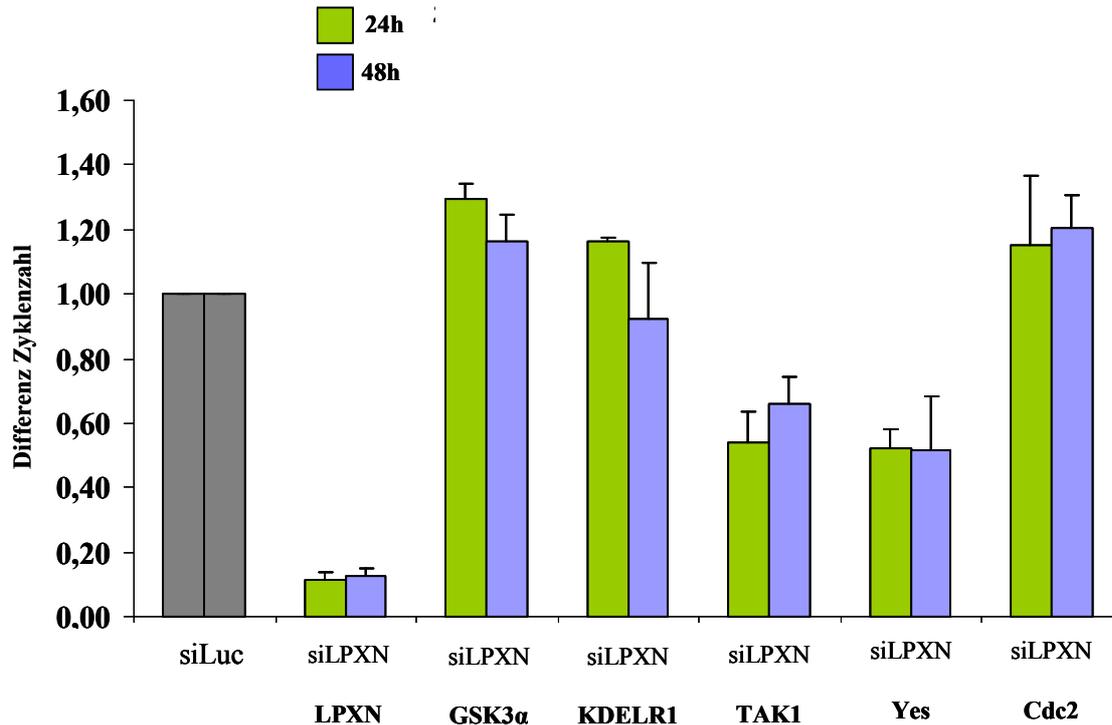


Abb. 3.49: Ergebnisse der quantitativen *real time* PCR-Analyse zur Überprüfung der Antikörper-Array Daten. PC-3-PCa-Zellen wurden für 48 h bzw. 72 h mit LPXN-spezifischer (siLPXN) und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer (siLuc) siRNA transfiziert. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Expression der in der Tabelle 1 gelb hinterlegten Gene wurde mittels quantitativer *real time* PCR-Analyse mit spezifischen Primern überprüft. Zur Normalisierung der Werte wurde der Mittelwert der *housekeeping* Gene TBP und PBGD verwendet. Dargestellt ist die Genexpression in den LPXN-siRNA transfizierten Zellen jeweils in Relation zur Expression in den Luciferase-siRNA transfizierten Zellen, welche hier gleich 1 gesetzt wurde (siLuc). Dabei ist der Wert der Mittelwert von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Für TAK1 und Yes konnte die im Array ermittelte verminderte Expression in den Zellen mit LPXN *knockdown* bestätigt werden, wohingegen GSK3 α , KDELR1 und CDC2 keine veränderte Expression auf RNA-Ebene zeigen.

TAK1 gehört zur Familie der Serin/Threonin-MAPK-Proteinkinasen und wird durch TGF β aktiviert. Der TGF β -Rezeptor ist an vielen intrazellulären Signalwegen wie z.B. Proliferation und Differenzierung aber auch Zellmigration und Invasion beteiligt (Jennings und Pietenpol, 1998).

Um zunächst die herunterregulierte TAK1-Expression nach LPXN *knockdown* auf Proteinebene zu bestätigen, wurde ein Antikörper gegen TAK1 erworben. Wie in Abbildung 3.50 zu erkennen, konnte der Expressionsverlust von TAK1 mittels Western Blot bestätigt werden.

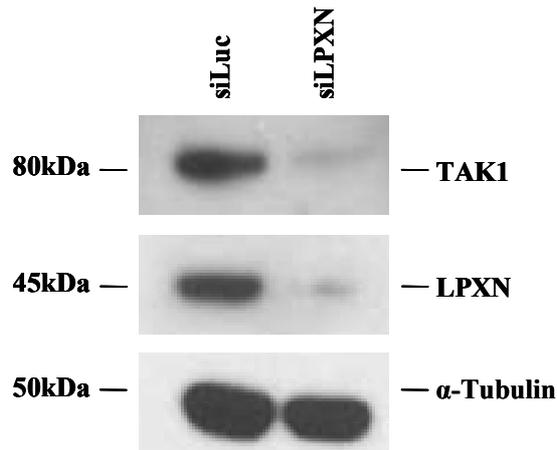


Abb. 3.50: Western Blot-Analyse zum Expressionsverlust von TAK1 nach Herunterregulierung der LPXN-Expression. PC-3-PCa-Zellen wurden mit LPXN-spezifischer siRNA und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 72 h wurde Gesamt-Protein isoliert und 50 µg für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Zur Detektion von TAK1 wurde ein TAK1-Antikörper verwendet, der bei 80 kDa eine spezifische Bande detektiert. Die Herunterregulierung der LPXN-Expression wurde mit einem LPXN-spezifischen Antikörper überprüft. Die aufgetragene Proteinmenge wurde mit einem α -Tubulin-Antikörper nachgewiesen. Die Western Blot-Analyse wurde mit Proteinen aus verschiedenen Transfektionen dreimal wiederholt.

3.6.3 Analyse der TAK1-vermittelten Signalwege

Aus der Literatur ist bekannt, dass TAK1 die MAPK JNK und p38 phosphoryliert und damit aktiviert. Durch diese Phosphorylierung kann der Transkriptionsfaktor ATF-2 transaktiviert werden, welcher wiederum Zielgene aktiviert, die in Zellmigration und Tumorigenese involviert sind [Gupta *et al.*, 1995; Livingston *et al.*, 1997; van Dam *et al.*, 1997]. Zwei dieser Zielgene sind Maspin und Presenilin. Für Maspin konnte bereits gezeigt werden, dass es die Zellinvasion und Motilität von PCa-Zellen inhibiert [Sheng *et al.*, 1996].

Um zu untersuchen, ob LPXN diesen Signalweg via TAK1 beeinflusst, wurde zunächst der Phosphorylierungsstatus von JNK, MKK3/6 und p38 in Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression und als Kontrolle mit herunterregulierter Luciferase-Expression auf Proteinebene überprüft. Die Western Blot-Analysen, welche mit Antikörpern gegen JNK, MKK3/6 und p38 durchgeführt wurden, die nur jeweils die phosphorylierte Form erkennen, bestätigt, dass nur der Phosphorylierungsgrad von JNK nach Herunterregulierung der LPXN-Expression (siLPXN) abnimmt (Abb. 3.51). Bei MKK3/6 und p38 ist im Phosphorylierungsstatus nach

Herunterregulierung der LPXN-Expression kein Unterschied zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass dieser Arm des TAK1-Signalweges nicht durch LPXN reguliert wird.

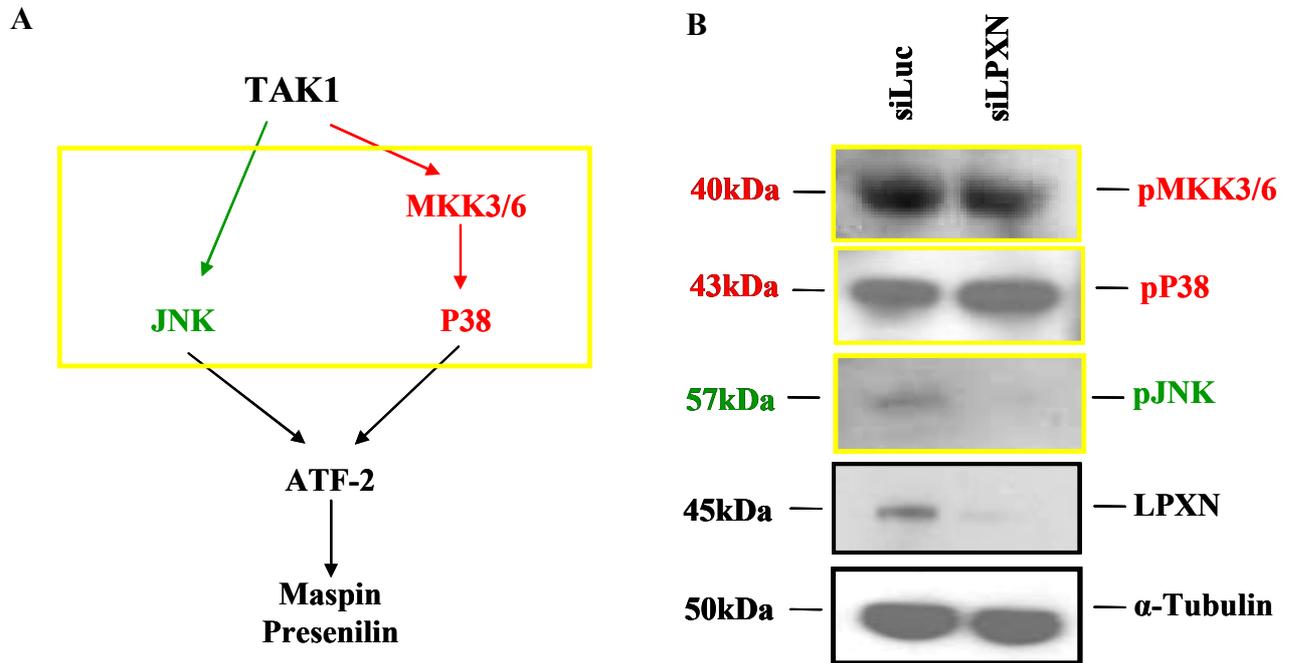


Abb. 3.51: Western Blot-Analyse zur Phosphorylierung von MKK3/6, p38 und JNK in PC-3-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression. A. TAK1 phosphoryliert und aktiviert die Proteine MAPK MKK3/6, p38 und JNK. JNK und p38 können im phosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor ATF-2 aktivieren, wodurch die Zielgene Maspin und Presenilin angeschaltet werden. B. Zur Überprüfung, ob LPXN den TAK-Signalweg beeinflusst, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. PC-3-Zellen wurden mit LPXN-siRNA (siLPXN) und als Kontrolle mit Luciferase-siRNA (siLuc) transfiziert. Die Western Blot-Analyse wurde mit 50 µg Gesamt-Protein und MKK3/6, p38 und JNK-spezifischen Antikörpern durchgeführt, welche jeweils ausschließlich die phosphorylierte Form erkennen. Zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen α -Tubulin verwendet.

Um den weiteren TAK1-JNK-ATF2-Maspin/Presenilin Signalweg zu verfolgen, wurde erneut die Expression von LPXN in PC-3 PCa-Zellen herunterreguliert (siLPXN). Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und eine quantitative *real time* PCR-Analyse mit Maspin- und Presenilin-spezifischen Primern durchgeführt (Material und Methoden 2.13.3). Als Kontrolle wurden die PC-3-Zellen mit siRNA gegen Luciferase herunterreguliert (siLuc). Wie in Abbildung 3.51 zu erkennen ist, nimmt die relative Expression von Maspin (siLPXN Maspin) und Presenilin (siLPXN Presenilin) nach LPXN *knockdown* im Vergleich zu den

Kontrollzellen um 40% bzw. 30% ab. Die Versuche wurden jeweils als Triplet durchgeföhrt und der Mittelwert einschließlic Standardabweichung in der Abbildung 3.52 dargestellt.

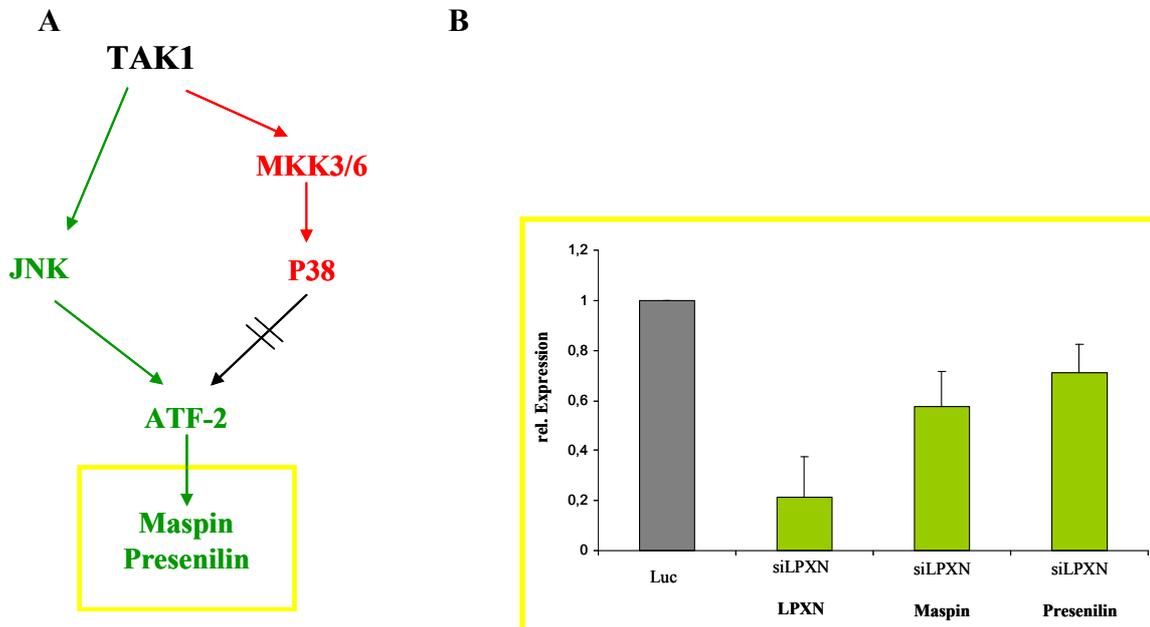


Abb. 3.52: Quantitative *real time* PCR-Analyse zur Expression der ATF-2 Zielgene Maspin und Presenilin nach Herunterregulierung der LPXN-Expression. A. Dargestellt ist der TAK1-vermittelter Signalweg, welcher durch LPXN reguliert wird. B. Die Expression von LPXN und als Kontrolle von Luciferase wurde in PC-3 PCa-Zellen herunterreguliert, nach 72 h Gesamt-RNA isoliert und diese mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die quantitative *real time* PCR-Analyse wurden Primer verwendet, die spezifisch die ATF-2 Zielgene Maspin und Presenilin sowie LPXN amplifizieren. Zur Normalisierung der Werte wurde der Mittelwert der *housekeeping* Gene TBP und PBGD verwendet. Dargestellt ist die Genexpression (LPXN, Maspin und Presenilin) in den LPXN-transfizierten Zellen jeweils in Relation zur Expression in den Luciferase-transfizierten Zellen, welche hier gleich 1 gesetzt wurden (siLuc). Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten von drei verschiedenen Transfektionen, welche jeweils zweimal in der quantitativen *real time* PCR getestet wurden.

Ob eine Expressionsänderung des ATF-2-Zielgens Presenilin auch nach Überexpression von LPXN zu beobachten ist, wurde in den Primärzellen 83A (L/-T/-) und 27F (T/-) untersucht. Dafür wurde von den LPXN-überexprimierenden Primärzellen 83A (L/-T/-) und als Kontrolle von 27F (T/-) RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Anschließend wurde eine quantitative *real time* PCR-Analyse mit Presenilin-spezifischen Primern für murines Presenilin durchgeföhrt. In den Primärzellen 83A (L/-T/-) kann durch die Überexpression von LPXN eine deutliche Expressionszunahme von Presenilin im Vergleich zu den Kontrollzellen 27F

(T/-) beobachtet werden. Die in Abbildung 3.53 angegebene relative Expression ergibt sich aus dem Mittelwert der Analyse von drei verschiedenen Experimenten.

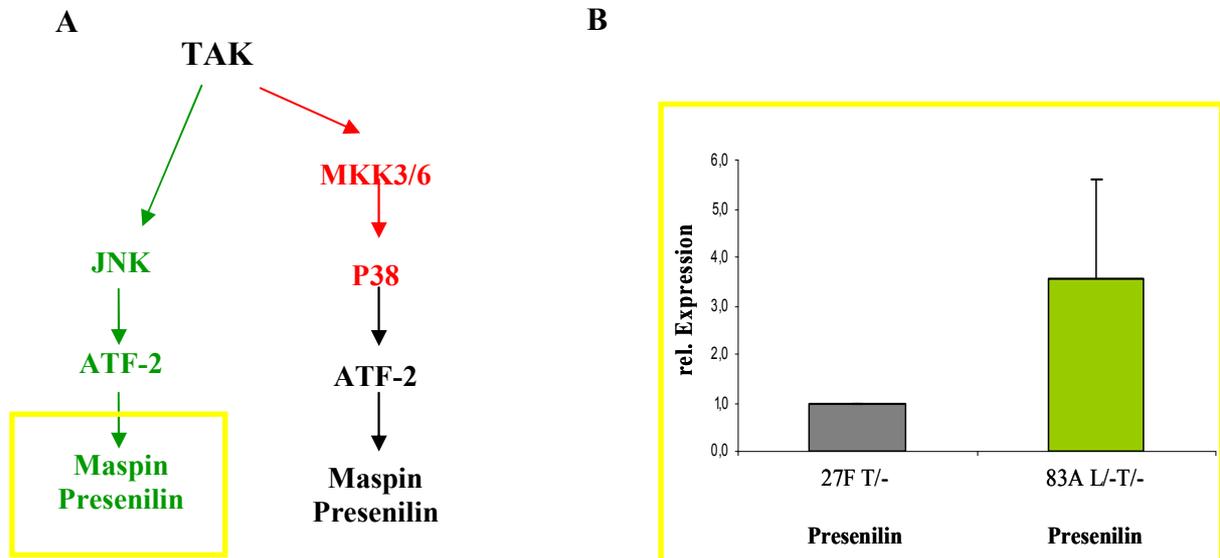


Abb. 3.53: Quantitative *real time* PCR zur Expression des ATF-2 Zielgens Presenilin in LPXN-überexprimierenden Primärzellen. A. TAK1-vermittelter Signalweg, welcher durch LPXN reguliert wird. B. Von den Primärzellen 83A (L-/T/-) und 27F (T/-) wurde Gesamt-RNA isoliert und diese mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die quantitative *real time* PCR-Analyse mit spezifischen Primern gegen murines Presenilin demonstriert eine verstärkte Expression von Presenilin in den LPXN-überexprimierenden Primärzellen 83A (L-/T/-) im Vergleich zu den Kontrollzellen 27F (T/-). Die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Expression von Presenilin in den LPXN-überexprimierenden Zellen 83A wurde zu derjenigen der Kontrollzellen (Bezugswert gleich 1) ins Verhältnis gesetzt.

3.6.4 Analyse der SRC-vermittelten Signalwege

Eine weitere Gruppe möglicher Kandidatenproteine, auf deren Aktivität LPXN Einfluss nehmen könnte, stellt die Familie der SRC-Kinasen dar. Es konnte bereits beschrieben werden, dass LPXN mit der SRC-Kinase c-SRC in Osteoklasten einen Komplex formt [Sahu *et al.*, 2007].

Zur Überprüfung, ob LPXN die Phosphorylierung der Mitglieder der SRC-Familie beeinflussen kann, wurden PC-3 PCa-Zellen mit LPXN-spezifischer siRNA und als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA transfiziert. Anschließend wurde den Zellen für 24 h das

Serum entzogen und durch erneute Serungabe für 4 h das Wachstum angeregt, bevor Gesamt-Protein isoliert wurde. Die Analyse des Aktivitätsstatus der Mitglieder der SRC-Familie erfolgte mit Hilfe eines Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpers gegen Serin 416. Wie in Abbildung 3.54 zu erkennen ist, konnte nach Herunterregulierung der LPXN-Expression (siLPXN) im Vergleich zu den Kontrollen ein deutlicher Verlust im Phosphorylierungsstatus der Mitglieder der SRC-Familie nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Antikörper verwendet, der sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form der Mitglieder der SRC-Familie detektiert.

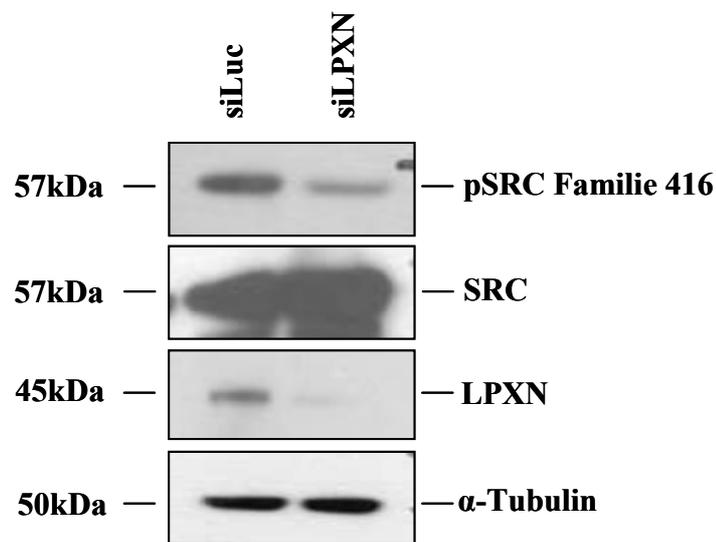


Abb. 3.54: Western Blot-Analyse zum Phosphorylierungsstatus der Mitglieder der SRC-Familie in Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression. PC-3 PCa-Zellen wurden mit LPXN-spezifischer siRNA (siLPXN) bzw. als Kontrolle mit Luciferase-spezifischer siRNA (siLuc) transfiziert. Nach 72 h wurde Gesamt-Protein isoliert und 50 µg für die Western Blot-Analyse eingesetzt. Zunächst wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch bei einer Größe von 57 kDa die phosphorylierte Form der SRC-Kinasen an der Phosphorylierungsstelle Serin 416 erkennt. Zur Darstellung der Gesamt- SRC-Proteinmenge wurde ein Antikörper gegen die phosphorylierte sowie die unphosphorylierte Form von SRC verwendet. Ein Antikörper gegen LPXN bestätigt den *knockdown* der LPXN-Expression in den LPXN-siRNA-transfizierten Zellen. Ein Antikörper gegen α-Tubulin diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte das *focal adhesion*-Protein Leupaxin (LPXN) als ein in die Progression von Prostatakarzinomen (PCa) involviertes Protein charakterisiert werden. *In vivo*-Studien an doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen bestätigen, dass LPXN das Wachstum von bestehenden TRAMP-Tumoren sowie von Fernmetastasen stark beschleunigt, wobei der Initiationszeitpunkt der Tumorbildung durch die Überexpression von LPXN nicht beeinflusst wird. Eine durch LPXN vermittelte verstärkte Tumorprogression konnte ebenfalls in LPXN/TRAMP-Mäusen beobachtet werden, welche zuvor durch eine Kastration einem Androgenentzug unterzogen wurden. Die mittlere Überlebensdauer der kastrierten LPXN/TRAMP-Mäuse lag bei 18,7 Wochen, während die Kontrollmäuse ein durchschnittliches Alter von 20,6 Wochen erreichten. Nach Etablierung von jeweils zwei Primärzelllinien aus den PCa der LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäuse konnte gezeigt werden, dass sowohl die Migrations- als auch die Invasionsfähigkeit der LPXN/TRAMP-Zellen durch die Überexpression von LPXN im Vergleich zu den Kontrollprimärzellen drei- bzw. zweifach erhöht ist.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Studien führten zu der Frage, wie LPXN die Progression von PCa beeinflussen kann. In vorangegangenen Arbeiten wurde beschrieben, dass eine verminderte LPXN-Expression die Expression von p120CTN erhöht [Kaulfuß, 2006]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch nach Überexpression von LPXN mittels TAT-Transduktion eine negative Korrelation der Expression von p120CTN und LPXN in den PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145 zu erkennen ist. Expressionsanalysen mittels Western Blot an Tumormaterial aus den LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäusen sowie an den isolierten murinen PCa-Primärzellen bestätigten ebenfalls die Abhängigkeit zwischen der p120CTN- und der LPXN-Expression. Um den Einfluss von LPXN und p120CTN auf das Migrations- und Invasionsverhalten von PCa-Zellen zu untersuchen, wurde die Expression beider Gene in PC-3- und DU 145-Zellen mittels siRNA herunterreguliert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von p120CTN in einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen resultiert. Die verminderte Expression von LPXN reduziert hingegen die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen [Kaulfuß *et al.*, 2008]. Die simultane Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN-Expression resultierte in einer

Aufhebung der Einzel-Effekte. Weiterhin veränderte sich durch die Herunterregulierung der p120CTN- und LPXN-Expression die subzelluläre Lokalisation des p120CTN-Interaktionspartners β -Catenin. β -Catenin ist nach dem *knockdown* von p120CTN im Kern, nach dem *knockdown* von LPXN an der Membran und nach dem *knockdown* von p120CTN und LPXN sowohl im Kern als auch an der Membran von PC-3-Zellen lokalisiert. Eine Expressionsanalyse des β -Catenin Zielgens MMP-7 in PCa-Zellen mittels quantitativer *real time*-PCR konnte zeigen, dass ein *knockdown* von p120CTN in einer erhöhten Expression von MMP-7 und ein *knockdown* von LPXN in einer verminderten Expression von MMP-7 resultiert.

Mit Hilfe eines *whole genome* Microarrays an Prostatatumormaterial von LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäusen sollten Gene identifiziert werden, die durch die Expression von LPXN während der Tumorprogression dereguliert werden. Dabei konnte eine um den Faktor 0,84 herunterregulierte Expression der Cystathionine-beta-Synthase (Cbs) und eine um den Faktor 1,65 hochregulierte Expression von HOP homeobox (Hopx) im Tumormaterial der LPXN/TRAMP-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen beobachtet werden. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls mittels quantitativer *real time*-PCR bestätigt werden.

In vorangegangenen Studien wurde Caldesmon als Interaktionspartner von LPXN identifiziert [Beckemeyer, 2007] und stellt somit ein Kandidatenprotein bei der LPXN-vermittelten Progression von PCa dar. Die Expressionsanalyse in den etablierten PCa-Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU 145 ergab sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine stark erhöhte Expression von Caldesmon in den androgen-unabhängigen und invasiven PC-3-Zellen. Subzellulär ist Caldesmon an den F-Aktin-Fasern lokalisiert, wobei zusätzlich eine Kolokalisation von Caldesmon und LPXN an den *focal adhesion sites* beobachtet werden konnte. Nach Herunterregulierung der Caldesmon-Expression konnte in PC-3- und DU 145-Zellen eine erhöhte Migrations- und Invasionsfähigkeit, jedoch keine veränderte Proliferation der Zellen nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen LPXN und Caldesmon wurde mittels *GST-Pulldown* bestätigt, wobei der Interaktionsbereich auf die LIM-Domänen von LPXN eingeschränkt werden konnte. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass nach Herunterregulierung der LPXN-Expression die Expression von Caldesmon nicht verändert wird, aber die Menge an phosphoryliertem und damit inaktivem Caldesmon abnimmt, was zu einer Reduktion der Migration der PCa-Zellen führt.

Weitergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass LPXN auch einen Einfluss auf die Adhäsion und Ausbreitung von PCa-Zellen ausübt. So zeigten PC-3- und DU 145-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression eine verminderte Adhärenz 1 h bzw. 2 h nach

Ausplattieren auf verschiedenen beschichteten Untergründen im Vergleich zu den Kontrolltransfizierten Zellen. Des Weiteren konnte mittels Immunzytochemie eine reduzierte Ausbreitung der LPXN *knockdown* Zellen beobachtet werden. Die LPXN-überexprimierenden murinen PCa-Primärzellen (LPXN/TRAMP) hingegen adhärten stärker als die entsprechenden TRAMP-Kontrollprimärzellen. Da bei der für die Adhärenz und Ausbreitung von Zellen notwendigen Umstrukturierung des Zytoskeletts vor allem die Familie der kleinen Rho-GTPasen eine große Rolle spielen, wurde mittels *GST-Pulldown*-Assays die Aktivitäten von RhoA und Rac1 in PC-3-Zellen mit LPXN *knockdown* bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass bei verminderter LPXN-Expression eine verringerte RhoA- und eine verstärkte Rac1-Aktivität zu verzeichnen ist.

Um zu untersuchen, in welche weiteren Signalwege LPXN involviert ist, wurde ein Antikörper-Array an PC-3-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen durchgeführt. Die Kinasen TAK1 und Yes konnten dabei als herunterregulierte Gene nach LPXN *knockdown* identifiziert werden. Die weitere Analyse der TAK1-vermittelten Signalwege ergab, dass sich abhängig von der LPXN-Expression auch der Phosphorylierungsstatus der *downstream* von TAK1 stehenden Kinase JNK ändert. Der Phosphorylierungsstatus der *downstream* von TAK1 stehenden Kinasen MKK3/6 und p38 änderte sich hingegen nicht. Die Involvierung von LPXN in den TAK1-JNK-ATF-2-Signalweg konnte durch eine quantitative *real-time* PCR bestätigt werden. Die ATF-2-Zielgene Maspin und Presenilin1 waren nach Herunterregulierung der LPXN-Expression in PC-3-Zellen vermindert exprimiert, wohingegen in den LPXN-überexprimierenden Primärzellen (LPXN/TRAMP) eine verstärkte Expression von Presenilin1 nachgewiesen werden konnte.

Die Analyse des Phosphorylierungsstatus der Kinasen der SRC-Familie ergab weiterhin einen Einfluss von LPXN auf deren Aktivität. Bei verminderter LPXN-Expression war der Phosphorylierungsstatus der Mitglieder der SRC-Familie in PC-3-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert.

4.2 Zur Bedeutung von LPXN in der Progression von Prostatakarzinomen

Viele humane Tumore entstehen durch verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen, durch die die Proliferation und Homöostase der Zellen gestört werden. Hanahan und Weinberg [2000] postulierten, dass sich maligne Zellen durch den Erwerb der Autonomie der Wachstumssignale, der Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibierenden Signalen, des Umgehens des programmierten Zelltodes (Apoptose) und des unbegrenzten Replikationspotentials entwickeln. Erlangt eine Zelle durch Mutationen diese Eigenschaften, ist sie in der Lage, eine Population an Zellen mit den gleichen physiologischen Dispositionen aufzubauen, wodurch eine primäre Tumormasse entsteht. Um sich zu einer größeren Tumormasse zu entwickeln, muss diese die Fähigkeit der fortwährenden Angiogenese erlangen [Bouck *et al.*, 1996; Hanahan und Folkman, 1996; Hanahan und Weinberg, 2000]. Während der weiteren Entwicklung der meisten humanen Tumore entstehen Zellen, die sich von der primären Tumormasse lösen, in das umliegende Gewebe invadieren, durch die Blutbahn an entfernte Orte gelangen und dort Metastasen bilden. Die Metastasenbildung ist der Grund für 90% der Krebs-verursachten Todesfälle [Sporn, 1996; Hanahan und Weinberg, 2000].

Das humane PCa folgt durch die Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen in seiner Progression ebenfalls einem kanonischen Muster: Entstehung der Prostata intraepithelialen Neoplasie (PIN), lokal begrenzter Tumor, Invasion der malignen Zellen in das Stroma, Infiltration von Samenblase, Blasenhal, Sphincter extemus und Rektum und Bildung von Metastasen zumeist in Lymphknoten und Knochen. Der Verlust der Expression oder das Auftreten von Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Transkriptionsfaktoren wie z.B. AR, Phosphatase und Tensin homolog (PTEN), Protein 53 (p53) und NK3 homeobox 1 (NKX3.1) konnten im fortgeschrittenen Stadium des PCa beobachtet werden [Hollstein *et al.*, 1998; Abate-Shen und Shen, 2000; Song *et al.*, 2009]. Trotzdem gibt es noch immer unzureichende Kenntnisse über spezifische Gene und Signalwege, die in die Progression der PIN zum invasiven und metastasierenden PCa involviert sind.

In vorangegangenen Arbeiten konnte Leupaxin als differentiell exprimiertes Gen im humanen PCa identifiziert werden [Kaulfuß, 2006]. Durch *in vivo*-Experimente an transgenen Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass LPXN keinen Einfluss auf die Initiation des PCa ausübt [Kaulfuß, 2006]. Für diese Untersuchungen wurde eine Expressionskassette verwendet, die

426 Basenpaare (bp) des Probasin-Promotors der Ratte und 28 bp der 5'-untranslatierten Region enthält, was dazu führt, dass das CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase) -Gen prostataspezifisch exprimiert wird. Das Transgen wird nach dem Entwicklungsstand und hormonell durch Androgene reguliert, wobei sich die Expression hauptsächlich auf die ventralen, dorsalen und lateralen Lappen der Prostata beschränkt [Greenberg, 1994]. In der transgenen LPXN-Maus wurde hinter den beschriebenen Probasin-Minimalpromotor der offene Leserahmen des humanen LPXN und zusätzlich zur Unterscheidung des endogenen, murinen LPXN ein 6facher *cmv*-Tag kloniert [Herr, 2005]. Es wurden zwei unabhängige transgene Maus-Linien auf FVB-Hintergrund generiert. Wie erwartet, führt die Verwendung des Probasin-Promotors zur Expression von LPXN ausschließlich in den dorsalen und ventralen Lappen der Prostata, wobei Mauslinie #19 eine schwache und Mauslinie #20 eine starke Expression des transgenen LPXN aufweist. Histopathologische Untersuchungen der Mäuse bis zu einem Alter von zwei Jahren bestätigen, dass durch die Überexpression von LPXN keine morphologischen Veränderungen in Form von malignen Läsionen in der Prostata entstehen [Kaulfuß *et al.*, 2009]. Dennoch konnten voneinander unabhängige *in vitro*-Studien beweisen, dass LPXN Eigenschaften wie Migrations- und Invasionsfähigkeit von PCa-Zellen beeinflusst [Sahu *et al.*, 2007; Kaulfuß *et al.*, 2008].

Die Annahme, dass LPXN die Progression von PCa fördert, konnte durch die Verpaarung der LPXN-Mäuse mit TRAMP-Mäusen bestätigt werden. In der TRAMP-Maus, welche auf einem C57Bl/6-Hintergrund generiert wurde, steht das SV40 (Simian Virus 40 Antigen) *large T*- und *small t*-Antigen [Greenberg *et al.*, 1995] ebenfalls unter der Kontrolle des Probasin-Minimalpromotors. Da das SV40-Antigen mit den Produkten der Retinoblastom- und p53-Tumorsuppressorgene interagiert und deren Wirkungsweise inaktiviert, entwickelt sich in 100% dieser Mäuse im Alter von 24 bis 30 Wochen ein PCa mit Fernmetastasen [Linzer *et al.*, 1979; Lane *et al.*, 1979; DeCaprio *et al.*, 1988]. Durch eine Kastration und dem daraus resultierenden Androgenentzug kommt es bei 80% der TRAMP-Mäuse zu einer Androgen-unabhängigen Entwicklung des PCa. Die Initiation und Progression des PCa sowie die Bildung von Fernmetastasen in Lymphknoten, Lunge und Knochen in der TRAMP-Maus weist dabei starke Homologien zum humanen PCa auf [Gingrich *et al.*, 1996; Gingrich und Greenberg, 1996; Gingrich *et al.*, 1997]. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich das TRAMP-Mausmodell hervorragend für *in vivo*-Studien über den Einfluss von Genen auf die Progression von bereits initiierten PCa.

Durch die Analyse der F1-Generation, die aus der Verpaarung von transgenen LPXN-Mäusen mit den TRAMP-Mäusen stammt, konnte bestätigt werden, dass LPXN an der Progression

von PCa beteiligt ist. Im Alter zwischen 18 und 26 Wochen entwickelt die Mehrheit der untersuchten doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäuse bereits ein schlecht differenziertes PCa mit Fernmetastasen in Leber, Lunge oder Lymphknoten, während zum gleichen Zeitpunkt die Mehrheit der einfach transgenen TRAMP-Kontrollmäuse nur eine morphologische Veränderung der Prostata in Form der PIN aufweist. Der Initiationszeitpunkt des PCa bleibt in allen untersuchten Mäusen unverändert. Dies bestätigt wiederum, dass die Initiation des PCa ausschließlich durch die Überexpression des SV40 T/t-Antigens ausgelöst wird und dass LPXN keinen Einfluss auf die Initiation von PCa ausübt. Kontroverse Ergebnisse wurden dazu von Dai *et al.* [2009] veröffentlicht. Es wurde beobachtet, dass die stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen mit pEGFP-N1-LPXN und die anschließende subkutane Injektion der Zellen in BALB/c-Nacktmäuse in einer Tumorbildung nach 28 Tagen resultieren.

Die Entwicklung und das Wachstum von PCa sind wesentlich von der Funktion von Androgenen abhängig. Einerseits sichern die Androgene in der gesunden Prostata das Überleben der Epithelzellen und andererseits vermitteln sie den ersten Schritt in der Entstehung maligner Prostatazellen [De Marzo *et al.*, 1998]. Solange wie der lokale Prostatatumor keine Fernmetastasen gebildet hat, können Patienten durch Operation oder Strahlentherapie behandelt werden. Bei fortgeschrittenen Tumoren hingegen wird bei einer Vielzahl von Patienten eine androgen-unterdrückende Therapie angewendet. Bereits 1972 wurde diese Methode zur Behandlung von aggressiven PCa von Huggins und Hodges beschrieben [1972]. Dabei werden vor allem Medikamente verwendet, die als Antiandrogene wirken, sowie LH-RH- (*luteinizing-hormone-releasing-hormone*) Analoga (z.B. Leuprorelin). Obwohl diese Therapieform zunächst das Tumorstadium inhibiert, tritt nach 12 bis 24 Monaten ein androgen-unabhängiges Rezidiv auf, welches durch ein noch aggressiveres Verhalten der PCa-Zellen und durch die Bildung von Metastasen gekennzeichnet ist, was letztendlich zum Tod des Patienten führt. Die postulierten Mechanismen zur Erklärung der Hormonresistenz umfassen im Wesentlichen drei Ansätze.

Der erste Ansatz beschreibt die verstärkte Aktivierung des AR durch Punktmutationen oder Amplifikationen auf genomischer Ebene, welche in 20 bis 30% der androgen-unabhängigen Prostatatumore auftreten [Gaddipati *et al.*, 1994]. Die Mehrheit der Mutationen treten in der Ligandenbindungsdomäne des AR auf und bewirken, dass Liganden wie z.B. Östrogen oder Hydrocortison am AR binden und eine Aktivierung bewirken können [Veldscholte *et al.*, 1990; Matias *et al.*, 2002].

Eine zweite Möglichkeit stellt die Liganden-unabhängige Aktivierung des AR dar. Ein möglicher Mechanismus der Liganden-unabhängigen Aktivierung des AR beschreibt die Phosphorylierung und damit Aktivierung der AR-Koaktivatoren, was zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität des AR führt [Ueda *et al.* 2002; Edwards *et al.*, 2005b]. Ueda *et al.* [2002] konnten zeigen, dass Interleukin-6 (IL-6) in Abwesenheit der Androgene den AR aktivieren kann und, dass die Phosphorylierung des AR-Koaktivators SRC durch die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) für die liganden-unabhängige Aktivierung des AR durch IL-6 erforderlich ist. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass die Expression des Prostata spezifischen Antigens (PSA) in PCa-Zellen durch die Liganden-unabhängige Aktivierung des AR durch IL-6 induziert werden kann [Ueda *et al.*, 2002]. Ebenfalls kann eine veränderte Balance zwischen Koaktivatoren und Korepressoren die AR-Aktivität beeinflussen [Gregory *et al.*, 2001; Mestayer *et al.*, 2003].

Eine dritte Möglichkeit der Hormonresistenz basiert auf dem Konzept, dass die Wachstums- und Überlebens-fördernden Funktionen des AR durch alternative Signalwege umgangen werden, so dass der AR für die Tumorprogression nicht länger von Bedeutung ist. Ein Beispiel dafür stellt das anti-apoptotische Gen BCL-2 dar, welches durch das Umgehen der Apoptose als Onkogen wirkt. McDonnell *et al.* [1992] konnten immunhistochemisch zeigen, dass in 13 von 19 androgen-abhängigen PCa keine BCL-2-Expression zu detektieren ist, während in allen untersuchten androgen-unabhängigen PCa eine diffuse, starke Färbung von BCL-2 nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung konnte auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden, die eine direkte Korrelation der Bcl-2-Expression mit der Progression des PCa vom androgen-abhängigen zum androgen-unabhängigen Stadium nachweisen konnten [Raffo *et al.*, 1995; Catz und Johnson, 2003].

Trotz zahlreicher Studien zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen bei der Entwicklung des androgen-abhängigen PCa zum androgen-unabhängigen Rezidiv, bleibt letzteres für die Humanmedizin ein schwerwiegendes Problem. *In vivo* kann das androgen-unabhängige Wachstum des PCa in TRAMP-Mäusen durch eine Kastration imitiert werden. Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen ergaben, dass durch die Komplexität und Heterogenität der Primärtumore der Androgenentzug jedoch in den TRAMP-Mäusen, ähnlich dem humanen Karzinom, unterschiedliche Auswirkungen hat: die Mehrheit der Tumore verlangsamen zunächst ihr Wachstum, während der Androgenentzug auf einige Tumore keinen Einfluss hat [Gingrich *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2005]. In den Tumoren, welche positiv auf den Androgenentzug ansprechen, konnte zehn Wochen nach der Kastration eine erhöhte Expression von Bcl-2 und Grp78 und eine reduzierte Expression von BAX, BCL-xl,

SV40 T-Antigen und c-myc beobachtet werden. Weiterhin zeigten diese Tumore zunächst eine Reduktion der proliferierenden Zellen im Vergleich zu nicht-kastrierten Mäusen. 20 Wochen nach der Kastration konnte jedoch ein Anstieg in der Größe des Primärtumors sowie die Entstehung von Fernmetastasen beobachtet werden [Tang *et al.*, 2008].

Die Analyse des Einflusses von LPXN auf das Progressionsverhalten von androgen-unabhängigen PCa *in vivo* ergab ein signifikant schnelleres Prostatatumorwachstum in kastrierten LPXN/TRAMP-Mäusen im Vergleich zu einfach transgenen TRAMP-Mäusen. Während die einfach transgenen TRAMP-Mäuse nach Androgenentzug ein durchschnittliches Überlebensalter von 20,6 Wochen erreichten, konnte bei den doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen nach Androgenentzug nur ein durchschnittliches Überlebensalter von 18,7 Wochen beobachtet werden. In 80% der Mäuse waren zum Zeitpunkt der Präparation Fernmetastasen in Lymphknoten, Leber, Lunge und Niere zu verzeichnen. Zum selben Zeitpunkt (20,6 bzw. 18,7 Wochen) konnte in den nicht-kastrierten Mäusen der jeweiligen Versuchstiergruppe (TRAMP bzw. LPXN/TRAMP) nur in 11% bzw. 56% ein vergleichbares Karzinom und nur in 0% bzw. 7% Metastasen detektiert werden.

Zur Beantwortung der Frage, wie LPXN das androgen-unabhängige Prostatatumorwachstum beschleunigen kann, gibt es drei Ansätze. Zum einen konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass LPXN mit dem AR interagiert [Kaulfuss *et al.*, 2008]. Da diese Interaktion jedoch nur in Anwesenheit des Liganden DHT beobachtet werden konnte, müsste der AR die Fähigkeit erlangt haben, die Liganden-Spezifität zu ändern, um auch in Abwesenheit der Androgene durch z.B. Antiandrogene oder Östrogene aktiviert zu werden.

Für das Paxillin-Familienmitglied ARA55 konnte die Fähigkeit der Änderung der Liganden-Spezifität bereits gezeigt werden [Fujimoto *et al.*, 1999]. Außerdem konnte beobachtet werden, dass in Anwesenheit von ARA55 die Aktivität des AR auch bei niedrigen Konzentrationen von Androgenen erhöht wird. Weiterhin wurde in zwei von sechs Patienten ein erhöhtes Expressionslevel von ARA55 in den androgen-unabhängigen Tumorbereichen im Vergleich zu den androgen-abhängigen Tumorbereichen nachgewiesen [Fujimoto *et al.*, 2007].

Eine zweite mögliche Erklärung stellt die direkte Regulation der Transkription von Zielgenen des AR dar. Kaulfuss *et al.* [2008] konnten zeigen, dass LPXN sowohl im Kern als auch im Zytoplasma von PCa-Zellen lokalisiert und die transkriptionelle Aktivität des AR erhöht. Shi *et al.* [2008] demonstrierten, dass im androgen-unabhängigen PCa sowohl der AR als auch die Mitglieder der p160-kDa Kernrezeptor-Koaktivatoren stark exprimiert werden, und dass diese die androgen-unabhängige Aktivierung des AR erhöhen.

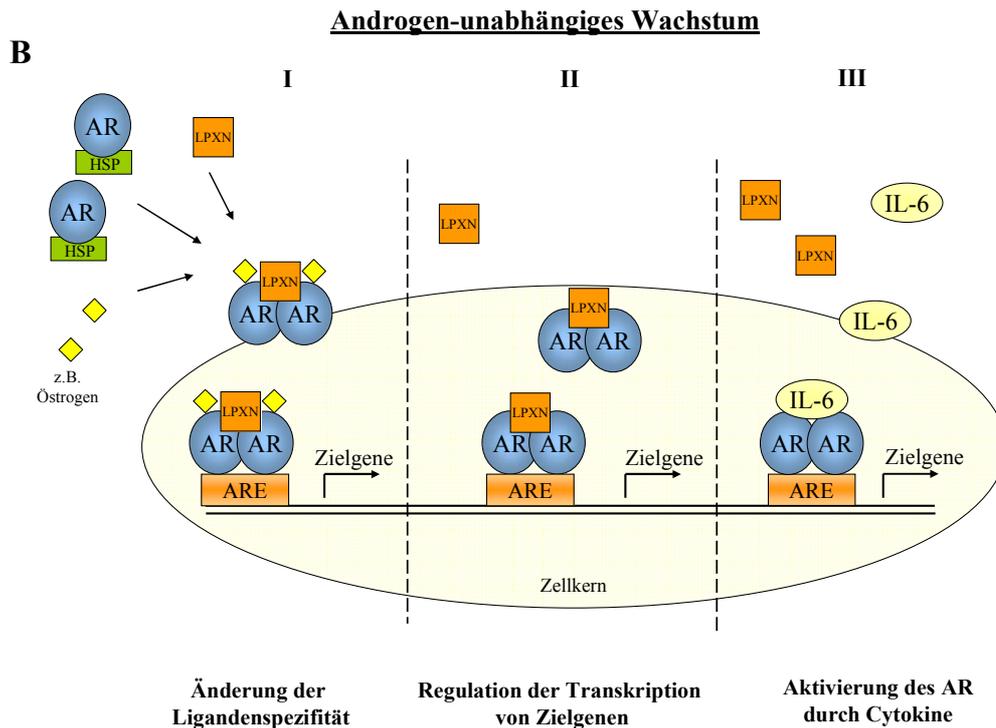


Abb. 4.1: Grafische Darstellung zum Einfluss des AR und von LPXN auf das Androgen-abhängige und –unabhängige Wachstum von PCa. A: Androgen-abhängiges Wachstum: I: Im normalen Prostatagewebe vermittelt der AR, aktiviert durch Androgene, das Wachstum der Zellen. II: Der Entzug der Androgene führt zunächst zur Inhibierung des Wachstums. B: Androgen-unabhängiges Wachstum: Die Änderung der Ligandenspezifität (I), die Regulation der Transkription von Zielgenen (II) und die Aktivierung des AR durch z.B. Cytokine (III) sind potentielle Mechanismen, durch die LPXN das androgen-unabhängige Wachstum des PCa fördern könnte.

4.3 Molekulare Mechanismen der Tumorprogression

Die Tumorigenese im Menschen ist ein vielfältiger Prozess mit genetischen Veränderungen, durch die eine Transformation von normalen Zellen zu malignen Tumorzellen und im späteren Stadium zu hoch-invasiven und metastasierenden Zellen erfolgt. Auf molekularer Ebene werden als verantwortliche Gene für die Tumordinvasion und Metastasierung, welche wichtige Aspekte der Tumorprogression beschreiben, vor allem Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Integrine), Matrix-Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren sowie Wachstumsfaktoren diskutiert.

4.3.1 Zelladhäsionsmoleküle in der Tumorprogression

Die Zelladhäsion spielt bei Wachstum, Migration und Differenzierung von Zellen eine bedeutende Rolle. Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) sind an der Zell-Zell-Interaktion sowie der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt [Cohen *et al.*, 1997]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten 50 CAMs identifiziert werden, die aufgrund ihrer Proteinstruktur in vier Gruppen eingeteilt werden: die Immunoglobulin (Ig)- Superfamilie, Integrine, Selektine und die Cadherin-Familie [Okegawa *et al.*, 2002]. Die Ig-Superfamilie ist die größte Familie der CAMs und umfasst Zelloberflächen- sowie lösliche Proteine, die bei Erkennungs- und Bindungsprozessen in der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Sie beinhalten z.B. einige Antigen-Rezeptoren, Cytokine und Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Integrine beschreiben vor allem die Transmembranproteine, die für die Zell-Zell-Verbindung und die Signalübertragung zwischen den Zellen verantwortlich sind. Die Gruppe der Selektine umfasst die Zelloberflächenproteine P-, E- und L-Selektin. Die Mitglieder der Cadherin-Familie lokalisieren in der Zelle an speziellen Zell-Zell-Adhäsionsstellen, an denen sie mit dem Zytoskelett der Zelle in Verbindung stehen. Sie fungieren als Tumorsuppressorgene [Hedrick *et al.*, 1993]. Defekte in der Expression oder der Funktion von Cadherinen werden mit der Tumorprogression in Korrelation gebracht [Behrens *et al.* 1989]. Die klassischen Cadherine sind E (*epithelial*)-, N (*neural*)- und P (*placental*)- Cadherin. Das bedeutendste und am intensivsten untersuchte Cadherin stellt das E-Cadherin dar. Es vermittelt den Zell-Zellkontakt und fungiert als wichtiger Suppressor der Zellinvasion und Metastasierung von epithelialen Tumoren [Birchmeier und Behrens, 1994; Becker *et al.*, 1994; Berx *et al.*, 2001]. Es konnte gezeigt werden, dass während der Progression von duktalem Brusttumoren E-Cadherin als dynamisch und reversibel exprimiert beobachtet werden [Kowalski *et al.*, 2003]. Derksen *et al.* [2006] konnten zeigen, dass der konditionale Verlust der E-Cadherin-Expression in Mäusen mit p53-Defizienz im Brustepithel die Tumordinvasion und -progression fördert. Der alleinige Verlust der E-Cadherin-Expression im Mausmodell reicht hingegen nicht aus um ein Tumorstadium zu initiieren [Tinkle *et al.*, 2004; Tunggal *et al.*, 2005; Derksen *et al.*, 2006].

Da die Cadherine nicht über eine intrinsische Enzymaktivität verfügen, assoziieren sie mit ihrer zytoplasmatischen Domäne mit einer Gruppe von intrazellulären Proteinen, den Cateninen, welche die Cadherine an die Aktin-Filamente binden und so den Signal-Transduktions-Mechanismus vermitteln [Ozawa *et al.*, 1998; Bryant und Stow, 2004; Mege *et al.*, 2006]. Diese Assoziation der Catenine zu den Cadherinen ist ein bedeutender

Schritt der intakten Zelladhäsion. Eine Änderung der Catenin-Expression oder -Lokalisation kann zur Störung der Zell-Zell-Adhäsion und somit zu aggressiveren und invasiveren Eigenschaften der Tumorzellen führen. Zu den wichtigsten Vertretern der Catenine gehören β -Catenin, welches direkt an das distale Ende der zytoplasmatischen Domäne der Cadherine bindet, α -Catenin, welches indirekt durch die Bindung an β -Catenin mit den Cadherinen verbunden ist und p120-Catenin (p120CTN), welches mit der proximalen Region der zytoplasmatischen Domäne der Cadherine assoziiert ist.

In den letzten zwei Jahrzehnten konnte über die Funktionen von β -Catenin in humanen Tumoren zahlreiche Erkenntnisse gewonnen werden. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass in ca. 90% der kolorektalen Tumore Mutationen bei den Mitgliedern des Wnt- β -Catenin Signalweges auftreten. [Bienz *et al.*, 2000; Vogelstein *et al.*, 2004]. Mutationen, durch die der Wnt- β -Catenin Signalweg aktiviert wird, fördern die Stabilisierung des freien β -Catenins und die Akkumulation von β -Catenin im Kern. Im Kern bindet β -Catenin an den N-terminalen Bereich von TCF/LEF (*T-cell-factor/ lymphoid enhancer factor*), welche zusammen einen Transkriptionskomplex bilden. Dieser Transkriptionskomplex reguliert die Transkription der Wnt- β -Catenin Zielgene, was in einer Veränderung der Zellproliferation, Zellpolarität und Zellmigration resultiert [Behrens *et al.*, 1996; van de Wetering *et al.*, 1997]. Gleichzeitig konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass der Verlust der Cadherine und der daraus resultierende ansteigende Pool des freien, cytoplasmatischen β -Catenins nicht ausreichen, um den β -Catenin-Signalweg einzuschalten. So zeigen Krebszelllinien, welche kein E-Cadherin exprimieren, keine erhöhte Expression von β -Catenin-Zielgenen [Caca *et al.*, 1999; van de Wetering *et al.*, 2001]. Unter normalen Bedingungen wird das freie, cytoplasmatische β -Catenin durch die schnelle Degradation auf einem konstanten Level gehalten. Nur wenn zusätzlich zum Verlust des E-Cadherins die Degradations-Maschinerie defekt ist, resultiert dies in einem Anstieg von β -Catenin im Kern und zur Expression von Zielgenen [Sadot *et al.*, 1998; Herzig *et al.*, 2007] (Abb. 4.2).

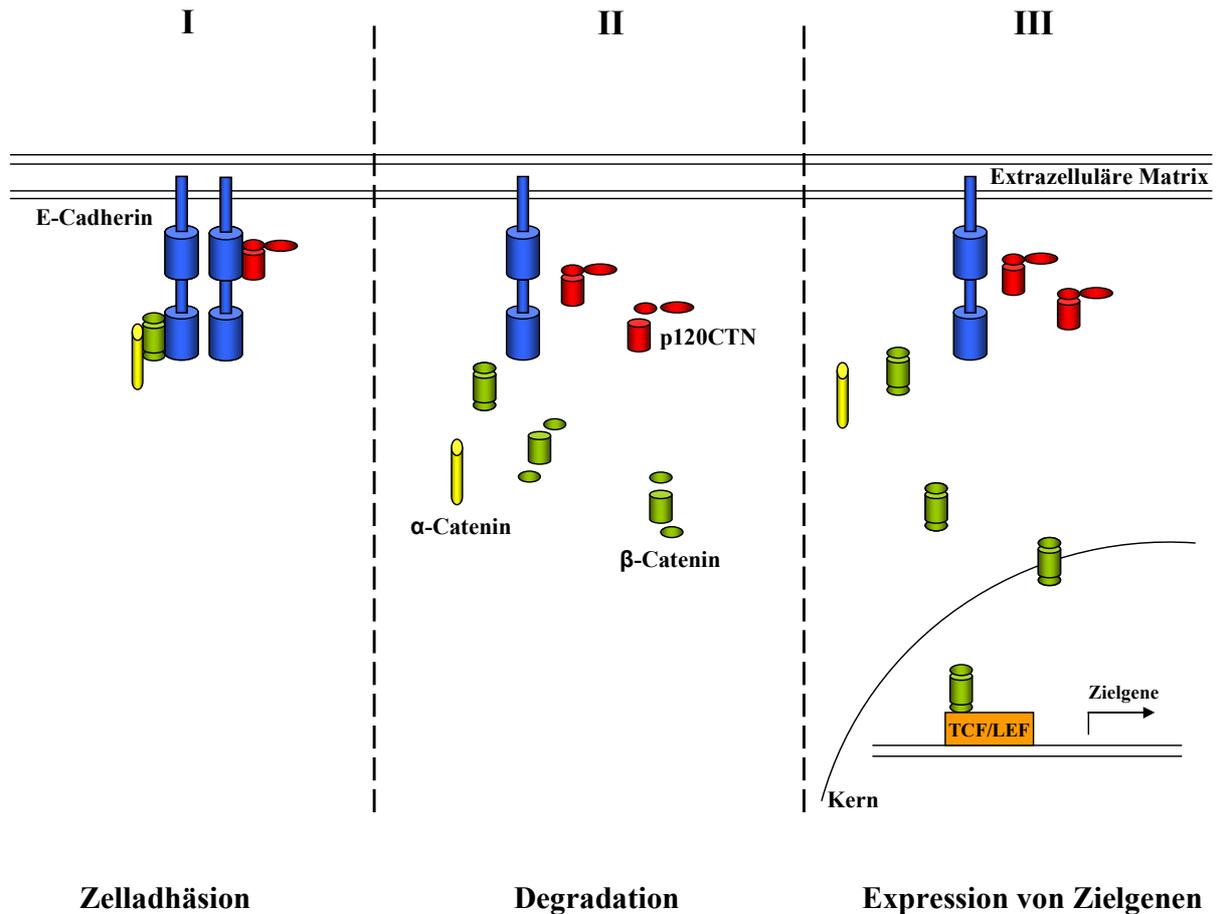


Abb. 4.2: Schematische Darstellung zur Wirkungsweise der Zelladhäsionsmoleküle. I: Unter normalen Bedingungen sind α -Catenin, β -Catenin, E-Cadherin und p120CTN in Komplexen an die Membran gebunden. II: Beim Verlust der E-Cadherin-Expression kommt es zur Lockerung der Komplexbildung, wodurch die einzelnen Moleküle vom Komplex dissoziieren und degradiert werden. III: Nur wenn zusätzlich zur E-Cadherin-Expression die Degradations-Maschinerie defekt ist, kann β -Catenin in den Kern wandern und die Expression von Zielgenen fördern, wodurch das Zellverhalten, wie z.B. Migration, Invasion und Proliferation reguliert werden.

Das Catenin p120CTN gehört zur p120-Proteinfamilie und wurde ursprünglich als Substrat der SRC-Kinase sowie anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen identifiziert [Reynolds *et al.*, 1989; Downing und Reynolds, 1991]. Die Mitglieder der p120-Proteinfamilie haben eine charakteristische Organisation ihrer Armadillo-Repeat-Domäne gemeinsam. Die Interaktion zwischen den Mitgliedern der p120-Proteinfamilie und der Cadherine wird über deren Armadillo-Repeat-Domäne vermittelt. Molekulare Analysen zeigen, dass p120CTN zum Einen für den Transport der Cadherine zur Zellmembran und zum Anderen für die Stabilität der Cadherine an der Zellmembran verantwortlich ist. Bei verminderter oder gestörter p120CTN-Expression konnte beobachtet werden, dass es zur Lockerung der Komplexbildung

der Adhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche kommt, wodurch die Anordnung der Cadherine verloren geht und diese degradiert werden [Davis *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2006]. Im Tumorgewebe von Blase [Syrigos *et al.*, 1998], Brust [Nakopoulou *et al.*, 2002], Prostata [Kallakury *et al.*, 2001a, b], Lunge [Bremnes *et al.*, 2002] und Pankreas [Karayiannakis *et al.*, 1999] konnte für p120CTN eine abnormale Expression detektiert werden, wobei der Verlust, auch in Korrelation mit dem Verlust der E-Cadherin- und β -Catenin-Expression, immer mit einer schlechten Prognose assoziiert ist.

Weiterhin konnte p120CTN als Regulator der Zellmigration und -proliferation durch die Regulation der Aktivitäten der RhoGTPasen identifiziert werden [Anastasiadis *et al.*, 2007]. Die RhoGTPasen regulieren verschiedene zelluläre Funktionen, wie z.B. Zytoskelett-Organisation, Adhäsion und Polarität [Fukata *et al.*, 2003; Etienne-Manneville, 2004]. Dabei sind sie speziell für die Ausbildung von verschiedenen Aktinfortsätzen, wie z.B. Filopodien, Lamellipodien, Invadopodien und Podosomen verantwortlich, durch die Zellmigration, -invasion und -adhäsion vermittelt werden.

Es wird postuliert, dass p120CTN zum Einen gebunden an den Zell-Zell-Adhäsionskomplex vorliegen kann, wodurch es die Zelladhäsion beeinflusst, und zum Anderen in einem zytoplasmatischen Pool, wodurch es die Aktivität der Regulatoren der RhoGTPasen kontrolliert [Thoreson *et al.*, 2000]. Noren *et al.* [2000] konnten demonstrieren, dass p120CTN mit dem Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Vav2 interagiert, wodurch die Aktivität der GTPasen und damit die Veränderung des Zytoskeletts beeinflusst werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von p120CTN die Aktivitäten der RhoGTPasen Cdc42 und Rac1 stimuliert und die Aktivität von RhoA inhibiert. Dies könnte in einer verstärkten Zellmigration resultieren (Abb. 4.3).

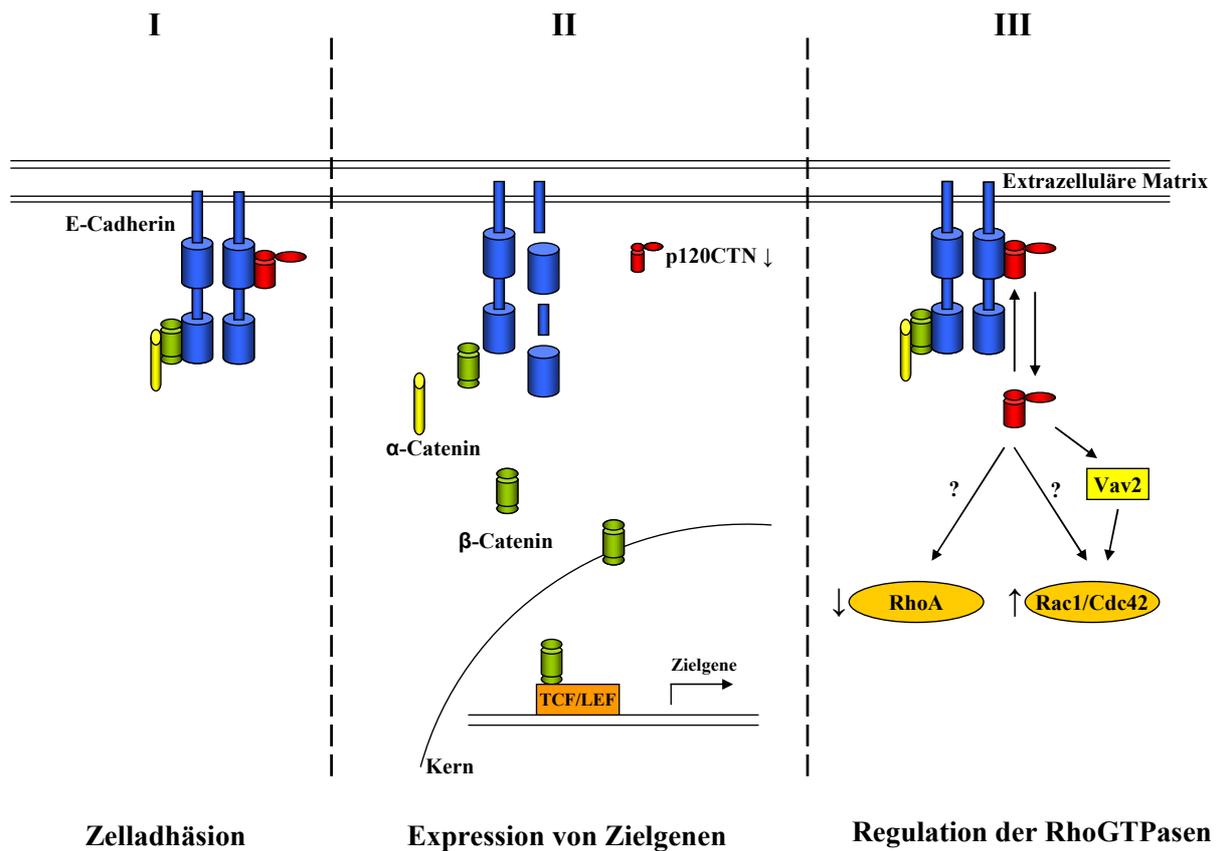


Abb. 4.3: Schematische Darstellung zur Wirkungsweise der Zelladhäsionsmoleküle in Abhängigkeit von der p120CTN-Expression. I: Unter normalen Bedingungen sind α -Catenin, β -Catenin, E-Cadherin und p120CTN in Komplexen an der Membran gebunden. II: Durch den Verlust der p120CTN-Expression könnte der Zell-Zell-Adhäsionskomplex gelockert werden, wodurch sich β -Catenin löst und in den Kern translozieren kann. Im Kern könnte β -Catenin durch die Bindung an TCF/LEF die Expression von Zielgenen und dadurch Zellmigration, -invasion und -proliferation fördern. III: (mod. nach Noren *et al.*, 2000) Nicht gebunden an den Zell-Zell-Adhäsionskomplex könnte p120CTN die Regulatoren der RhoGTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 beeinflussen, wodurch Zelleigenschaften wie Zellmigration vermittelt werden könnten.

4.3.2 Matrix-Metalloproteinasen in der Tumorprogression

Bevor Tumorzellen während der Progression in die Blutbahn gelangen und sich schließlich an verschiedensten Stellen wieder anheften, um Metastasen zu bilden, müssen sie sich vom Primärtumor ablösen und die Extrazelluläre Matrix (ECM) überwinden. Die Fähigkeit der Fortbewegung ist ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen den CAMs, die das Ablösen und Anheften der Zellen kontrollieren, und der Veränderung der ECM durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [Holly *et al.*, 2000; Hornebeck *et al.*, 2002]. MMPs bilden eine

Abb. 4.4: Potentielle Mechanismen bzw. Angriffspunkte der Matrix-Metalloproteinasen (mod. nach Sternlicht und Werb, 2001). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind nicht nur in der Lage, Fragmente der ECM zu degradieren und die angegebenen Proteine zu spalten, sondern beeinflussen ebenfalls Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Matrix-Interaktionen und die Rekrutierung von Zellen.

MMPs werden sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch auf der Ebene der Protein-Aktivierung reguliert. Die transkriptionelle Regulation der MMP-Gene erfolgt durch AP-1 in der proximalen Promotorregion [Fini *et al.*, 1998] und wird durch verschiedene extrazelluläre Stimuli induziert. Diese extrazellulären Stimuli sind z.B. Cytokine (Interleukin-4 und -6), Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- α , bFGF, TGF- β -1), Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen [Sundareshan *et al.*, 1999; Duivenvoorden *et al.*, 1999; Mira *et al.*, 1999].

Die Regulation der MMPs auf der Ebene der Protein-Aktivierung wird vor allem den Invadopodien zugeschrieben [Chen *et al.*, 1985; Weaver *et al.*, 2006]. Invadopodien stellen Aktin-reiche Strukturen an der basalen Seite der migrierenden Zelle dar, durch die der direkte Kontakt zu der ECM vermittelt wird und an denen die MMPs akkumulieren. Durch den Auf- und Abbau der Invadopodien werden die Aktin-Anordnung, Signalwege, Zelladhäsion und die Sekretion der Proteinasen beeinflusst und die ECM-Anordnung reguliert [Weaver *et al.*, 2006; Linder *et al.*, 2007].

Die Dynamik der Invadopodien, und damit die Sekretion der MMPs, werden wiederum durch Proteine reguliert, die an den Aktinfilamenten lokalisieren. Yoshio *et al.* [2007] konnten zeigen, dass das Aktin- und Calmodulin-bindende Protein Caldesmon einen Regulator der Invadopodien-Formation darstellt. Durch alternatives *splicing* von Caldesmon entstehen fünf verschiedene Isoformen [Hayashi *et al.*, 1992]. Während Isoform 1 (h-Cald) als in Muskelzellen vorkommende Isoform beschrieben wird (90-150 kDa), treten die Isoformen 2-5 (l-Cald) mit einem geringeren Molekulargewicht (60-80 kDa) in Nichtmuskelzellen auf. In transformierten Zellen und Tumorzellen konnte beobachtet werden, dass die Formation der Invadopodien und der verwandten Podosomen ansteigt, wenn Caldesmon schwach exprimiert wird. Dagegen wird die Bildung der Invadopodien und Podosomen inhibiert, wenn Caldesmon überexprimiert wird [Yoshio *et al.*, 2007]. Da an den Invadopodien, wie bereits oben erwähnt, Proteine sezerniert werden, durch die die Komponenten der ECM degradiert werden können, stellen diese eine Schlüsselfunktion in der Zellinvasion dar.

Die Überexpression von Caldesmon konnte in einen direkten Zusammenhang mit der Abnahme der Degradation der ECM und der Inhibierung der Invasionsfähigkeit der Zellen gebracht werden [Yoshio *et al.* 2007]. Eine Herunterregulierung der Caldesmon-Expression in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 und der Darmkrebszelllinie HCA7 resultiert hingegen

in einer verstärkten Invadopodien-Formation und einer daraus resultierenden erhöhten Degradation der ECM sowie Invasionsfähigkeit der Zellen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten demonstrieren, dass die Phosphorylierung von Caldesmon durch z.B. die CDC2-Kinase zur Inaktivierung des Proteins führt, wodurch Caldesmon von den Mikrofilamenten dissoziiert, die Inhibierung der ATPase-Aktivität aufgehoben wird und die Invadopodien neu gebildet werden [Foster *et al.*, 2004; Kordowska *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009]. Die bekannten Phosphorylierungsstellen für die Serin-Kinasen ERK und CDC2 sind Ser 497 und Ser 527 in der C-terminalen Region von Caldesmon (l-Cald) (Abb. 4.5). Eine Korrelation zwischen der Expression/Phosphorylierung von Caldesmon und der Expression/Sekretion der MMPs wurde bis *dato* nicht nachgewiesen.

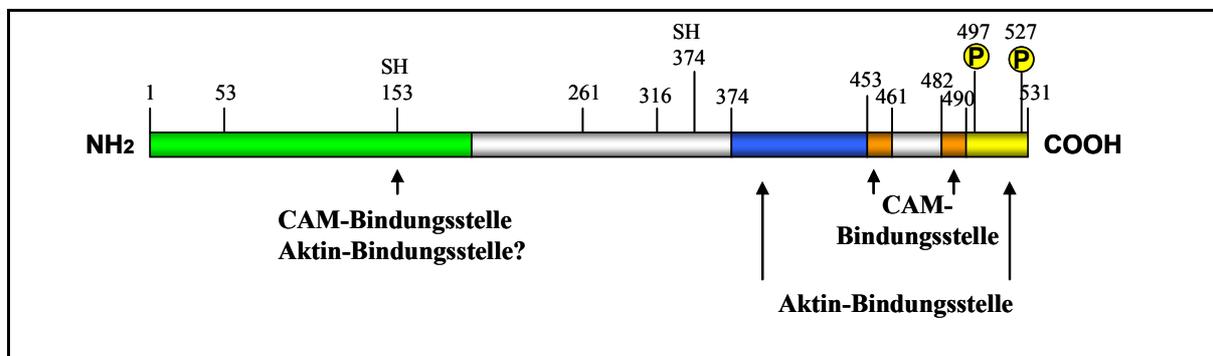


Abb. 4.5: Domänenstruktur des humanen l-Caldesmon mit Bindungsstellen für Aktin und Calmodulin. Die Phosphorylierungsstellen Ser 497 und Ser 527 sind bekannt für die Serin-Kinasen ERK und CDC2 (mod. nach Kordowska *et al.*, 2006)

4.3.3 Wachstumsfaktoren in der Tumorprogression

Die Progression von normalen Zellen zu malignen, invasiven und metastasierenden Zellen erfordert neben der veränderten Expression von CAMs und MMPs die Umgehung der wachstumshemmenden Signale. In einer proliferierenden Zelle bindet z.B. der EGF mit hoher Affinität an den Transmembranrezeptor (EGFR) an der Zelloberfläche und stimuliert so die intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität des Rezeptors. Die Tyrosin-Kinase-Aktivität initiiert wiederum eine Signal-Transduktions-Kaskade, die in einer Reihe von biochemischen Veränderungen in der Zelle resultiert. Viele Onkogene besitzen die Fähigkeit, die Wachstumssignale nachzuahmen, um so die Zellproliferation zu beschleunigen. In einer normalen Zelle sind antiproliferierende Signale für die Homöostase der Zelle verantwortlich.

Viele dieser wachstumsinhibierenden Signale kontrollieren den Übergang der Zelle von der G1-Phase in den Wachstumszyklus [Hanahan und Weinberg, 2000]. Auf molekularer Ebene werden viele wachstumsinhibierenden Signale über das Retinoblastomprotein (pRb) und dessen zwei Verwandte p107 und p130 vermittelt. Phosphoryliertes pRb stört die Zellproliferation durch die Inhibierung des E2F-Transkriptionsfaktors, welcher die Transkription von Genen kontrolliert, die für den Übergang der G1-Phase in die S-Phase von Bedeutung sind [Weinberg, 1995]. TGF- β (*transforming growth factor- β*) ist eines der am besten untersuchten Signalmoleküle, das in normalen Zellen dafür verantwortlich ist, dass pRb nicht phosphoryliert und damit inaktiviert wird. Derynck *et al.* [2007] haben zusammengefasst, dass in Tumorzellen von Brust, Darm, Lunge, Pankreas und Prostata [Levy *et al.*, 2006] generell mehr TGF- β exprimiert wird als in den entsprechenden normalen Zellen und dass TGF- β seine wachstumsinhibierende Funktion im fortgeschrittenen Tumor verliert, wodurch Wachstum, Invasion und Metastasierung der Zellen induziert werden.

In vielen normalen epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen vermittelt TGF- β die Arretierung der Zellen in der G1-Phase auch durch die Aktivierung der Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p21^{CIP1} und p27^{Kip1} [Massague, 2006] und die Inhibierung der Transkriptionsfaktoren Myc, Id1 und Id2. In den meisten Tumorzellen verhindern Mutationen in den *downstream* Effektoren des TGF- β -Signalweges, z.B. Smad, dass die CDK-Inhibitoren aktiviert, bzw. die Transkriptionsfaktoren inhibiert werden [Massague, 2006]. Neben dem Smad-Signalweg werden ebenfalls andere Signalwege durch den TGF- β -Rezeptor aktiviert, wie z.B. PI3K/AKT, Rho/Rac GTPasen, Ras/MAPK und TAK1/MEKK1/JNK und p38 (Abb. 4.6) [Derynck und Zhang, 2003; Moustakas und Heldin, 2005].

TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) konnte 1995 von Yamaguchi *et al.* als Mitglied der TGF-aktivierenden MAPK Kinase Kinase (MKKK) identifiziert werden. Die Aktivierung des TAK1-Proteins erfolgt durch die Phosphorylierung von zwei Threonin-Resten (Thr-184 und Thr-187) und einem Serin-Rest (Ser-192) [Kishimoto *et al.*, 2000]. Shibuya *et al.* [1996] konnten zeigen, dass TAK1 mit dem TAK1-bindenden Protein 1 (TAB1) interagiert, welches die Aktivität von TAK1 reguliert.

In mesangialen Zellen der Maus konnte beobachtet werden, dass die Blockade des TAK1-Signals durch dominant negative TAK1-Mutanten in einer Inhibierung der TGF- β -induzierten Aktivierung von MKK3 und p38 resultiert [Kim *et al.*, 2007]. Neil und Schiemann [2008] zeigten einen direkten Einfluss von TAK1 auf die Invasionsfähigkeit von Mammakarzinomzellen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TAK1 mit den I κ B-Kinase-Komplexen interagiert und diese auch aktiviert (z.B. IKK α , IKK β und IKK γ /NEMO), wodurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt wird [Sakurai *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 2002]. Eine Untersuchung an den hoch-invasiven MDA-MB-231- und an den wenig-invasiven MCF-7-Brustkrebszellen ergab, dass der *Toll-like receptor 2* (TLR2) in den MDA-MB-231-Zellen bis zu 10x höher exprimiert wird als in den MCF-7-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die TLR2-Aktivierung die Aktivität von NF κ B sowie die Phosphorylierung von TAK1 und I κ B α im TLR2/NF κ B-Signalweg in den MDA-MB-231-Zellen, nicht aber in den MCF-7-Zellen, erhöht sind. Weiterhin konnte ein Anstieg des IL-6-, TGF β -, VEGF- und MMP-9-Levels durch die TLR2-Aktivierung beobachtet werden [Xie *et al.*, 2009].

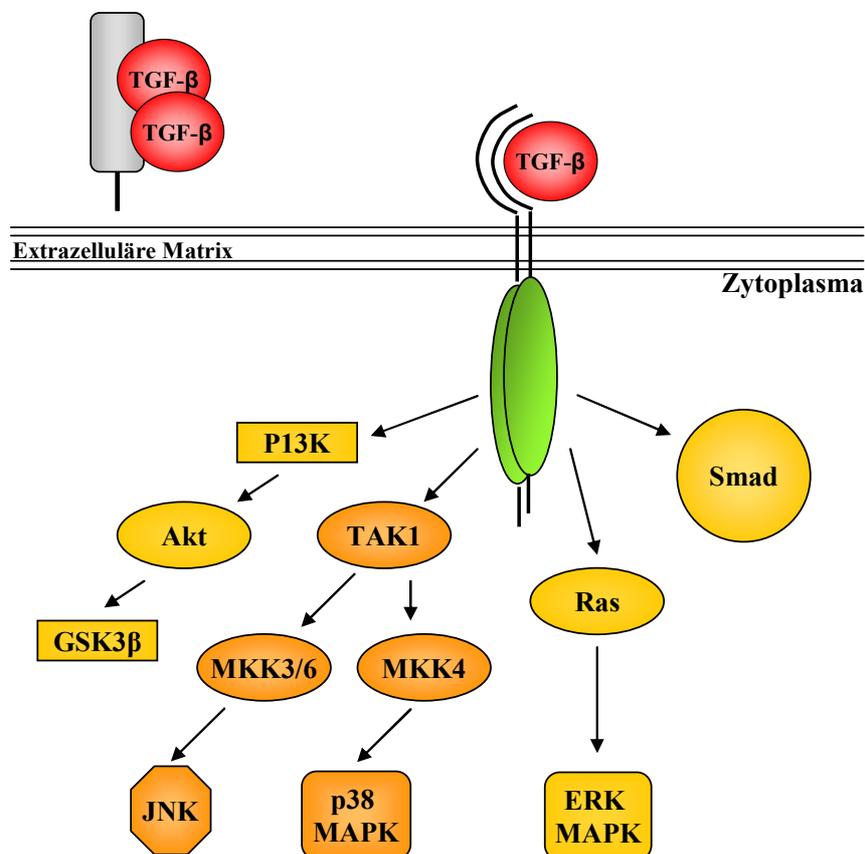


Abb. 4.6: Signalwege, die durch die Aktivierung des TGF- β -Rezeptors aktiviert werden. Mutationen in den *downstream*-Effektoren des TGF- β -Signalweges führen zur Aktivierung von Inhibitoren und damit zur Umgehung der wachstumsinhibierenden Signale während der Tumorphprogression.

4.4 LPXN im Netzwerk der progressionsrelevanten Moleküle

Im vorangegangenen Abschnitt wurden verschiedene Proteinfamilien, von denen bekannt ist, dass sie in die Tumorprogression involviert sind, beschrieben. Wie aber verhält sich LPXN in dem molekularen Netzwerk, welches die Tumorprogression beeinflusst? Hat LPXN einen direkten Einfluss auf Tumorinvasion und Metastasierung oder agiert es über Vermittler, deren Aktivitäten wesentlich von der Expression von LPXN abhängen, durch die die Progression beschleunigt wird?

In den vorliegenden *in vitro*-Studien an murinen Primärtumorzellen, die aus doppelt transgenen LPXN/TRAMP- und einfach transgenen TRAMP-Tumoren isoliert wurden, konnte gezeigt werden, dass LPXN die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen beschleunigt. Adapterproteine, wie LPXN, können direkt Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Integrine und Cadherine), zytoskelettale Proteine, Kinasen oder Phosphatasen rekrutieren und mit diesen interagieren, wodurch eine Verbindung zwischen der ECM und dem Aktin-Zytoskelett aufgebaut wird.

4.4.1 LPXN-vermittelte Progression durch Zelladhäsionsmoleküle

In den vorliegenden *in vitro*-Studien konnte durch immunzytochemische Analysen an PC-3- und DU 145-Zellen gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung der LPXN-Expression in einer Lokalisation von β -Catenin ausschließlich an der Zytoplasmamembran und in einer reduzierten Expression des β -Catenin Zielgens MMP-7 resultiert. Diese Zellen zeigen zusätzlich eine deutlich verminderte Aggressivität, d.h. Migrations- und Invasionsfähigkeit. Die Herunterregulierung der Expression des Zelladhäsionsmoleküls p120CTN resultiert hingegen in einer Lokalisation von β -Catenin im Kern und in einer verstärkten Expression von MMP-7, sowie in einer höheren Aggressivität der Zellen. Es ist davon auszugehen, dass LPXN keinen direkten Einfluss auf die Lokalisation von β -Catenin in der Zelle ausübt. Daher besteht die Möglichkeit, dass LPXN ausschließlich über die Regulation der p120CTN-Expression diesen Signalweg beeinflusst. Analysen des humanen p120CTN-Promotors, welcher putative Steroidhormonrezeptor-Bindungsstellen aufweist, von denen bekannt ist, dass LPXN diese aktivieren kann, blieben bisher jedoch ohne Ergebnis. Möglicherweise verläuft auch diese Regulation nicht direkt über LPXN, sondern über weitere

Transkriptionsfaktoren, welche durch LPXN vermittelt, einen negativen Einfluss auf die Transkription von p120CTN ausüben.

Zusätzlich zur veränderten Expression könnte LPXN die Aktivität von p120CTN auch über die Phosphorylierung, z.B. der SRC-Kinase beeinflussen: zum Einen ist bekannt, dass SRC ein Interaktionspartner von LPXN darstellt [Sahu *et al.*, 2007], und zum Anderen, dass p120CTN ein Substrat von SRC ist [Mariner *et al.*, 2001]. Diese Hypothese wird gestützt durch die Ergebnisse der Western Blot-Analyse, durch die gezeigt werden konnte, dass nach Herunterregulierung der LPXN-Expression in PC-3-Zellen die phosphorylierte Form der Mitglieder der SRC-Familie weniger stark exprimiert werden als in Kontrollzellen. Eine Überexpression von LPXN könnte demnach in einer verstärkten Phosphorylierung der Mitglieder der SRC-Familie und somit in einer verstärkten Phosphorylierung von p120CTN resultieren, wodurch die Cadherin-Catenin-Komplexe an der Zellmembran gelockert und degradiert werden. β -Catenin könnte in den Kern wandern und die Transkription von Zielgenen regulieren, die die Zellmigration fördern (Abb. 4.7).

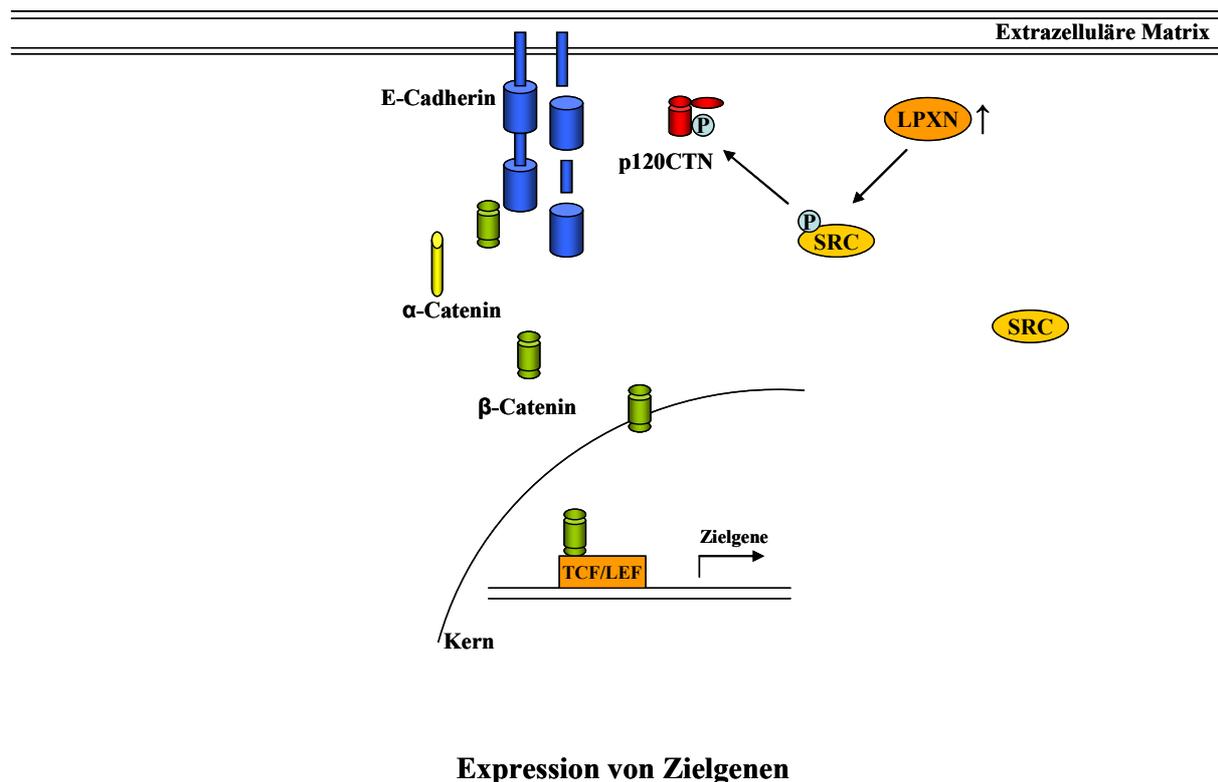


Abb. 4.7: Indirekte Regulation der Lokalisation von β -Catenin durch LPXN. Durch eine verstärkte Expression von LPXN könnte die SRC-Kinase vermehrt phosphoryliert werden, wodurch die Phosphorylierung von p120CTN stattfindet. Dies könnte in einer Lockerung des Cadherin-Catenin-Komplexes resultieren, wodurch β -Catenin in den Kern wandern könnte und dort die Transkription von Zielgenen, die in Zellmigration und Zellinvasion involviert sind, fördern.

In den vorgelegten *in vitro*-Studien konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von LPXN negativ mit der Expression von p120CTN korreliert. Mittels Western Blot-Analyse konnte diese Korrelation sowohl an etablierten PCa-Zelllinien, welche durch das TAT-Transduktion-System LPXN verstärkt repräsentieren, als auch an Prostatagewebe von LPXN/TRAMP-Mäusen sowie den daraus isolierten Primärtumorzellen nachgewiesen werden. Eine verminderte oder abnormale Expression von p120CTN in verschiedenen Tumorentitäten konnte bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet werden [Kallakury *et al.*, 2001a; Chetty *et al.*, 2008; Perez-Moreno *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009]. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein konditionaler *knockout* von p120CTN in der Bauchspeicheldrüse oder in der Haut von Mäusen zu einer Hyperproliferation der Zellen führt [Davis und Reynolds, 2006; Perez-Moreno *et al.*, 2006]. Einen Ansatz zur Erklärung, wie eine erhöhte LPXN-Expression und eine verminderte p120CTN-Expression den Effekt der verstärkten Tumorentität beeinflussen können, stellen die RhoGTPasen dar.

Wie bereits in 4.3.1 erwähnt, ist p120CTN in der Lage die Aktivität der Regulatoren der RhoGTPasen zu kontrollieren [Thoreson *et al.*, 2000] (Abb. 4.3), wobei eine verstärkte p120CTN-Expression in einer Aktivierung von Rac1 und einer Inhibierung von RhoA resultiert. Es konnte gezeigt werden, dass p120CTN die Aktivität von RhoA inhibiert, indem es die Dissoziation des GDP von inaktivem RhoA supprimiert [Anastasiadis *et al.*, 2000; Castano *et al.*, 2007; Yanagisawa *et al.*, 2008] oder indem es den negativen Regulator p190RhoGAP rekrutiert [Wildenberg *et al.*, 2006]. Durch einen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GST-Pulldown, bei dem die Aktivitäten von RhoA und Rac1 in Abhängigkeit von der LPXN-Expression analysiert wurden, konnte in PC-3-Zellen bei verminderter LPXN-Expression ebenfalls eine Aktivierung von Rac1 und eine Inhibierung von RhoA beobachtet werden. Im Rahmen der biologischen Dissertation von Frau Dr. Kaulfuß wurde bereits 2006 gezeigt, dass eine negative Korrelation der LPXN- und p120CTN-Expression auch nach Herunterregulierung der LPXN-Expression besteht.

Es besteht daher die Möglichkeit, dass durch die verstärkte Expression von LPXN im fortgeschrittenen Stadium des PCa die Expression von p120CTN herunterreguliert wird. Unabhängig voneinander könnten die verstärkte LPXN-Expression und die verminderte p120CTN-Expression die Aktivitäten der RhoGTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA kontrollieren, wodurch der Aufbau von Lamellipodien gefördert wird. Lamellipodien sind ausgedehnte, flache Fortsätze an der vorderen Seite der migrierenden Zelle, die mit einem großen Netzwerk an Aktin-Filamenten durchsetzt sind. Durch sie wird die Migrationsfähigkeit der Zelle bestimmt.

Neben dem Einfluss von LPXN auf die o.g. Signalwege, durch die Zellmigration und Zellinvasion während der Progression von Tumorzellen beeinflusst werden, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass LPXN die Zell-Matrix-Adhäsion beeinflusst. PC-3- und DU 145-Zellen, die eine verminderte LPXN-Expression aufweisen, zeigen im Zelladhäsions-Assay ein deutlich vermindertes Adhäsionspotential auf verschiedenen beschichteten Untergründen. Sowohl die Zellzahl als auch die Zellgröße der am Boden adhärierenden Zellen unterscheiden sich nach 1 h Adhäsionszeit in LPXN-defizienten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen um bis zu 50%. Neben einer verringerten Größe der *focal adhesion sites* konnten in Zellen mit LPXN *knockdown* weiterhin sog. „blebs“ beobachtet werden. „Blebs“ stellen Blasen in der Plasmamembran dar, die durch extrazelluläre Stimuli oder andere Signale hervorgerufen werden und einem strengen, hoch-dynamischen Zyklus folgen, der schätzungsweise 1 min andauert: eine schnelle Ausdehnung der Plasmamembran, eine kurze statische Phase und eine langsame Retraktion der Blasen bis zur Ausgangsmorphologie der Plasmamembran [Cunningham, 1995; Charras *et al.*, 2005]. Für MDA-MB-435-Mammakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass sie ihren Phänotyp verändern und Blasen bilden, wenn diese mit Matrigel in Berührung kommen [Kitzing *et al.*, 2007]. Fackler und Grosse [2008] haben zusammengefasst, dass eine verminderte Zell-Matrix-Adhäsion oder -Interaktion mit einem ansteigenden hydrostatischen Druck in der Zelle korreliert, wodurch die Blasenbildung der Plasmamembran kontrolliert wird. Verschiedene Experimente zur Induktion der Blasenbildung bei nicht-invasiven Zellen ergaben, dass diese die Fähigkeit in 3D-Matrizes zu invadieren erhöhen [Gadea *et al.*, 2007; Tournaviti *et al.*, 2007]. Die Blasenbildung wird daher als Fluchtmechanismus beschrieben, durch den die Zelle die Proteolyse der ECM umgeht [Sahai und Marshall, 2003; Friedl, 2004]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die LPXN-defizienten PCa-Zellen durch die Blasenbildung versuchen, die geringere Aktivierung der o.g. Signalwege zu umgehen. Normalerweise bilden invasive Zellen bei Kontakt mit einem ECM-Substrat, wie z.B. Fibronectin, Gelatine oder Collagen, Invadopodien aus, durch die der Kontakt zum Substrat hergestellt, die Sekretion von Proteasen aktiviert wird und ein lokaler Abbau der ECM stattfindet [Yamaguchi *et al.*, 2006; Linder, 2007]. Da die Aktin-Polymerisation eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Invadopodien spielt, die über Oberflächenrezeptoren, wie Integrine und Wachstumsfaktoren gesteuert wird [Yamaguchi *et al.*, 2005], besteht die Möglichkeit, dass durch den Verlust der LPXN-Expression diese Signaltransduktion gestört wird. Für LPXN konnte bereits gezeigt werden, dass es mit Integrin $\alpha 4$ interagiert, wobei der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist [Liu *et al.*, 2002]. Es wäre daher möglich, dass LPXN in den adhärierenden und

invasiven Zellen ausgehend von den Signalen der Integrine, Regulatoren rekrutiert, mit diesen interagiert und dadurch das Verhalten der Zelle verändert.

Durch einen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Invasionsassay mit verschiedenen Komponenten der ECM (Fibronectin, Collagen I, Collagen IV und Laminin) konnte gezeigt werden, dass LPXN-defiziente PCa-Zellen eine um bis zu 80% verringerte Invasionsfähigkeit aufweisen (Ergebnisse nicht gezeigt) [Kaulfuß *et al.*, 2009].

Im Zelladhäsions-Assay konnte weiterhin beobachtet werden, dass nach einer Adhäsionszeit von 24 h die Blasenbildung der Zellen mit LPXN *knockdown* nicht mehr zu erkennen ist. Dies bestätigt die Annahme, dass durch die Beschichtung der Objektträger, in denen die Zell-Adhäsions-Assays durchgeführt wurden, mit verschiedenen Komponenten der ECM (Collagen, Fibronectin, Gelatine, BSA) eine dünne 3D-Matrix entsteht, die die Zellen versuchen zu proteolysieren. Durch die Expression von LPXN könnten die oben beschriebene Bildung der Invadopodien und der Abbau der ECM viel effektiver stattfinden als in den LPXN-defizienten Zellen (Abb. 4.8). Interessant wäre zu untersuchen, ob ein Unterschied in der Zytoskelett-Struktur oder der Zellzahl nach 8 h noch zu erkennen ist. Weiterhin könnte eine Messung der Anzahl der Invadopodien Aufschluss darüber geben, ob LPXN tatsächlich einen direkten Einfluss auf die Ausbildung der Aktinstrukturen hat. Durch den Adhäsionsassay konnten weiterhin die oben beschriebenen Effekte auch auf Objektträgern beobachtet werden, die vorher nicht zusätzlich mit den Komponenten der ECM beschichtet wurden. Dies unterstützt die Hypothese, dass durch die verminderte LPXN-Expression nicht nur die Expression der MMPs verringert ist, sondern dass bereits der Signaltransduktionsapparat und die Bildung der Invadopodien, die die Zell-Matrix-Adhäsion vermitteln, gestört sind.

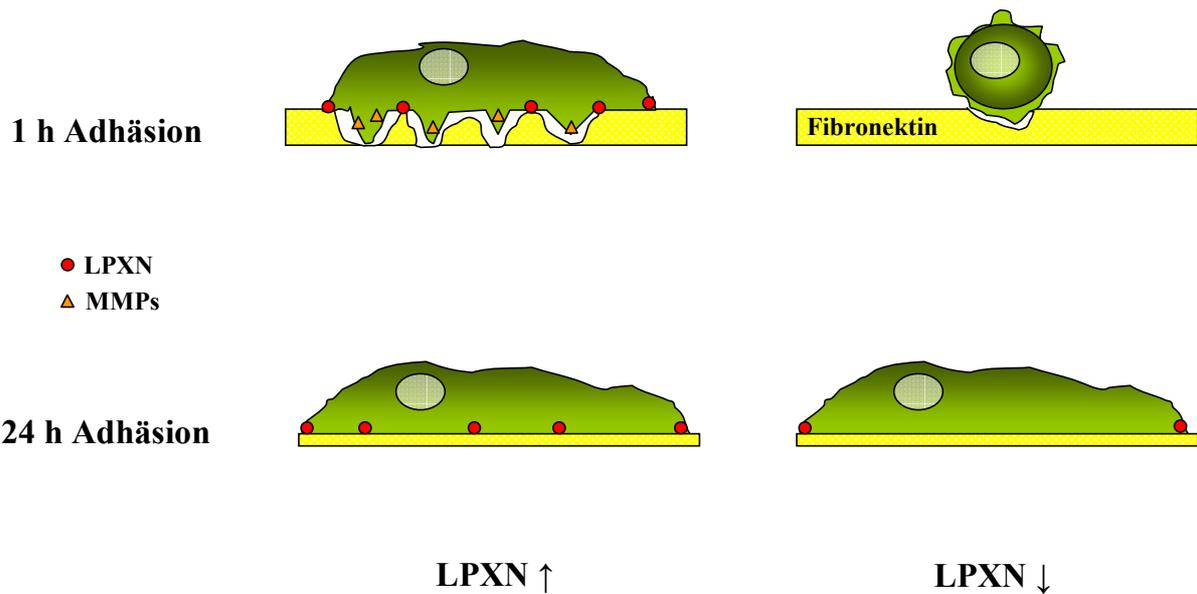


Abb. 4.8: Möglicher Mechanismus der LPXN-vermittelten Adhäsion auf Fibronektin-beschichteten Objektträgern. Durch die Expression von LPXN könnten der Kontakt der Zelle mit der ECM und der Abbau der ECM nach 1h Adhäsionszeit sehr viel effektiver funktionieren als in Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression. Diese Zellen umgehen den Verlust der LPXN-vermittelten Signaltransduktion durch die Blasenbildung. Nach einer Adhäsionszeit von 24 h unterscheiden sich die Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression in ihrer Größe und im Zytoskelett nicht mehr von den Kontrollzellen (LPXN↑).

4.4.2 LPXN-vermittelte Progression durch Caldesmon

Die durch LPXN-vermittelte verstärkte Progression von PCa-Zellen könnte auch durch das Aktin-bindende Protein Caldesmon reguliert werden. Caldesmon konnte 2007 als Interaktionspartner von LPXN identifiziert werden [Beckemeyer, 2007]. Durch einen Migrationsassay mit PC-3- und DU 145-Zellen konnte eine Involvierung von Caldesmon in die Migrationsfähigkeit von PCa-Zellen bestätigt werden. Nach Herunterregulierung der Caldesmon-Expression war im Vergleich zu Kontrollzellen eine erhöhte Migrationsfähigkeit der Zellen zu beobachten. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in PC-3-Zellen eine durch RNAi induzierte herunterregulierte LPXN-Expression in einer verminderten Serin-Phosphorylierung von Caldesmon an der Aminosäureposition 789 (h-Cald, entspricht Aminosäureposition 527 in l-Cald) resultiert. Wie bereits unter 4.3.2 beschrieben, führt die Phosphorylierung von Caldesmon zur Inaktivierung des Proteins,

wodurch Caldesmon von den Mikrofilamenten dissoziiert und die Lamellipodien neu gebildet werden können [Foster *et al.*, 2004; Kordowska *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass in Zellen mit einer geringen LPXN-Expression auch eine geringere Phosphorylierung von Caldesmon stattfindet. Die geringe Phosphorylierung äußert sich in einer starken Affinität von Caldesmon zu den Aktin-Filamenten und zu einer Inhibierung der Aktomyosin ATPase-Aktivität [Ngai und Walsh, 1984; Huber *et al.*, 1998], wodurch die Zelle nicht mehr in der Lage ist, neue Lamellipodien zu bilden und zu migrieren.

In einer LPXN-überexprimierenden Zelle könnte Caldesmon hingegen stark phosphoryliert werden. Dadurch wird Caldesmon inaktiviert, dissoziiert von den Aktin-Filamenten und stabilisiert die Bildung der Lamellipodien (Abb. 4.9). Es kommt zu einer verstärkten Migrationsfähigkeit der Zelle. Ob eine verstärkte Expression von LPXN in PCa tatsächlich in einer verstärkten Phosphorylierung von Caldesmon resultiert, wird z.Zt. in unserer Arbeitsgruppe überprüft.

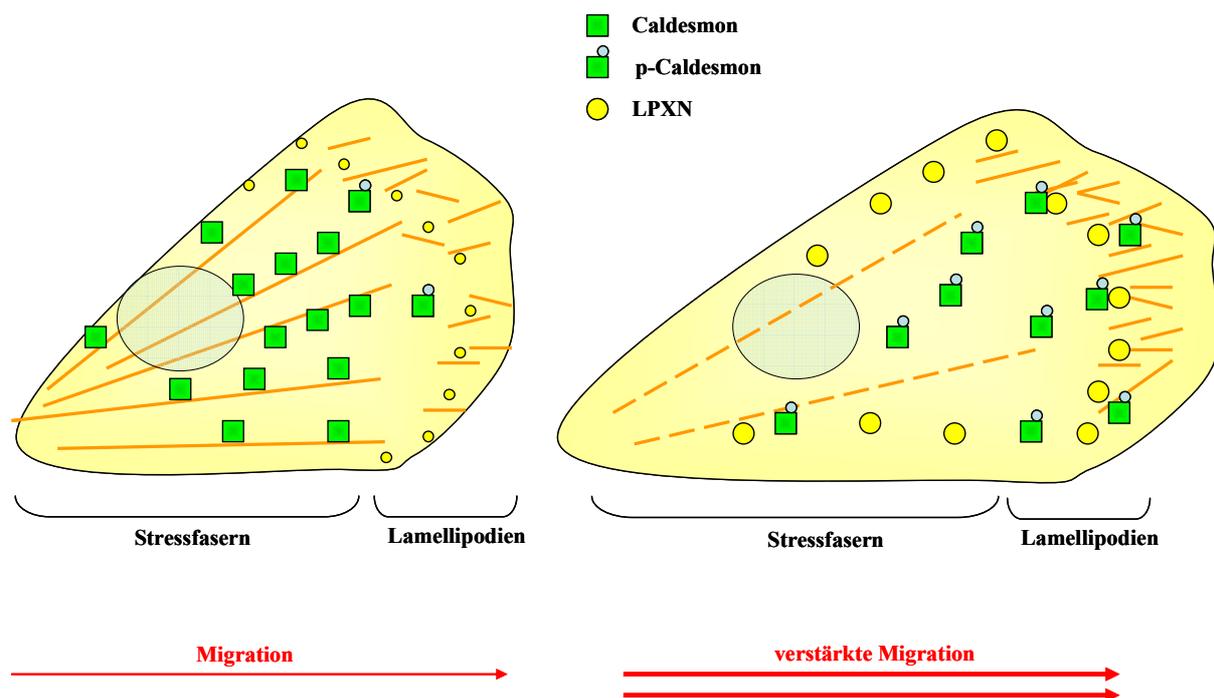


Abb. 4.9: Einfluss des Phosphorylierungsstatus von Caldesmon auf das Verhalten von Karzinomzellen. Durch die Expression von LPXN wird die Migrationsfähigkeit von PCa-Zellen erhöht. In einer Zelle mit geringer LPXN-Expression kann das Aktin-bindende Protein Caldesmon an den Stressfasern lokalisieren, wodurch die Aktivität der Aktomyosin ATPase inhibiert wird. Eine starke Expression von LPXN resultiert in den Zellen in einer verstärkten Interaktion von LPXN und Caldesmon und in einer verstärkten Phosphorylierung von Caldesmon, wodurch es inhibiert wird und von den Aktinfasern dissoziiert. Dadurch wird die Bildung von Lamellipodien begünstigt und die Zelle kann migrieren.

Wie bereits unter 4.3.2 erläutert, steht die Bildung der Invadopodien im direkten Zusammenhang mit der Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen [Bowden *et al.*, 2001; Linder *et al.*, 2007; Gimona *et al.*, 2008]. Yoshio *et al* [2007] konnten zeigen, dass die Überexpression von Caldesmon in einer reduzierten Degradation der ECM und der Inhibierung der Invasionsfähigkeit der Zellen resultiert. Es bleibt also zu prüfen, ob durch die LPXN-vermittelte Phosphorylierung von Caldesmon die Bildung der Invadopodien ansteigt, wodurch die Sekretion der MMPs ausgelöst wird. LPXN wäre dann nicht nur über den p120CTN- β -Catenin-MMP-7-Signalweg, sondern auch über den pCald-MMP-Signalweg in der Degradation der ECM und somit an der Migration und Invasion von Karzinomzellen beteiligt (Abb. 4.10).

Weiterhin bleibt zu prüfen, welche Kinasen für die LPXN-vermittelte Phosphorylierung von Caldesmon verantwortlich sind. Ein im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter Western Blot zur Identifizierung von Kinasen, welche die Aminosäure Serin an der Position 789 phosphorylieren können, blieb bisher ohne Ergebnis. In Nicht-Muskelzellen konnte bisher die Phosphorylierung von Caldesmon an dieser Stelle nur durch die Cdc2-Kinase [Yamashiro *et al.*, 1990, 1991] und durch ERK [Adam *et al.*, 1992; D'Angelo *et al.*, 1999] gezeigt werden, wobei die Phosphorylierung durch die Cdc2-Kinase einen größeren Effekt auf Caldesmon und die Aktin-Interaktion ausübt [Huang *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2004]. Im Rahmen der biologischen Dissertation von Frau Dr. Kaulfuß [2006] wurden Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von ERK in PCa-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression durchgeführt. Dabei konnte nur in den nicht-invasiven LNCaP-Zellen, nicht aber in den invasiven PC-3- und DU 145-Zellen, eine geringere Aktivität von ERK nach LPXN *knockdown* festgestellt werden. Chew und Lam [2007] konnten auch in B-Zellen keinen Einfluss von LPXN auf die Aktivität von ERK demonstrieren.

Weitere mögliche Kandidaten stellen die c-Jun NH₂-terminale Serinkinase JNK und die MAP-Kinase TAK1 dar. Für JNK konnte mittels Western Blot gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus nach Herunterregulierung der LPXN-Expression vermindert ist. Für TAK1 konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die Expression nach Herunterregulierung der LPXN-Expression reduziert ist. Der Einfluss von JNK und TAK1 auf den Phosphorylierungsstatus von Caldesmon wurde bis *dato* nicht untersucht.

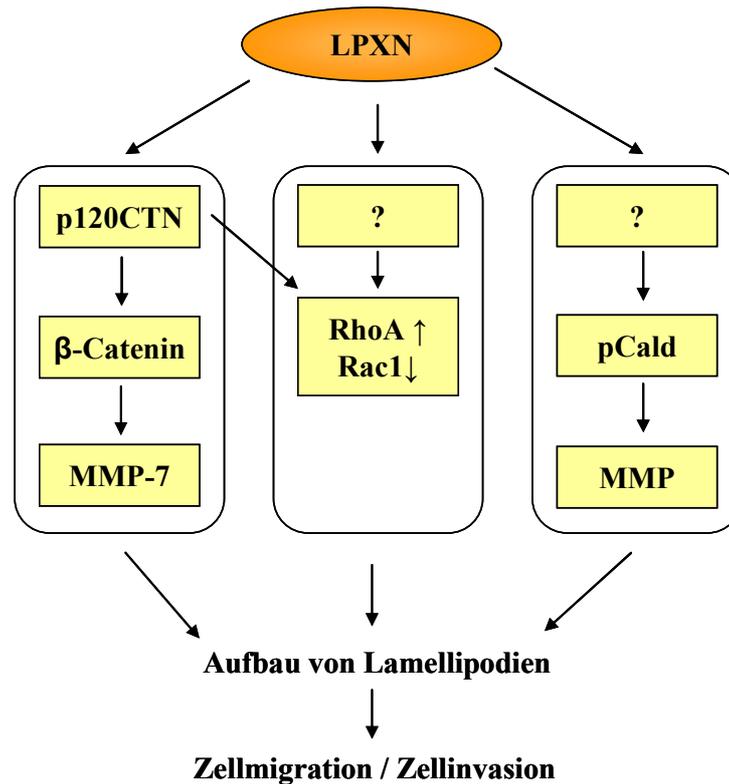


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Signalwege, durch die LPXN die Zellmigration und Zellinvasion beeinflussen könnte. Das Adapterprotein LPXN ist in der Lage durch die Veränderung der Expression, Aktivierung oder Phosphorylierung Signalwege anzuschalten. Für den p120CTN-β-Catenin-MMP-7-Signalweg, die Aktivierung von RhoA bzw. Inaktivierung von Rac1 und die Phosphorylierung von Caldesmon konnte der Einfluss von LPXN bereits gezeigt werden. Dadurch wird der Aufbau von Lamellipodien begünstigt, wodurch die Zellmigration und Zellinvasion gefördert werden.

4.4.3 Weitere LPXN-vermittelte Signalwege

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in einem Antikörper-Array eine herunterregulierte Expression der MAPKKK TAK1 in PC-3 Zellen mit LPXN *knockdown* nachgewiesen werden. Weiterführende Analysen mittels quantitativer *real time* PCR und Western Blot-Analyse konnten bestätigen, dass LPXN in den TAK1-JNK-ATF2-Presenilin1-Signalweg involviert ist. Es konnte z.B., wie bereits unter 4.4.2 erwähnt, gezeigt werden, dass bei herunterregulierter LPXN-Expression die Menge an phosphoryliertem JNK abnimmt. JNKs gehören zu der Familie der Serin/Threonin-MAP-Kinasen. Die Phosphorylierung eines konservierten Thr-X-Tyr-Motifs durch die MAPKK führt zur Aktivierung von JNK

[Davis, 2000]. Altan und Fenteany [2004] konnten in Säugerzellen zeigen, dass die Inhibierung des JNK-Signalweges die Migrationsfähigkeit der Zellen und die Bildung der Lamellipodien reduziert. Es besteht also die Möglichkeit, dass die LPXN-vermittelte verstärkte Progression des PCa auch durch die Aktivierung von JNK stattfindet. Ob eine erhöhte Expression von LPXN aber tatsächlich auch in einer Aktivierung von JNK resultiert und ob dadurch die Migrationsfähigkeit der Zellen spezifisch beeinflusst wird, wurde bis *dato* nicht geprüft. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass aktiviertes JNK β -Catenin phosphorylieren kann, wodurch die Zell-Zell-Adhäsion zerstört werden könnte [Lee *et al.*, 2009]. Der Einfluss von LPXN auf die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin könnte demnach nicht nur über die Expression von p120CTN, sondern auch über die Phosphorylierung von JNK stattfinden.

Für die Expression von Presenilin1 konnte mittels quantitativer *real time* PCR eine Korrelation mit der Expressionsstärke von LPXN sowohl in LPXN-defizienten PCa-Zellen als auch in LPXN-überexprimierenden Primärzellen gefunden werden. Presenilin1 wurde ursprünglich als ein Protein beschrieben, welches in die Pathogenese von Alzheimer involviert ist [Tanzi, 2008]. Baki *et al.* [2001] konnten zeigen, dass Presenilin1 an der Plasmamembran mit dem Cadherin/Catenin-Zelladhäsionskomplex interagiert und die Assoziation von E-Cadherin und β -Catenin stabilisiert. In Wildtyp- und Presenilin1 *knockout* Zellen konnte beobachtet werden, dass ein Anstieg des Presenilin1-Levels die p120CTN/E-Cadherin-Bindung inhibiert, wohingegen ein Anstieg des p120CTN-Levels die Presenilin1/E-Cadherin-Bindung inhibiert. Ob dieser Effekt auch direkt durch die Expression von LPXN reguliert werden kann, bleibt zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Identifizierung von weiteren durch LPXN deregulierten Signalwegen ein *whole genome* Microarray mit Prostatatumormaterial von LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäusen durchgeführt. Dabei wurden Hopx und Cbs als LPXN-vermittelte deregulierte Gene identifiziert. Yamaguchi *et al.* [2009] beschreiben Hopx als Suppressor von Zervixkarzinomen. In dieser Studie konnte auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass die Mehrheit von 28 untersuchten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe eine reduzierte Hopx-Expression aufweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Methylierung der Hopx-Promotorregion ein Marker für die Aggressivität des Tumors ist [Yamaguchi *et al.*, 2009; Ooki *et al.*, 2010]. In dem von uns durchgeführten *whole genome* Microarray konnte die Expression von Hopx jedoch als ein um den Faktor 1,65 hochreguliertes Gen in den doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Tumoren identifiziert werden. Dabei ist zu beachten, dass sich der Wert aus dem Mittelwert der Genexpression der Tumore

von drei doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen im Vergleich zu drei einfach transgenen TRAMP-Mäusen ergab. Weiterhin lag die Wahrscheinlichkeit für ein falsch positives Ergebnis bei 71,54%. Für die Überprüfung der Array-Daten durch eine quantitative *real time*-PCR wurden dieselben cDNAs verwendet wie für den Array. Um die Expression von Hopx eindeutig in Korrelation mit der LPXN-Expression im Tumorgewebe zu bringen, müsste weiteres Gewebematerial analysiert werden. Eine zusätzliche Schwäche des Arrays besteht darin, dass zwar die Tumorgöße (100-150 mm³) und die Histopathologie (schlecht differenzierter Tumor) von allen untersuchten Tumoren identisch waren, dennoch das genaue Progressionsstadium nicht zu erkennen war. Zur Optimierung des Arrays ist in unserer Arbeitsgruppe geplant, mittels Mikrodissektion nur die jeweiligen Anfangsstadien (PIN und gut differenziertes Tumorgewebe) des PCa von beiden Versuchstiergruppen zu analysieren. Die Expression der Cystathionin beta-synthase (Cbs) wurde in dem Microarray als um den Faktor 0,84 herunterreguliertes Gen in den doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Tumoren im Vergleich zu den einfach transgenen LPXN-Tumoren identifiziert. Expressionsstudien an Lebertumoren konnten darlegen, dass eine reduzierte Cbs-Expression signifikant mit dem Tumorigrad und der Überlebenswahrscheinlichkeit des Patienten korreliert [Kim *et al.*, 2009].

4.5 Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit konnte LPXN eindeutig als ein Protein identifiziert werden, welches die Progression von sowohl androgen-abhängigen als auch androgen-unabhängigen PCa beschleunigt. Die gewonnenen *in vitro*-Daten konnten darlegen, dass LPXN in verschiedene, miteinander vernetzte Signalwege involviert ist, durch die Zelladhäsion, Zellmigration und Zellinvasion beschleunigt werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass LPXN noch weitere Gene, z.B. Tumorsuppressorgene, Wachstumsfaktoren und Cytokine während der Entwicklung zum aggressiven, metastasierenden PCa beeinflusst. Diese gilt es zu identifizieren, um gezielt Aussagen über die Funktion von LPXN als putativen Progressionsmarker zu formulieren. Die bestehenden LPXN/TRAMP-Mäuse stellen ein hervorragendes Modell zur Untersuchung von deregulierten Genen während der Progression des PCa dar. Eine Optimierung des bereits durchgeführten *whole genome* Microarrays, die Analyse nur der jeweiligen Anfangsstadien (PIN oder gut differenziertes Tumorgewebe) des PCa von beiden Versuchstiergruppen mittels Mikrodissektion (siehe auch 4.4.3), könnten weitere Hinweise auf Gene geben, die *in vivo* das aggressive Verhalten der Zellen

beeinflussen. Außerdem bieten die aus den murinen Tumoren isolierten Primärzellen für die weiteren Analysen von LPXN ein gutes *in vitro*-Modell. Alle Erkenntnisse zur Charakterisierung der LPXN-vermittelten Signalwege, die aus den durchgeführten Arrays gewonnen werden konnten, können in den Primärzellen bestätigt und verifiziert werden, da sie eine ideale Verbindung zwischen dem Mausmodell und dem *in vitro*-Modell darstellen. Eine Charakterisierung der Chromosomen der Primärzellen der LPXN/TRAMP- und TRAMP-PCa ergab ein diffuses Bild an chromosomalen Veränderungen, einschließlich von Robertson'schen Translokationen, Verlust oder Zugewinn von (Geschlechts-)Chromosomen und großen Deletionen/Duplikationen (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch humane maligne Tumoren sind genetisch instabil und weisen daher häufig chromosomale Störungen auf. Die Zahl der chromosomalen Veränderungen nimmt im Verlauf der Tumorprogression zu. Je ausgeprägter die Chromosomenaberrationen in einem humanen PCa sind, desto höher ist der Malignitätsgrad [Koss, 2005]. Durch die Isolierung und die Chromosomenanalyse weiterer muriner Primärzellen aus den LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäusen der gleichen Passage könnte ein Zusammenhang zwischen der LPXN-Überexpression und der Akkumulation von bestimmten chromosomalen Veränderungen gefunden werden. Daraus könnten dann evtl. Rückschlüsse auf deregulierte Onkogene und/oder Tumorsuppressorgene gezogen werden. Für das Protoonkogen *Myc* konnte z.B. gezeigt werden, dass es auf dem langen Arm des Chromosoms 8 lokalisiert ist und somatische Amplifikationen dieses DNA-Abschnitts zu den häufigsten Ereignissen im Prostatatumor gehören [van Duin *et al.*, 2005].

Mit diesem Wissen könnten dann auch therapierelevante *in vivo*-Untersuchungen vorgenommen werden, die z.B. den Einfluss der LPXN-Hemmung auf die Progression von bestehenden PCa analysieren. Eine Injektion von isolierten humanen Primärzellen unter die Haut von Nacktmäusen und die anschließende Herunterregulierung der LPXN-Expression mittels siRNA in den PCa-Xenografts könnten Hinweise auf Therapiemöglichkeiten geben. Bei einem positiven Ansprechen der PCa-Zellen auf die LPXN-siRNA und die damit verbundene Reduktion des PCa, wäre es weiterhin interessant, den genauen Zeitpunkt des Ansprechens festzustellen. Es ist bekannt, dass LPXN nicht an der Initiation des PCa beteiligt ist. Ob durch eine Reduktion der LPXN-Expression jedoch bereits der lokale Primärtumor eingegrenzt werden kann oder ob nur der Übergang vom lokalen PCa zum invasiven und metastasierenden PCa inhibiert werden kann, bleibt zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die durch LPXN deregulierten Gene, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnten, auf Therapieansätze zu prüfen. Z.B. konnten Hinweise für einen Zusammenhang von LPXN und den Signalwegen, die durch β -Catenin und den

SRC-Kinasen vermittelt werden, gefunden werden. Lu *et al.* [2009] konnten zeigen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch den Inhibitor PKF118-310 in den PCa-Zellen PC-3 und DU 145 inhibiert werden kann. Weiterhin konnten Yu *et al.* [2009] demonstrieren, dass 44% der untersuchten PCa-Patienten, die mit Dasatanib, dem Inhibitor der SRC-Kinasen, behandelt wurden, bereits nach 12 Wochen keine weitere Progression des Tumors mehr aufwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass LPXN an der Progression von androgen-unabhängigen Tumoren beteiligt ist. Kaulfuß *et al.* konnten bereits 2008 sowohl eine Interaktion als auch eine Transaktivierung des AR durch LPXN beobachten. Obwohl es schon mehrere Erkenntnisse über das androgen-unabhängige, zum Tode des Patienten führende Wachstum von PCa gibt, konnten bisher keine wirklich hilfreichen Therapieansätze für Patienten entwickelt werden. Daher erscheint es sinnvoll, umfangreichere Daten, sowie *follow up*-Daten über die Expression von LPXN im humanen PCa zu sammeln und zu analysieren. Eine (Über-)expression von LPXN in Biopsie-Material von sowohl androgen-abhängigen als auch androgen-unabhängigen Tumoren könnte darauf hindeuten, dass sich ein Tumor besonders aggressiv und progressiv verhalten wird, woraufhin der Patient mit einer intensiven Therapie behandelt werden muss. Dafür wäre jedoch die Gegenüberstellung von einer genügend großen Anzahl von Patienten mit einem schlechten Verlauf der Krankheit (Metastasierung, Rezidiv, Tod) und einem milden Verlauf der Krankheit (Heilung, Überleben) notwendig. Anschließend könnte die Frage beantwortet werden, ob und zu welchem Zeitpunkt die Expression von LPXN in den Tumoren erhöht ist und welche morphologischen sowie pathologischen Veränderungen daraus resultieren.

Die parallele Untersuchung der LPXN-abhängigen Expression von anti-apoptischen Genen wie z.B. BCL-2, welche bereits in einen Zusammenhang mit der Entwicklung von androgen-unabhängigen PCa gestellt wurden, stellt einen Ansatz für die weitere Analyse dar. In der Komplexität des PCa erscheint es dennoch utopisch, LPXN als ein Gen zu charakterisieren, welches auf den gesamten Tumorverlauf Einfluss nimmt. Vielmehr ist es das Ziel, die einzelnen Funktionen von LPXN in der Gesamtheit des PCa zu identifizieren, um so *up*- und *downstream*-stehende Gene zu ermitteln, durch die Therapieverfahren entwickelt werden könnten.

Die in dem Antikörper-Array ermittelten deregulierten Gene nach Herunterregulierung der LPXN-Expression umfassen interessante Kinasen, wie z.B. TAK1 und Yes und Rezeptoren, wie z.B. den EGFR. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Expression des Cytokins IL-6 nach LPXN *knockdown* herunterreguliert ist (Ergebnisse nicht gezeigt). Viele neuere Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen konnten eine pathogene Rolle für TAK1, Yes und IL-

6 in der Progression von PCa bestätigen [Cavaretta *et al.*, 2007; Neil und Schiemann, 2008; Malinowska *et al.*, 2009; Santer *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010]. Diese Gene bieten daher gute Möglichkeiten, weitere Signalwege, in die LPXN involviert ist, sowie Ansatzpunkte, für eine relevante Therapie für Patienten mit einem PCa zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Leupaxin (LPXN) stellt ein zytoskelettales Adapterprotein der Paxillin-Protein-Familie dar, dessen Expression direkt mit dem Gleason Score von humanen PCa korreliert [Kaulfuß *et al.*, 2008]. In der vorliegenden Arbeit wurde LPXN durch *in vivo*-Experimente bei doppelt transgenen LPXN/TRAMP-Mäusen als ein Protein identifiziert, welches das Wachstum von bestehenden TRAMP-Tumoren sowie von Fernmetastasen beschleunigt. Parallel dazu durchgeführte *in vitro*-Studien an Primärzellen, welche aus den Tumoren der LPXN/TRAMP-Tumoren isoliert wurden, haben ergeben, dass durch die Überexpression von LPXN sowohl die Migrations- als auch die Invasionsfähigkeit der LPXN/TRAMP-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen drei- bzw. zweifach erhöht ist. Um die Frage zu beantworten, wie LPXN die Progression von PCa beeinflusst, wurde der Zusammenhang zwischen der LPXN-Expression und der Expression des Zelladhäsionsmoleküls p120CTN näher untersucht. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* resultiert eine Überexpression von LPXN in einer reduzierten Expression von p120CTN. Studien an den etablierten humanen PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145 zeigten außerdem, dass diese nach Herunterregulierung der p120CTN-Expression eine erhöhte Migrations- und Invasionsfähigkeit im Vergleich zu Kontrollzellen aufweisen. Eine Herunterregulierung der LPXN-Expression resultierte hingegen in einer verminderten Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen. Die simultane Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN-Expression resultierte in einer Aufhebung der Einzel-Effekte. Da bekannt ist, dass p120CTN für die Stabilität des Cadherin-Catenin-Komplexes an der Zellmembran verantwortlich ist [Maeda *et al.*, 2006], wurde die subzelluläre Lokalisation von β -Catenin und die Expression des β -Catenin-Zielgens MMP-7 in PC-3-Zellen nach Herunterregulierung der LPXN- und p120CTN-Expression untersucht. Der *knockdown* der LPXN-Expression resultierte in einer Lokalisation von β -Catenin an der Zellmembran sowie in einer Reduktion der MMP-7-Expression, während der *knockdown* der p120CTN-Expression eine Lokalisation von

β -Catenin im Kern und eine erhöhte MMP-7-Expression zur Folge hatte. Der simultane *knockdown* der LPXN- und p120CTN-Expression ergab wiederum eine Aufhebung der Einzel-Effekte. Somit konnte p120CTN als Vermittler der LPXN-induzierten Zellmigration und Zellinvasion charakterisiert werden.

Zur Identifizierung von weiteren LPXN-vermittelten Signalwegen, durch die die verstärkte Progression der LPXN-überexprimierenden PCa erklärt werden könnte, wurde zum Einen ein

whole genome Microarray an Prostatamaterial von LPXN/TRAMP- und TRAMP-Mäusen und zum Anderen ein Antikörper-Array an PC-3-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression durchgeführt. Die Auswertung des *whole genome* Microarrays ergab eine herunterregulierte Expression der Cystathione-beta-Synthase (Cbs) und eine hochregulierte Expression von HOP homeobox (Hopx) im Tumormaterial von LPXN/TRAMP-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Durch den Antikörper-Array wurden die Kinasen TAK1 und Yes als herunterregulierte Gene nach LPXN-*knockdown* identifiziert. Die weitere Analyse der TAK1-vermittelten Signalwege ergab, dass in PC-3-Zellen abhängig von der Stärke der LPXN-Expression auch der Phosphorylierungsstatus der *downstream* von TAK1 stehenden Kinase JNK zunimmt. Die daraufhin durchgeführte Expressionsanalyse der TAK1-JNK-ATF-2-Zielgene Maspin und Presenilin1 ergab in PCa-Zellen mit herunterregulierter LPXN-Expression eine signifikante Herunterregulierung der Maspin- und Presenilin1-Expression. Eine Analyse des Phosphorylierungsstatus der Kinasen der SRC-Familie ergab weiterhin, dass eine verminderte LPXN-Expression auch eine reduzierte Phosphorylierung und damit eine reduzierte Aktivität dieser Kinasen zur Folge hat.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion von LPXN und dem Aktin-bindenden Protein Caldesmon, welches bereits mit der Invasionsfähigkeit von Karzinomzellen in Verbindung gebracht wurde [Yoshio *et al.*, 2007], verifiziert und weiter analysiert. In PC-3-Zellen wurde subzellulär eine Lokalisation von Caldesmon an den F-Aktin-Fasern sowie eine Kollokalisierung von LPXN und Caldesmon an den *focal adhesion sites* beobachtet. Nach Herunterregulierung der Caldesmon-Expression wurde in PC-3- und DU 145-Zellen eine erhöhte Migrations- und Invasionsfähigkeit, jedoch keine veränderte Proliferation der Zellen nachgewiesen. Die LPXN-Expression nimmt keinen Einfluss auf die Expression von Caldesmon, sondern ausschließlich auf dessen Phosphorylierungsstatus. Eine verminderte LPXN-Expression korrelierte mit einer verringerten Phosphorylierung von Caldesmon, was zu einer Reduktion der Migrationsfähigkeit der PCa-Zellen führte.

Da die Progression von Karzinomen weitgehend von den adhäsiven Eigenschaften der Zellen abhängt, wurde weiterhin im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss LPXN auf das Adhäsionsverhalten der PCa-Zellen ausübt. Die etablierten PCa-Zelllinien PC-3 und DU 145 mit herunterregulierter LPXN-Expression sowie die murinen LPXN/TRAMP-Primärzellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen in Abhängigkeit der LPXN-Expression eine veränderte Adhäsionsfähigkeit sowie Ausbreitung. Da bei der für die Adhärenz und Ausbreitung der Zellen notwendigen Umstrukturierung des Zytoskeletts vor allem die Familie der kleinen Rho-GTPasen eine Rolle spielen, wurden die Aktivitäten von RhoA und Rac1 in

PC-3-Zellen mit verminderter LPXN-Expression bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass bei verminderter LPXN-Expression eine verringerte RhoA- und eine verstärkte Rac1-Aktivität zu verzeichnen ist.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit LPXN als ein Protein identifiziert werden, welches die Progression von PCa verstärkt. Verschiedene ermittelte LPXN-abhängige Signalwege geben Erklärungen für diese verstärkte Progression sowie Hinweise auf mögliche Therapieansätze für Patienten mit einem PCa.

6 Literaturverzeichnis

Abate-Shen C and Shen MM (2000). “Molecular genetics of prostate cancer.” *Genes Dev* **14**(19): 2410-2434

Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K (1999). “Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers.” *Gut* **45**: 252–258

Adam LP, Gapinski CJ, Hathaway DR (1992). “Phosphorylation sequences in h-caldesmon from phorbol ester-stimulated canine aortas.” *FEBS Lett* **302**(3): 223-226

Adler HL, McCurdy MA, Kattan MW, Timme TL, Scardino PT, Thompson TC (1999). “Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma.” *J Urol* **161**(1): 182-187

Altan ZM and Fenteany G (2004). “c-Jun N-terminal kinase regulates lamellipodial protrusion and cell sheet migration during epithelial wound closure by a gene expression-independent mechanism.” *Biochem Biophys Res Commun* **322**(1): 56-67

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). “Basic local alignment search tool.” *J Mol Biol* **215**(3): 403-410

Anastasiadis PZ, Moon SY, Thorensen MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB (2000). “Inhibition of RhoA by p120 catenin.” *Nat Cell Biol* **2**: 637-644

Anastasiadis PZ (2007). “p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases.” *Biochim Biophys Acta* **1773**(1): 34-46

Baki L, Marambaud P, Efthimiopoulos S, Georgakopoulos A, Wen P, Cui W, Shioi J, Koo E, Ozawa M, Friedrich VL Jr, Robakis NK (2001). “Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex.” *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(5): 2381-2386

Beckemeyer S (2007). “Analysen von Leupaxin und seiner Interaktionspartner auf das Progressionsverhalten von Prostatakarzinomzellen” Institut für Humangenetik, Georg-August-Universität, Göttingen.

Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H (1994). “E-Cadherin gene mutation provide clues to diffuse type gastric carcinomas.” *Cancer Res.* **54**: 3845-3852

Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF (2001). “TAT-mediated protein transduction into mammalian cells.” *Methods* **24**(3): 247-56

Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W (1989). “Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion.” *J Cell Biol* **108**: 2435-2447

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996). “Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1.” *Nature* **382**(6592): 638-642

Berx G and Van Roy F (2001). “The E-Cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression.” *Breast cancer Res* **3**: 289-293

Bienz M and Clevers H (2000). “Linking colorectal cancer to Wnt signaling.” *Cell* **103**: 311-320

Birchmeier W and Behrens J (1994). “Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.” *Biochim Biophys Acta* **1198**: 11-26

Bogenrieder T and Herlyn M (2003). “Axis of evil: Molecular mechanisms of cancer metastasis.” *Oncogene* **22**: 6524-6536

Bolon I, Devouassoux M, Robert C, Moro D, Brambilla C, Brambilla E (1997). “Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas.” *Am J Pathol* **150**: 1619-1629

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC (1996). „How tumors become angiogenic.” *Adv Cancer Res* **69**: 135-174 Review

Bowden ET, Coopman PJ, Mueller SC (2001). “Invadopodia: unique methods for measurement of extracellular matrix degradation in vitro.” *Methods Cell Biol* **63**: 613-627

Bradford MM (1976). “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.” *Anal Biochem* **72**: 248-254

Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W (2006). “Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin.” *Curr Opin In Genetics & Development* **16**: 51–59

Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA, Franklin WA (2002). “High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer.” *J Clin Oncol* **20**(10): 2417-2412

Brown MC, Curtis MS, Turner CE (1998). “Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains.” *Nat Struct Biol.* **5**: 677-678

Brown MC, Perrotta JA, Turner CE (1998b). “Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding.” *Mol Biol Cell* **9**: 1803-1816

Brown S, Coghill ID, McGrath MJ, Robinson PA (2001). “Role of LIM domains in mediating signaling protein interactions.” *IUBMB Life* **51**(6): 359-364 Review.

Bryant DM and Stow JL (2004). “The ins and outs of E-cadherin trafficking.” *Trends Cell Biol* **14**: 427-434

Caca K, Kolligs FT, Ji X, Hayes M, Qian J, Yahanda A, Rimm DL, Costa J, Fearon ER (1999). “Beta- and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer.” *Cell Growth Differ* **10**: 369-376

Castano J, Solanas G, Casagolda D, Raurell I, Villagrasa P, Bustelo XR, Garcia de Herreros A, Dunach M (2007). “Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA.” *Mol Cell Biol* **27**: 1745-1757

Catz SD and Johnson JL (2003). “BCL-2 in prostate cancer: a minireview.” *Apoptosis* **8**(1): 29-37

Cavarretta IT, Neuwirt H, Untergasser G, Moser PL, Zaki MH, Steiner H, Rumpold H, Fuchs D, Hobisch A, Nemeth JA et al. (2007). “The antiapoptotic effect of IL-6 autocrine loop in a cellular model of advanced prostate cancer is mediated by Mcl-1.” *Oncogene* **26**: 2822–2832

Charras GT, Yarrow JC, Horton MA, Mahadevan L, Mitchison TJ (2005). “Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells.” *Nature* **435**: 365-369

Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG and Sawyers CL (2004). “Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy.” *Nat Med* **10**: 33-39

Chen WT, Chen JM, Parsons SJ, Parsons JT (1985). „Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src.” *Nature* **316**: 156-158

Chetty R, Jain D, Serra S (2008). “p120 catenin reduction and cytoplasmic relocalization leads to dysregulation of E-cadherin in solid pseudopapillary tumors of the pancreas.” *Am J Clin Pathol* **130**(1): 71-76

Chew V and Lam K-P (2007). “Leupaxin negatively regulates B cell receptor signaling.” *J Biol Chem* **282**(37): 27181-27191

Cogoni C and Macino G (2000). "Post-transcriptional gene silencing across kingdoms." *Curr Opin Genet Dev* **10**(6): 638-643

Cohen MB, Griebelin TL, Ahgotu CA, Rokhlin OW, Ross JS (1997). “Cellular adhesion molecules in urologic malignancies.” *Amer J Clin Path* **107**(1): 56-63

Cunningham CC (1995). “Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing.” *J Cell Biol* **129**: 1589-1599

D'Angelo G, Graceffa P, Wang CA, Wrangle J, Adam LP (1999). “Mammal-specific, ERK-dependent, caldesmon phosphorylation in smooth muscle. Quantitation using novel anti-phosphopeptide antibodies.” *J Biol Chem* **274**(42): 30115-30121

Dai HP, Xue YQ, Zhou JW, Li AP, Wu YF, Pan JL, Wang Y, Zhang J (2009). “LPXN, a member of the paxillin superfamily, is fused to RUNX1 in an acute myeloid leukemia patient with a t(11;21)(q12;q22) translocation.” *Genes Chromosomes Cancer* **48**(12): 1027-1036

Davis RJ (2000). “Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.” *Cell* **103**(2): 239-252 Review

Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003). “A core function for p120-catenin in cadherin turnover” *J Cell Biol* **163**: 525-534

Davis MA and Reynolds AB (2006). “Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland. *Dev Cell* **10**: 21-31

DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM (1988). “SV40 large timor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene.” *Cell* **17**: 275-283

De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS (1998). “Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells.” *J Urol* **160**(6 Pt 2): 2381-2392

Derynck R and Akhurst RJ (2007). “Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease.” *Nat Cell Biol* **9**(9): 1000-1004

Derynck R and Zhang YE (2003). “Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.” *Nature* **425**(6958): 577-584

Derksen PW, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, van Beijnum JR, Griffioen AW, Vink J, Krimpenfort P *et al.* (2006). “Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis.” *Cancer Cell* **10**(5): 437-449

-
- Downing JR and Reynolds AB (1991).** “PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a pp60src transformation-associated substrate” *Oncogene* **6**(4): 607-613
- Drachenberg DE, Elgamal AA, Rowbotham R, Peterson M, Murphy GP (1999).** “Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer.” *Prostate* **41**(2): 127-133
- Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. (1999).** „Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells.” *Clin Exp Metastasis* **17**: 27-34
- Edwards J and Bartlett JM (2005a).** “The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor.” *BJU Int* **95**(9): 1320-1326
- Edwards J and Bartlett JM (2005b).** “The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways.” *BJU Int* **95**(9): 1320-1326
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a).** "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* **411**(6836): 494-498
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001b).** "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* **15**(2): 188-200
- Etienne-Manneville S (2004).** “Cdc42--the centre of polarity.” *J Cell Sci.* **117**(Pt 8): 1291-1300
- Fackler OT and Grosse R (2008).** “Cell motility through plasma membrane blebbing.” *J Cell Biol* **181**(6): 879-884
- Fini ME, Cook JR, Mohan R, Brinckerhoff CE (1998).** “Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.” *Academic Press* 300–356

-
- Friedl P (2004).** "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration." *Curr Opin Cell Biol* **16**(1): 14-23
- Fujimoto N, Yeh S, Kang HY, Inui S, Chang HC, Mizokami A, Chang C (1999).** "Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate." *J Biol Chem* **274**(12): 8316-8321
- Fujimoto N, Miyamoto H, Mizokami A, Harada S, Nomura M, Ueta Y, Sasagui T, Matsumoto T (2007).** "Prostate cancer cells increase androgen sensitivity by increase in nuclear androgen receptor and androgen receptor coactivators; a possible mechanism of hormone-resistance of prostate cancer cells." *Cancer Invest.* **25**(1): 32-37
- Foster DB, Huang R, Hatch V, Craig R, Graceffa P, Lehman W, Wang CLA (2004).** "Modes of caldesmon binding to actin: sites of caldesmon contact and modulation of interactions by phosphorylation." *J Biol Chem* **279**(51): 53387-53394
- Fujimoto N, Yeh S, Kang HY, Inui S, Chang HC, Mizokami A, Chang CJ (1999).** "Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate." *Biol Chem* **274**(12): 8316-8321
- Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K (2003).** „Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." *Curr Opin Cell Biol* **15**(5): 590-597 Review
- Gaddipati JP, McLeod DG, Heidenberg HB, Sesterhenn IA, Finger MJ, Moul JW, Srivastava S (1994).** "Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers." *Cancer Res* **54**: 2861–2864
- Gadea G, de Toledo M, Anguille C, Roux P (2007).** "Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices." *J Cell Biol* **178**(1): 23-30
- Gershoni JM and Palade GE (1982).** "Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter." *Anal Biochem* **124**(2): 396-405
- Gershoni JM and Palade GE (1983).** "Protein blotting: principles and applications." *Anal Biochem* **131**(1): 1-15

Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ, Klebe RJ (1998). “Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells.” *Matrix Biol* **16**(8): 483-496

Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM, Greenberg NM (1996). “Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse.” *Cancer Res* **56**(18): 4096-4102

Gingrich JR, Greenberg NM (1996). “A transgenic mouse prostate cancer model.” *Toxicol Pathol* **24**(4): 502-504

Gingrich JR, Barrios RJ, Kattan MW, Mahm HS, Finegold MJ, Greenberg NM (1997). “Androgen-independent prostate cancer progression in the TRAMP model.” *Cancer Res* **57**: 4687-4691

Gimona M, Buccione R, Courtneidge SA, Linder S (2008). “Assembly and biological role of podosomes and invadopodia.” *Curr Opin Cell Biol* **20**: 235–241

Greenberg NM, DeMayo FJ, Sheppard PC, Barrios R, Lebovitz R, Finegold M, Angelopoulou R, Dodd JG, Duckworth ML, Rosen JM *et al.* (1994). “The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice.” *Mol Endocrinol* **8**(2): 230-239

Greenberg NM, F DeMayo, MJ Finegold, D Medina, WD Tilley, JO Aspinall, GR Cunha, AA Donjacour, RJ Matusik, Rosen JM (1995). "Prostate cancer in a transgenic mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3439-3443

Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS, Wilson EM (2001). “A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy” *Cancer Res* **61**(11): 4315-4319

Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ (2001). ”Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer.” *J Natl Canc Inst* **93**: 1687-1697

Gupta S, Campbell D, De'rijard B, Davis RJ (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway." *Science* **267**: 389–393

Gupta A, Lee BS, Khadeer MA, Tang Z, Chellaiah M, Abu-Amer Y, Goldknopf J, Hruska KA (2003). "Leupaxin is a critical adaptor protein in the adhesion zone of the osteoclast" *J Bone Miner Res.* **18**: 669-685

Hai CM and Gu Z (2006). "Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling." *Eur J Cell Biol* **85**(3-4): 305-309

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001). "Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA." *Nat Rev Genet* **2**(2): 110-119

Han G, Buchanan G, Ittmann M, Harris JM, Yu X, Demayo FJ, Tilley W, Greenberg NM (2005). "Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate." *Proc Natl Acad Sci* **102**: 1151-1156

Hanahan D (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580

Hanahan D and Weinberg RA (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

Hanahan D and Folkman J (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell.* **86**(3): 353-364 Review

Hayashi K, Yano H, Hashida T, Takeuchi R, Takeda O, Asada K, Takahashi E, Kato I, Sobue K (1992). "Genomic structure of the human caldesmon gene." *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(24): 12122-12126

Hedrick L, Cho K, Vogelein B (1993). "Cell adhesion as tumor suppressors." *Trends Cell Biol* **3**: 36-39

Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH (1996). "Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response." *Am J Pathol* **149**: 273–282

Herr A-M (2005). "Analysen zur Expression und Funktion des Leupaxin Gens in humanen Karzinomen." Institut für Humangenetik, Georg-August-Universität, Göttingen.

Herzig M, Savarese F, Novatchkova M, Semb H, Christofori G (2007). "Tumor progression induced by the loss of E-cadherin independent of beta-catenin/Tcf-mediated Wnt signaling." *Oncogene* **26**: 2290–2298

Heinlein CA and Chang C (2004). "Androgen receptor in prostate cancer." *Endocr Rev* **25**: 276-308

Hildebrand JD, Schaller MD, Parsons JT (1995). "Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase" *Mol Biol Cell* **6**(6): 637-647

Hobisch A, Eder IE, Putz T, Horninger W, Bartsch G, Klocker H, Culig Z (1998). "Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor." *Cancer Res* **58**(20): 4640-4645

Hollstein M, Moeckel G, Hergenhahn M, Spiegelhalder B, Keil M, Werle-Schneider G, Bartsch H, Brickmann J (1998). „On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene." *Mutat Res* **405**: 145-54

Holly SP, Larson MK, Parise LV (2000). "Multiple roles of integrins in cell motility." *Exp Cell Res* **261**(1): 69-74 Review

Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, Bellon G (2002). "Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression." *Semin Cancer Biol* **12**(3): 231-241 Review

Horoszewics JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma" *Cancer Res* **43**(4): 1809-1818

Huang R, Li L, Guo H, Wang CL (2003). „Caldesmon binding to actin is regulated by calmodulin and phosphorylation via different mechanisms." *Biochemistry* **42**(9): 2513-2523

Huber PA, Gao Y, Fraser ID, Copeland O, EL-Mezgueldi M, Slatter DA, Keane NE, Marston SB, Levine BA (1998). “Structure-activity studies of the regulatory interaction of the 10 kilodalton C-terminal fragment of caldesmon with actin and the effect of mutation of caldesmon residues.” *Biochemistry* **37**(8): 2314-2326

Huggins C and Hodges CV (1972). “Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate.” *CA Cancer J Clin* **22**(4): 232-240

Hutvagner G and PD Zamore (2002). "RNAi: nature abhors a double-strand." *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 225-32

Ichikawa Y, Ishikawa T, Momiyama N, Kamiyama M, Sakurada H, Matsuyama R, Hasegawa S, Chishima T, Hamaguchi Y, Fujii S (2006). “Matrilysin (MMP-7) degrades VE-cadherin and accelerates accumulation of beta-catenin in the nucleus of human umbilical vein endothelial cells.” *Oncol Rep* **15**(2): 311-315

Jaffe AB and Hall A (2005). “Rho GTPases: biochemistry and biology.” *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 247-269

Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC (2005). “Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer.” *Urol Oncol* **23**(6): 402-406

Jennings MT and Pietenpol JA (1998). “The role of transforming growth factor β in glioma progression.” *J Neurooncol* **36**: 123-140

Johnson MA, Iversen P, Schwier P, Corn AL, Sandusky G, Graff J, Neubauer BL (2005). “Castration triggers growth of previously static androgen-independent lesions in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model.” *Prostate* **62**: 322-338

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979). “Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).” *Invest Urol* **17**(1): 16-23

Kallakury BV, Sheehan CE, Winn-Deen E, Oliver J, Fisher HA, Kaufman RP, Ross JS (2001). "Decreased expression of catenins (alpha and beta), p120 CTN, and E-cadherin cell adhesion proteins and E-cadherin gene promoter methylation in prostatic adenocarcinomas." *Cancer* **92**(11): 2786-95

Kallakury BV, Sheehan CE, Ross JS (2001 b). "Co-downregulation of cell adhesion proteins alpha- and beta-catenins, p120CTN, E-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas." *Hum Pathol* **32**(8): 849-558

Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Efstathiou J, Valizadeh A, Noda M, Playford RJ, Kmiot W, Pignatelli MJ (1999). "Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease." *Pathol* **185**(4): 413-418

Karelina TV, Goldberg GI, Eisen AZ (1994). "Matrilysin (PUMP) correlates with dermal invasion during appendageal development and cutaneous neoplasia." *J Invest Dermatol* **103**: 482-487

Kaulfuß S (2006). "Zur Funktion von Leupaxin beim Karzinom der Prostata." Institut für Humangenetik, Georg-August-Universität, Göttingen

Kaulfuß S, von Hardenberg S, Schweyer S, Herr AM, Laccone F, Wolf S, Burfeind P (2009). "Leupaxin acts as a mediator in prostate carcinoma progression through deregulation of p120catenin expression." *Oncogene* **28**(45): 3971-3982

Kim SI, Kwak JH, Zachariah M, He Y, Wang L, Choi ME (2007). "TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen." *Am J Physiol Renal Physiol* **292**(5): 1471-1478

Kim J, Hong SJ, Park JH, Park SY, Kim SW, Cho EY, Do IG, Joh JW, Kim DS (2009). "Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis." *Oncol Rep* **21**(6): 1449-1454

Kishimoto K, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J (2000). "TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop." *J Biol Chem* **275**: 7359-7364

Kitzing TM, Sahadevan AS, Brandt DT, Knieling H, Hannemann S, Fackler OT, Grosshans J, Grosse R (2007). “Positive feedback between Dia1, LARG, and RhoA regulates cell morphology and invasion.” *Genes Dev* **21**: 1478-1483

Kordowska J, Huang R, Wang CL (2006). “Phosphorylation of caldesmon during smooth muscle contraction and cell migration or proliferation.” *J Biomed Sci* **13**(2): 159-172

Kordowska J, Hetrick T, Adam LP, Wang CL (2006). "Phosphorylated l-caldesmon is involved in disassembly of actin stress fibers and postmitotic spreading." *Exp Cell Res* **312**(2): 95-110

Kosa JL, Michelsen JW, Louis HA, Olsen J I, Davis DR, Beckerle MC, Winge DR (1994). “Common metal ion coordination in LIM domain proteins.” *Biochemistry* **33**: 468-477

Koss LG (2005). “Localized prostate cancer and DNA ploidy.” *JAMA* **294**(10): 1207-1208

Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG (2003). “E-Cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases.” *Breast Cancer Res* **5**: 217-222

Lane DP and Crawford LV (1979). “T-antigen is bound to host proteins in SV-40 transformed cells.” *Nature* **278**: 261-263

Laemmli UK (1970). “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* **227**(5259): 680-685

Lee MH, Koria P, Qu J, Andreadis ST (2009). “JNK phosphorylates beta-catenin and regulates adherens junctions.” *FASEB J* **23**(11): 3874-3883

Lemaître V and D'Armiento J (2006). “Matrix metalloproteinases in development and disease.” *Birth Defects Res C Embryo Today* **78**(1): 1-10

Levy L and Hill CS (2006). “Alterations in components of the TGFbeta superfamily signaling pathways in human cancer.” *Cytokine Growth Factor Rev* **17**: 41-58

Lin HK, Yeh S, Kang HY, Chang C (2001). “Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor.” *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7200-7205

Lin HK, Hu YC, Yang L, Altuwajri S, Chen YT, Kang HY, Chang C (2003). “Suppression versus induction of androgen receptor functions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer LNCaP cells with different passage numbers.” *J Biol Chem* **278**: 50902–50907

Li Y, Reznichenko M, Tribe RM, Hess PE, Taggart M, Kim H, DeGnore JP, Gangopadhyay S, Morgan KG (2009). “Stretch activates human myometrium via ERK, caldesmon and focal adhesion signaling.” *PLoS One* **4**(10): e7489

Linder S (2007). “The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation.” *Trends Cell Biol* **17**: 107-117

Linzer DIH and Levine AJ (1979). “Characterization of a 54 kDalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells.” *Cell* **17**: 43-52.

Liotta LA and Stetler-Stevenson WG (1990). “Metalloproteinases and cancer invasion.” *Cancer Biol* **1**: 99-106

Lipsky BP, Beals CR, Staunton DE (1998). “Leupaxin is a novel LIM domain protein that forms a complex with PYK2.” *J Biol Chem* **273**(19): 11709-11713

Liu S, Kiosses WB, Rose DM, Slepak M, Salgia R, Griffin JD, Turner CE, Schwartz MA, Ginsberg MH (2002). “A fragment of paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits alpha 4-mediated cell migration.” *J Biol Chem* **277**(23): 20887-20894

Liu Y, Li QC, Miao Y, Xu HT, Dai SD, Wei Q, Dong QZ, Dong XJ, Zhao Y, Zhao C, Wang EH (2009). “Ablation of p120-catenin enhances invasion and metastasis of human lung cancer cells.” *Cancer Sci* **100**(3): 441-448

Livingstone C, Patel G, Jones N (1997). “ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain.” *EMBO J* **14**: 1785-1797

Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ (1997). “Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells.” *J Cell Biol* **139**: 1861-1872

Lu W, Tinsley HN, Keeton A, Qu Z, Piazza GA, Li Y (2009). “Suppression of Wnt/beta-catenin signaling inhibits prostate cancer cell proliferation.” *Eur J Pharmacol* **602**(1): 8-14

Maeda M, Johnson E, Mandal SH, Lawson KR, Keim SA, Svoboda RA, Caplan S, Wahl JK III, Wheelock MJ, Johnson KR (2006). “Expression of inappropriate cadherins by epithelial tumor cells promotes endocytosis and degradation of E-cadherin via competition for p120(ctn).” *Oncogene* **25**: 4595-4604

Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, Moser PL, Fuchs D, Hobisch A, Culig Z (2009). “Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer *in vitro* and *in vivo* through activation of the androgen receptor.” *Endocrine-Related Cancer* **16**: 155–169

Maniatis T and Efstratiadis A (1980). “Fractionation of low molecular weight DNA or RNA in polyacrylamide gels containing 98% formamide or 7 M urea.” *Methods Enzymol* **65**(1): 299-305

Mariner DJ, Anastasiadis P, Keilhack H, Böhmer FD, Wang J, Reynolds AB (2001). “Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn.” *J Biol Chem* **276**(30): 28006-28013

Massague J (2006). “The logic of TGF-beta signalling.” *Febs Journal* **273**: 2–12

Matias PM, Carrondo MA, Coelho R, Thomaz M, Zhao XY, Wegg A, Crusius K, Egner U, Donner P (2002). “Structural basis for the glucocorticoid response in a mutant human androgen receptor (AR(ccr)) derived from an androgen-independent prostate cancer.” *J Med Chem* **45**(7): 1439-1446

-
- McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML (1992).** “Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer.” *Cancer Res* **52**(24): 6940-6944
- Mege RM, Gavard J, Lambert M. (2006).** “Regulation of cell–cell junctions by the cytoskeleton.” *Curr Opin Cell Biol* **18**: 541–548
- Mestayer C, Blanchere M, Jaubert F, Dufour B, Mowszowics I (2003).** “Expression of androgen receptor coactivators in normal and cancer prostate tissues and cultured cell lines.” *Prostate* **56**(3): 192-200
- Michelsen JW, Sewell AK, Louis HA, Olsen JI, Davis DR, Winge DR, Beckerle MC (1994).** “Mutational analysis of the metal sites in an LIM domain.” *J Biol Chem* **269**: 11108–11113
- Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Vollmer RT, Paulson DF (1977).** „Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice.“ *Cancer Res* **37**(11): 4049-4058
- Mira E, Manes S, Lacalle RA, Marquez G, Martinez AC (1999).** “Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9.” *Endocrinology* **140**: 1657–1664
- Moustakas A and Heldin CH (2005).** “Non-Smad TGF-beta signals.” *J Cell Sci* **118**(Pt 16): 3573–3584
- Murphy G and Nagase H (2008).** “Progress in matrix metalloproteinase research.” *Mol Aspects Med* **29**(5): 290-308
- Nakopoulou L, Zervas A, Gakiopoulou-Givalou H, Constantinides C, Doumanis G, Davaris P, Dimopoulos C (2000).** “Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, p120ctn in patients with transitional cell bladder cancer.” *Anticancer Res* **20**(6B): 4571-4578

Neil JR and Schiemann WP (2008). “Altered TAB1:I kappaB kinase interaction promotes transforming growth factor beta-mediated nuclear factor-kappaB activation during breast cancer progression.” *Cancer Res* **68**(5): 1462-1470

Ngai PK and Walsh MP (1984). “Inhibition of smooth muscle actin-activated myosin Mg²⁺-ATPase activity by caldesmon.” *J Biol Chem* **259**(22): 13656-13659

Nobes C and Hall A (1995). “Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.” *Cell*. **81**: 53–62

Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M (2001). “Release of an invasion promoter Ecadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1.” *J Cell Sci* **114**: 111–118

Noren NK, Liu BP, Burrige K, Kreft B (2000). “p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases.” *J Cell Biol* **150**(3): 567-580

Ohnuki Y, Marnell Mm, Babcock MS, Lechner JF, Kaighn ME (1980). “Chromosomal analysis of human prostatic adenocarcinoma cell lines.” *Cancer Res* **40**(3): 524-534

Okegawa T, Li Y, Pong RC, Hsieh JT (2002). “Cell adhesion proteins as tumor suppressors.” *J Urol* **167**(4): 1836-1843

Ooki A, Yamashita K, Kikuchi S, Sakuramoto S, Katada N, Kokubo K, Kobayashi H, Kim MS, Sidransky D, Watanabe M (2010). “Potential utility of HOP homeobox gene promoter methylation as a marker of tumor aggressiveness in gastric cancer.” *Oncogene* [Epub ahead of print]

Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989). “The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species.” *EMBO J* **8**: 1711-1717

Pajouh MS, Nagle RB, Breathnach R, Finch JS, Brawer MK, Bowden GT (1991). “Expression of metalloproteinase genes in human prostate cancer.” *J Cancer Res Clin Oncol* **117**: 144–150

-
- Peifer M (1993).** “Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science* **262**(5140): 1667-1668
- Perez-Alvarado GC, Miles C, Michelsen, JW, Louis HA, Winge, DR, Beckerle MC, Summers MF (1994).** “Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP.” *Nat Struct Bio.* **1**: 388–398
- Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E (2006).** “p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin.” *Cell* **124**: 631-644
- Perez-Moreno M, Song W, Pasolli HA, Williams SE, Fuchs E (2008).** “Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer.” *Proc Natl Acad Sci USA* **105**(40): 15399-15404
- Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. (1995).** “Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo.” *Cancer Res* **55**(19): 4438-4445
- Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT (1989).** „Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene.” *Mol Cell Biol* **9**(2): 629-638
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994).** “Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes.” *Mol Cell Biol* **14**(12): 8333-8342
- Ridley AJ and Hall A (1992).** “The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.” *Cell* **70**: 389–399
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekman D, Hall A (1992).** “The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.” *Cell* **70**: 401–410
- Sadot E, Simcha I, Shtutman M, Ben-Ze’ev A, Geiger B (1998).** “Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives.” *Proc Natl Acad Sci* **95**: 15339–15344.

Sahai E and Marshall CJ (2003). “Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis.” *Nat Cell Biol* **5**(8): 711-719

Sahu SN, Khadeer MA, Robertson BW, Núñez SM, Bai G, Gupta A (2007). “Association of leupaxin with Src in osteoclasts.” *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(1): C581-590

Sahu SN, Nunez S, Bai G, Gupta A (2007). “Interaction of Pyk2 and PTP-PEST with leupaxin in prostate cancer cells.” *Am J Physiol Cell Physiol. Prostate* **62**(4): 322-338

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). “Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia.” *Science* **230**(4732): 1350-1354

Sakurai H, Miyoshi H, Toriumi W, Sugita T (1999). “Functional interactions of TGF- β -activated kinase 1 with I κ B kinases to stimulate NF- κ B activation.” *J Biol Chem* **274**: 10641-10648

Sakurai H, Nishi A, Sato N, Mizukami J, Miyoshi H, Sugita T (2002). “TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase kinase that stimulates AP-1 and NF- κ B signaling pathways.” *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 1277-1281

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). “Molecular cloning: a laboratory manual.” New York, USA, Cold Spring Harbour.

Santer FR, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta IT (2010). “Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells.” *Endocr Relat Cancer* **17**(1): 241-253

Sharp PA (2001). "RNA interference-2001." *Genes Dev* **15**(5): 485-490

Sheng S, Carey J, Seftor EA, Dias L, Hendrix MJ, Sager R (1996). “Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11669 - 11674

- Shi XB, Xue L, Zou JX, Gandour-Edwards R, Chen H, deVere White RW (2008).** “Prolonged androgen receptor loading onto chromatin and the efficient recruitment of p160 coactivators contribute to androgen-independent growth of prostate cancer cells.” *Prostate* **68**(16): 1816-1826
- Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K (1996).** “TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-signal transduction.” *Science* **272**: 1179–1182
- Shields JM, Rogers-Graham K, Der CJ (2002).** „Loss of transgelin in breast and colon tumors and in RIE-1 cells by Ras deregulation of gene expression through Raf-independent pathways.” *J Biol Chem* **277**(12): 9790 - 9799
- Sobue K and Sellers JR (1991).** “Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems.” *J Biol Che* **266**(19): 12115-12118
- Song H, Zhang B, Watson MA, Humphrey PA, Lim H, Milbrandt J (2009).** ”Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis.” *Oncogene* **28**(37): 3307-3319
- Sporn MB (1996).** “The war on cancer.” *Lancet* **347**(9012): 1377-1381 Review
- Stanbrough M, Leav I, Kwan PW, Bublely GJ, Balk SP (2001).** “Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium.” *Proc Natl Acad Sci* **98**: 10823-10828
- Sternlicht MD and Bergers G (2000).** “Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects.” *Emerging Ther Targets* **4**: 609–633
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978).** “Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).” *Int J Cancer* **21**(3): 274-281
- Studier FW and Moffatt BA (1986).** “Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.” *J Mol Biol* **189**(1): 113-130
- Sundareshan P, Nagle RB, Bowden GT (1999).** “EGF induces the expression of matrilysin in the human prostate adenocarcinoma cell line LNCaP.” *Prostate* **40**: 159-166

Sundberg-Smith LJ, DiMichele LA, Sayers RL, Mack CP, Taylor JM (2008). „The LIM protein leupaxin is enriched in smooth muscle and functions as an serum response factor cofactor to induce smooth muscle cell gene transcription.” *Circ Res* **102**: 1502-1511

Syrigos KN, Karayiannakis A, Syrigou EI, Harrington K, Pignatelli M (1998). “Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer.” *Eur J Cancer* **34**(13): 2037-2040

Tang Y, Wang L, Goloubeva O, Khan MA, Zhang B, Hussain A (2008). “Divergent effects of castration on prostate cancer in TRAMP mice: possible implications for therapy.” *Clin Cancer Res* **14**(10): 2936-2943

Tanzi RE (2008). “Novel therapeutics for Alzheimer's disease.” *Neurotherapeutics* **5**(3): 377-380

Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, Hummingbird DK, Reynolds AB (2000). “Selective uncoupling of p120ctn from E-cadherin disrupts strong adhesion.” *J Cell Biol* **148**: 189–201

Tinkle CL, Lechler T, Pasolli HA, Fuchs E (2004). “Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses.” *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 552–557

Tournaviti S, Hannemann S, Terjung S, Kitzing TM, Stegmayer C, Ritzerfeld J, Walther P, Grosse R, Nickel W, Fackler OT (2007). “SH4-domain-induced plasma membrane dynamization promotes bleb-associated cell motility.” *J Cell Sci* **120**(Pt 21): 3820-3829

Tremblay L, Hauck W, Aprikian AG, Begin LR, Chapdelaine A, Chevalier S (1996). “Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma” *Int J Cancer* **68**(2): 164-171

Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Gunzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM (2005). „E-cadherin is essential for *in vivo* epidermal barrier function by regulating tight junctions.” *EMBO J* **24**: 1146–1156

Tuschl, T (2001). "RNA interference and small interfering RNAs." *Chembiochem* **2**(4): 239-245

Ueda T, Mawji NR, Bruchovsky N, Sadar MD (2002). "Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells." *J Biol Chem* **277**(41): 38087-38094

Ueda T, Bruchovsky N, Sadar MD (2002). "Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways." *J Biol Chem* **277**(9): 7076-7085

van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, Angel P (1997). "ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents." *EMBO J* **14**: 31798-31811

van de Wetering M, Barker N, Harkes IC, van der Heyden M, Dijk NJ, Hollestelle A, Klijn JG, Clevers H, Schutte M (2001). „Mutant Ecadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling." *Cancer Res* **61**: 278-284

van Duin M, van Marion R, Vissers K, Watson JE, van Weerden WM, Schröder FH, Hop WC, van der Kwast TH, Collins C, van Dekken H (2005). "High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm 8q: evaluation of genetic progression markers for prostate cancer." *Genes Chromosom Cancer* **44**: 438-449

VanSaun MN and Matrisian LM (2006). "Matrix metalloproteinases and cellular motility in development and disease." *Birth Defects Res C Embryo Today* **78**(1): 69-79

Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij HC, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E (1990). "A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens." *Biochem Biophys Res Commun* **173**(2): 534-540

Vogelstein B and Kinzler KW (2004). "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med* **10**(8): 789-799

- Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA (2005).** “Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase.” *Int J Cancer* **114**: 19-31
- Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR (1999).** “Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity.” *Biochem Biophys Res Commun* **259**(1): 21-28
- Wang Y, Dong Q, Zhang Q, Li Z, Wang E, Qiu X (2010).** “Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer.” *Cancer Sci* [Epub ahead of print]
- Weaver AM (2006).** “Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion.” *Clin Exp Metastasis* **23**: 97-105
- Weinberg RA (1995).** “The retinoblastoma protein and cell cycle control.” *Cell* **81**: 323-330
- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB (2006).** “p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho.” *Cell* **127**: 1027-1039
- Wise GJ, Marella VK, Talluri G, Shirazian D (2000).** “Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer.” *J Urol* **164**(3 Pt 1): 722-725
- Woessner JF and Nagase H (2000).** “Matrix Metalloproteinases and TIMPs.” *New York: Oxford Univ*
- Xie W, Wang Y, Huang Y, Yang H, Wang J, Hu Z (2009).** “Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDA-MB-231 breast cancer cells.” *Biochem Biophys Res Commun* **379**(4): 1027-1032
- Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E, Faundez V, Kowalczyk AP (2005).** “p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin.” *Mol Biol Cell* **16**: 5141–5151
- Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K (1995).** “Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction.” *Science* **270**: 2008–2011

Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, Segall J, Eddy R, Miki H, Takenawa T, Condeelis J (2005). “Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin.” *J Cell Biol* **168**(3): 441-452

Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J (2006). “Invadopodia and podosomes in tumor invasion.” *Eur J Cell Biol* **85**: 213-218

Yamaguchi S, Asanoma K, Takao T, Kato K, Wake N (2009). “Homeobox gene HOPX is epigenetically silenced in human uterine endometrial cancer and suppresses estrogen-stimulated proliferation of cancer cells by inhibiting serum response factor.” *Int J Cancer* **124**(11): 2577-2588

Yamashiro S, Yamakita Y, Ishikawa R, Matsumura F (1990). “Mitosis-specific phosphorylation causes 83K non-muscle caldesmon to dissociate from microfilaments.” *Nature* **344**(6267): 675-678

Yamashiro S, Yamakita Y, Hosoya H, Matsumura F (1991). “Phosphorylation of non-muscle caldesmon by p34cdc2 kinase during mitosis.” *Nature* **349**(6305): 169-172

Yanagisawa M, Huvelde D, Kreinest P, Lohse CM, Cheville JC, Parker AS, Copland JA, Anastasiadis PZ (2008). “A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion and predicts metastatic disease.” *J Biol Chem* **283**: 18344-18354

Yokouchi K, Numaguchi Y, Kubota R, Ishii M, Imai H, Murakami R, Ogawa Y, Kondo T, Okumura K, Ingber DE, Murohara T (2006). “ α -Caldesmon regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and inhibits neointimal formation after angioplasty” *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(10): 2231-2237

Yoshio T, Morita T, Kimura Y, Tsujii M, Hayashi N, Sobue K (2007). “Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation.” *FEBS Lett* **581**(20): 3777-3782

Yu EY, Wilding G, Posadas E, Gross M, Culine S, Massard C, Morris MJ, Hudes G, Calabrò F, Cheng S *et al.* (2009). “Phase II study of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer.” *Clin Cancer Res* **15**(23): 7421-7428

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sandra Gräfin von Hardenberg, geb. Beckemeyer
Geburtsdatum: 23.04.1982
Geburtsort: Minden
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg:

1982 – 1992 Besuch der Grundschule Kutenhausen
1992 – 2001 Besuch des städtischen Gymnasiums in Petershagen
2001 – 2002 Studium der Biologie und Mathematik auf gymnasiales
Lehramt an der Carl-von-Ossietzky-Universität in
Oldenburg
2002 – 2006 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität
in Göttingen
2004 – 2005 Erasmus Austausch-Studium an der Universität in Lund,
Schweden
2006 – 2007 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Georg-
August-Universität in Göttingen
2007 – 2010 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für
Humangenetik der Georg-August-Universität in
Göttingen

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. W. Engel für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen, seine fortwährende Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. S. Hoyer-Fender möchte ich mich für die Übernahme des Korreferat sowie das Interesse und die konstruktive Kritik bedanken.

Bei meiner Betreuerin Frau Dr. Silke Kaulfuß möchte ich mich für die interessante Aufgabenstellung sowie für das unglaubliche Interesse und das Engagement am Fortgang dieser Arbeit bedanken. Weiterhin möchte ich mich für die Diskussionsbereitschaft und das Annehmen von neuen Ideen, die ständige Hilfsbereitschaft bei der Planung der Experimente und die gründliche Durchsicht sowie Korrektur der Manuskripte bedanken.

Herrn Prof. Dr. Burfeind danke ich für die freundschaftliche Laboratmosphäre, die Hilfsbereitschaft, das Interesse an der Arbeit und das Korrekturlesen der Abstracts, Poster und des Papers.

Bei Herrn PD Dr. S. Schweyer möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei der Auswertung der histopathologischen Befunde der Mäuseschnitte bedanken.

Stefan Wolf und Jutta Schröder möchte ich für die Pflege und das sorgfältige Überwachen der transgenen Mäuse sowie die Unterstützung bei der Präparation und Kastration der Mäuse bedanken.

Ein ganz lieber Dank gilt vor allem Rovena, Daria, Henning, Jose, Nicole, Sascha, Christoffer, Maren und Hilka für die freundschaftliche, hilfsbereite, unterstützende und lustige Atmosphäre im Labor. Britta danke ich sehr für wertvolle Unterstützung, besonders mit den Primärzellen, in einer wichtigen Phase der Arbeit. Vielen Dank dafür!

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik bedanke ich mich für das freundliche Miteinander.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Wichard für sein Interesse, seine Unterstützung und sein uneingeschränktes Vertrauen sowie meinen Eltern für Ihre Unterstützung bei jeglichen Problemen und die Möglichkeit meine Ausbildung nach meinen Vorstellungen zu gestalten.