

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

**Untersuchungen zur Expression und Funktion des „LIM and SH3
Domain Proteins“ (LASP-1) in Medulloblastomen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christopher Kenan Tränka

aus Alsfeld

Würzburg, August 2015

Referent: Frau Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität
Würzburg

Korreferent: Herr Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou
Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2016

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet.

1. Einleitung	1
1.1 Das humane Medulloblastom	1
1.2 Das LIM- und SH3-Domänen-Protein LASP-1	5
1.3 Zielsetzung der Dissertation	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Kulturzellen	14
2.1.2 Medien, Lösungen und Seren in der Zellkultur	14
2.1.3 Reagenzien für Transfektionsversuche, siRNA-Sequenzen	14
2.1.4 Reaktionskits	15
2.1.5 Primär - und Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse und Immunfluoreszenz	15
2.1.6 Chemikalien, Reagenzien	16
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.8 Puffer und Lösungen	18
2.1.9 Geräte und Software	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zelllinien und Zellkulturbedingungen	20
2.2.2 Lagerung, Einfrieren und Auftauen der Zellen	21
2.2.3 Splitten und Wachstum der Kulturzellen über mehrere Passagen	22
2.2.4 Zell-Transfektion mittels Transfektionsreagenzien und siRNA- Komplexen	23
2.2.5 Denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli	25
2.2.6 Western Blot nach Towbin und Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern	26
2.2.7 Immunfluoreszenz	27
2.2.8 Prüfen der Viabilität und Zellzahlbestimmung der Kulturzellen nach Färbung mit Trypan-Blau	28
2.2.9 Migrationsassay	29
2.2.10 Proliferationsassay	30
2.2.11 Adhäsionsassay	31
3. Ergebnisse	32
3.1 LASP-1 ist in Medulloblastom-Zelllinien hoch exprimiert und im Zytosol mit F-Aktin ko-lokalisiert	32
3.2 Phosphoryliertes LASP-1 ist in Medulloblastom-Zelllinien überwiegend im Zellkern lokalisiert	34
3.3 LASP-1-Knockdown hemmt die Proliferationsfähigkeit von humanen Medulloblastom-Zellen	35
3.4 LASP-1-Knockdown hemmt die Fähigkeit der Zellmigration und steigert die Adhäsion von humanen Medulloblastom-Zellen	39
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	53
6. Literaturverzeichnis	55
<i>Danksagung</i>	
<i>Curriculum Vitae</i>	

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abl	Abelson (Tyrosinkinase)
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpLASP	dephosphoryliertes LASP
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
h	Stunde
HCC	Hepatocelluläres Carcinom
i17q	Isochromosom 17q
k	Kilo
Krp	Kelch related protein
LASP-1	LIM- und SH3-Domänen Protein 1
LPP	Lipoma Preferred Partner
min	Minute
MB	Medulloblastom
MLN	Metastatic (axillary) lymph node
mRNA	messenger RNA
NGF	Nerve Growth Factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
pLASP	phosphoryliertes LASP

RNA	Ribonukleinsäure
SDS	sodium dodecylsulfate
SH3	SRC homology 3
SHH	Sonic Hedgehog
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-2	Zonula Ocludens Protein 2

1. Einleitung

1.1 Das humane Medulloblastom

Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) sind nach Leukämien die zweithäufigsten malignen Tumorerkrankungen (23.7%, Zahlen für Deutschland, 2014, (Kaatsch 2014)) des Kindes- und Jugendalters, unter den soliden Tumoren stellen sie in dieser Altersgruppe die häufigste Entität dar. Daten des deutschen Kinderkrebsregisters geben eine Prävalenz von ZNS-Tumoren von 1:1700 bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren an (Kaatsch 2014). In der Gruppe der intrakraniell und intraspinal gelegenen embryonalen Tumore sind Medulloblastome (MB) mit 70.2 % (Zahlen für Deutschland, Jahre 2004 – 2013, Betroffene unter 15 Jahren, (Kaatsch 2014)) die häufigsten ZNS-Tumoren des Kindes- und frühen Jugendalters. Männliche Betroffene sind dabei überrepräsentiert (Verhältnis männlich / weiblich: 2:1). Der Altersmedian zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei Kindern unter 15 Jahren lag laut Zahlen des deutschen Kinderkrebsregisters bei 6 Jahren und 5 Monaten (Kaatsch 2014). Nach der aktuell gültigen WHO-Klassifikation von Tumoren des zentralen Nervensystems aus dem Jahr 2007, werden Medulloblastome histologisch in klassische Medulloblastome, desmoplastisch / noduläre Medulloblastome, Medulloblastome mit extensiver Nodularität, anaplastische Medulloblastome und grosszellige Medulloblastome unterteilt. Medulloblastome werden nach WHO dem Grad IV zugeordnet – Charakteristika dieser Grad IV Tumoren sind: (1) Zeichen der zytologischen Malignität, (2) hohe mitotische Aktivität, (3) zu Nekrose neigende Neoplasien, sowie typischerweise (4) rasche Progression und (5) fatales Outcome bei fehlender Behandlung (Louis, Ohgaki et al. 2007). Neben histologischen Kriterien hat sich im vergangenen Jahrzehnt ein Konsensus zu einer molekulargenetischen Einteilung von Medulloblastomen entwickelt (Taylor, Northcott et al. 2012). Diese Einteilung folgt den in den jeweiligen Gruppen vorherrschenden chromosomalen und genetischen Veränderungen. Unterschieden werden die WNT-Subgruppe (benannt nach der vorherrschenden Aktivierung von Effektoren des WNT-Signalweges in dieser Gruppe), die SHH-Gruppe (benannt nach der in dieser Gruppe vorherrschenden aberranten Aktivierung des Sonic Hedgehog (SHH) -

1. Einleitung

Signalweges), sowie die sogenannten Gruppe 3 und Gruppe 4 – Medulloblastome, die nach den bisherigen Erkenntnissen in der Regel weder durch wesentliche WNT- noch durch SHH – Aktivierung gekennzeichnet sind (Taylor, Northcott et al. 2012). Häufigkeiten, gemeinsame histologische und molekulargenetische Charakteristika der jeweiligen Gruppen sind in Tabelle 1 und Abbildung 1, basierend auf aktuellen Übersichtsarbeiten (Kool, Korshunov et al. 2012, Northcott, Korshunov et al. 2012, Taylor, Northcott et al. 2012, Remke, Ramaswamy et al. 2013, Gajjar and Robinson 2014) zusammengefasst.

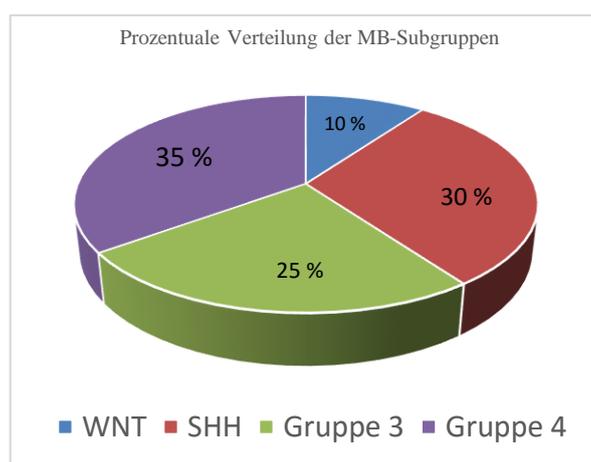


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der molekulargenetischen Medulloblastom-Subgruppen an der Gesamt-Anzahl aller Medulloblastome. Einteilung nach vorherrschender molekulargenetischer Veränderung. WNT: WNT-Signalweg; SHH: Sonic Hedgehog Signalweg. (Zahlen und graphische Darstellung adaptiert nach Gajjar and Robinson 2014; Kool, Korshunov et al. 2012; Northcott, Korshunov et al. 2012; Remke, Ramaswamy et al. 2013; Taylor, Northcott et al. 2012).

Medulloblastome sind infratentoriell im Bereich des Kleinhirns gelegen und gehen zur überwiegenden Anzahl aus dem Kleinhirnwurm hervor, eine kleinere Anzahl nimmt ihren Ursprung in den Kleinhirnhemisphären (Pizer and Clifford 2009, Ramaswamy, Remke et al. 2014). Durch die Nähe zum Liquor-System sind sogenannte Abtropfmetastasen in den Spinalkanal häufig (ca. 30%) (Pizer and Clifford 2009). Klinische Symptome entstehen in Abhängigkeit der genauen Lokalisation der Neoplasie und umfassen häufig Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, eine Ataxie und Störungen der Okulomotorik (Ramaswamy, Remke et al. 2014). Symptome wie Übelkeit und Erbrechen, Gangstörungen, Koordinationsschwierigkeiten oder fokale-neurologische Defizite im

1. Einleitung

Sinne einer fokalen motorischen Schwäche führen bei soliden kindlichen Hirntumoren dabei zu einer signifikant früheren Diagnosestellung, wohingegen subtilere Symptome, wie isolierte Hirnnerven-Lähmungen, mit einer verzögerten Diagnosestellung assoziiert sind (Wilne, Collier et al. 2012). Sowohl in Bezug auf die klinische Präsentation (Kopfschmerzen, Erbrechen) als auch die Lokalisation des Primär-Tumors (Mittellinie, Kleinhirnhemisphären) ergaben sich in einer erst kürzlich publizierten Arbeit signifikante Unterschiede zwischen den eingangs erwähnten molekularen Medulloblastom-Subgruppen (Ramaswamy, Remke et al. 2014). Eine Therapie des Medulloblastoms erfolgt in der Regel im Rahmen von multimodalen Therapiekonzepten sowie nach Möglichkeit in kontrollierten klinischen Studien. Komponenten dieser Therapien sind: die neurochirurgische primäre Resektion des Tumors, bei Kindern über vier Jahren in der Regel eine Bestrahlung der gesamten Neuroachse sowie eine Chemotherapie, welche meist in Kombination mehrerer Substanzen erfolgt. Auf eine Bestrahlungstherapie wird aufgrund zu erwartender Spätfolgen (Störungen der psychomotorischen, mentalen, kognitiven Entwicklung und neuroendokrine Störungen) bei Kindern unter vier Jahren, wenn möglich, verzichtet (Rutkowski 2012).

Prognostische Relevanz hat im klinischen Verlauf vor allem das Vorhandensein einer leptomeningealen Aussaat, die makroskopisch oder mikroskopisch, zum Beispiel im Liquor, nachgewiesen werden kann (Zerbini, Gelber et al. 1993, Zeltzer, Boyett et al. 1999). Darüber hinaus haben die eingangs erwähnten Einteilungen nach molekulargenetischen Kriterien eine neue Einschätzung der Prognose möglich gemacht. So zeigen zum Beispiel Betroffene mit Medulloblastomen der Gruppe 3 oder 4 ein deutlich verschlechtertes Gesamtüberleben (Kool, Korshunov et al. 2012).

Charakteristisches Merkmal der WNT-Subgruppe ist das Vorhandensein einer den WNT-Signalweg aktivierenden Mutation im CTNNB1-Gen, das zu einer Akkumulation von CTNNB1 im Zellkern führt und mittlerweile, zusammen mit der Monosomie des Chromosoms 6, als charakteristisch für Medulloblastome mit niedrigem Risiko gilt (Ellison, Onilude et al. 2005, Clifford, Lusher et al. 2006). Mit einer ungünstigeren Prognose sind die Medulloblastome der SHH-Subgruppe assoziiert, die typischerweise MYCN-Amplifikationen sowie Mutationen der PTCH1 und SUFU-Gene aufweisen (Pietsch, Waha et al. 1997, Raffel, Jenkins et al. 1997, Taylor, Liu et al. 2002, Northcott,

1. Einleitung

Korshunov et al. 2012). Die unter anderem aufgrund des klinischen Verlaufs als Hochrisiko-Medulloblastome eingestuft Tumore der Gruppe 3 und Gruppe 4 zeigen sehr häufig chromosomale Aberrationen der Chromosomen 7 und 17. Diese umfassen einen Zugewinn auf Chromosom 7p und 7q, sehr häufig einen Zugewinn auf Chromosom 17q mit oder ohne konkomitanten Verlust auf Chromosom 17p, sowie das Vorhandensein eines Isochromosom 17q (i17q) (Kool, Korshunov et al. 2012). Ein isolierter Zugewinn auf Chromosom 17q wurde im Gegensatz zu einem isolierten Verlust von Chromosom 17p in einer Kohorte von 340 untersuchten Medulloblastomen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Pfister, Remke et al. 2009). Das LIM- und SH3-Domänen-Protein-1 (LASP-1) konnte in Vorarbeiten zu dieser Dissertation als eines der funktionell relevantesten Proteine, die auf Chromosom 17q codiert sind, in Medulloblastomen als möglicher Induktor eines schlechteren Verlaufstypus identifiziert werden (Arbeiten der Gruppe von Prof. Dr. S. Pfister, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, DKFZ). Vergleichende mRNA – Analysen von jeweils 10 Medulloblastomen mit einem Zugewinn auf Chromosom 17q und solchen mit einem balancierten Karyotyp, identifizierten LASP-1 zudem als eines der am stärksten hochregulierten Transkripte (\log_2 Ratio = 3.1) in MB mit Chromosom 17q-Zugewinn (Vergleiche Abbildung 1A in (Traenka, Remke et al. 2010)). Diese Erkenntnisse bildeten eine wesentliche Grundlage der vorliegenden Dissertation.

1. Einleitung

Table 1: Wesentliche Charakteristika der vier Medulloblastom-Subgruppen (Einteilung nach vorherrschenden molekulargenetischen Veränderungen).

Altersgruppe: (I) < 4 Jahre; (II) 4-16 Jahre; (III) > 16 Jahre. *Geschlechterverteilung:* m=männlich; w=weiblich. *Neigung zur Metastasenbildung:* (-) selten; (+) häufig; (++) sehr häufig. WNT: WNT-Signalweg; SHH: Sonic Hedgehog Signalweg. Zahlen und Häufigkeiten adaptiert nach Kool, Korshunov et al. 2012, Northcott, Korshunov et al. 2012, Taylor, Northcott et al. 2012, Gajjar and Robinson 2014.

Medulloblastom-Subgruppe	WNT (10%)	SHH (30%)	Gruppe 3 (25%)	Gruppe 4 (35%)
Altersgruppe (häufigste)	(II)	(I), (II), (III)	(II)	(II)
Geschlechtsverteilung	m = w	m ≥ w	m > w	m > w
Charakteristische molekulargenetische Veränderungen, chromosomale Aberrationen	Aktivierung WNT-Signalweg; CTNNB1-Mutation; Monosomie 6; MYC-Expression	Aktivierung SHH-Signalweg; PTCH1/SMO/SUFU-Mutation; Deletion Chr. 9q; MYCN-Expression	Photorezeptor/ glutamaterge Signalwege; MYC- Amplifikation; Isochromosom 17q	Neuronal / glutamaterge Signalwege; CDK6- Amplifikation; Isochromosom 17q
Typische Histologie	klassisch, selten großzellig anaplastisch	desmoplastisch, klassisch, großzellig anaplastisch	klassisch, großzellig anaplastisch	klassisch, großzellig anaplastisch
Neigung zur Metastasenbildung	(-)	(-)	(++)	(+)
Prognose	sehr gut	gut	sehr schlecht	gut

1.2 Das LIM- und SH3-Domänen-Protein LASP-1

Das humane LIM- und SH3-Domänen-Protein-1 (LASP-1), bei Erstbeschreibung MLN 50 (MLN, Metastatic axillary lymph node) genannt, wurde erstmals durch Tomasetto et al. in einer cDNA-Datenbank von Lymphknoten-Metastasen von ductalen Mamma-Carcinomen identifiziert (Tomasetto, Regnier et al. 1995). Das zugehörige Gen wurde auf dem langen Arm des Chromosoms 17 in der Region q11 – q21.3 lokalisiert (Tomasetto, Regnier et al. 1995) – eine Region in der auch in 20-30% aller Mamma-Carcinome Mutationen zu finden sind (Tomasetto, Moog-Lutz et al. 1995), und auf der z.B. das mit hereditären Brustkrebs-Erkrankungen assoziierte Onkogen BRCA-1 lokalisiert ist (Hall, Lee et al. 1990). Die LASP-1 mRNA (4.0 kb) codiert für ein Protein mit 261 Aminosäuren. Bereits frühe Arbeiten zu LASP-1 haben gezeigt, dass das Protein

1. Einleitung

in etlichen, nicht maligne entarteten humanen Geweben exprimiert wird (Tomasetto, Moog-Lutz et al. 1995). Mittlerweile ist bekannt, dass LASP-1 ubiquitär in humanen Geweben nachzuweisen ist (Grunewald and Butt 2008). Eine Microarray-Analyse von 502 Gewebeproben normaler humaner Gewebe zeigt, dass die Expression von LASP-1 z.B. in gesundem Cerebellum in der Gruppe der neuronalen Gewebeproben sowie im Vergleich zu nicht-neuronalen Geweben geringer erscheint. Eine im Vergleich sehr hohe basale Expression von LASP-1 ist hingegen im fetalen Gehirn zu finden (Vergleiche Abbildung 2 aus (Orth, Cazes et al. 2015)). Eine Überexpression von LASP-1 konnte bereits anfänglich in benignen Fibroadenomen und Brustgewebshyperplasien aber auch in 8% (5/61) der untersuchten primären Brustkrebs-Gewebe nachgewiesen werden (Tomasetto, Moog-Lutz et al. 1995).

Strukturell zeigt LASP-1 eine letztlich namensgebende Besonderheit, die an diesem Protein erstbeschrieben wurde: es besitzt eine LIM-Domäne und gleichzeitig eine SH3 (SRC homology 3) - Domäne (Tomasetto, Moog-Lutz et al. 1995). Zwischen der am Amino-Terminus gelegenen LIM-Domäne und der am C-Terminus gelegenen SH3-Domäne finden sich die sogenannten Nebulin-like-Repeats (R1 und R2), Nebulin-Wiederholungen, die LASP-1 eine Bindung an Aktin und Kelch related protein (Krp) ermöglichen (Spence, McGarry et al. 2006, Grunewald and Butt 2008, Gray, McGarry et al. 2009). Der strukturelle Aufbau von LASP-1 und eine Übersicht über wesentliche Bindungsstellen - und Partner von LASP-1 sind in Abbildung 2 skizziert (adaptiert nach Grunewald and Butt 2008 und Orth, Cazes et al. 2015).

Die LIM Domäne von LASP-1 besteht aus acht Cystein- und Histidinresten. Die Zinkfingerstrukturen von LIM-Domänen ermöglichen zwar prinzipiell eine zumindest unspezifische Bindung an DNA (Hammarstrom, Berndt et al. 1996), eine direkte Bindung von LASP-1 an DNA konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden.

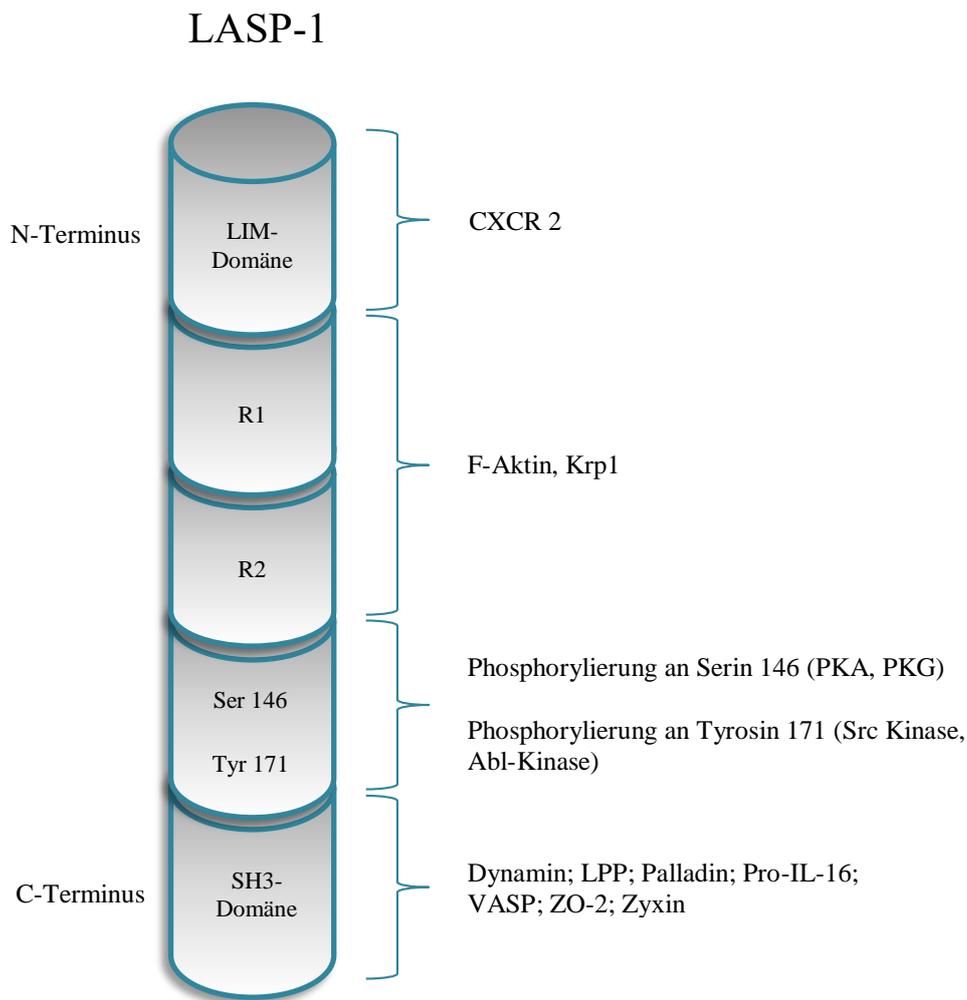


Abbildung 2: Das humane LIM und SH3 – Domänen Protein 1 (LASP-1). Skizze des strukturellen Aufbaus des Proteins mit seinen verschiedenen Domänen und den bisher bekannten Bindungspartnern (adaptiert nach Grunewald and Butt 2008 und Orth, Cazes et al. 2015).

Ein wichtiger Bindungspartner der LIM-Domäne von LASP-1 ist der Chemokinrezeptor CXCR2, ein Modulator von Entzündung, Angiogenese und Tumorwachstum (Raman, Sai et al. 2010). Die Bindung von LASP-1 an CXCR2 spielt eine relevante Rolle in der CXCR2-vermittelten Chemotaxis und der Adhäsion der Zellen an Kollagen IV (Raman, Sai et al. 2010). Eine Beeinflussung der Migration und Adhäsion von Tumorzellen durch die Interaktion von LASP-1 und CXCR2 ist somit denkbar. Ebenso konnte eine Bindung von LASP-1 an CXCR1 und die C-terminale Domäne von CXCR3 nachgewiesen werden. Eine Bindung von CXCR4 konnte nur für die phosphorylierte Form von LASP-1 gezeigt

1. Einleitung

werden. Interessanterweise ist CXCR4 in fetalem Cerebellum hoch exprimiert – ein Gewebe in dem auch LASP-1 in hoher Konzentration vorliegt. Eine deutliche Überexpression von CXCR4 konnte zudem in 80% der SHH-Medulloblastome gezeigt werden (Sengupta, Dubuc et al. 2012).

Die Bindung von LASP-1 an F-Aktin (Butt, Gambaryan et al. 2003) und an Krp1 (Spence, McGarry et al. 2006) über die R1- und R2-Domäne verdeutlicht bereits die Rolle von LASP-1 in der Zellmigration und der Bildung von Zellausläufern. Kelch related protein 1 reichert in den Spitzen von Pseudopodien an und spielt eine Rolle in der Elongation dieser Pseudopodien und damit der Zellinvasion. Ein Knockdown von LASP-1 und Krp1 führte in Fibroblasten-Zellen (FBR) jeweils zur einer deutlichen Reduktion der pseudopodialen Elongation (Spence, McGarry et al. 2006).

Zwischen den Nebulin-Wiederholungen und der SH3-Domäne von LASP-1 befinden sich zwei spezifische Phosphorylierungsstellen, Serin 146 und Tyrosin 171. Die Phosphorylierung von LASP-1 an Serin 146 erfolgt durch die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen „Proteinkinase A“ (PKA) und „Proteinkinase G“ (PKG) (Chew, Chen et al. 2002, Butt, Gambaryan et al. 2003). Eine Phosphorylierung von LASP-1 an Serin 146 führt dabei zu einer Translokation von LASP-1 aus den Zellausläufern und fokalen Kontakten in das Zytosol der Zelle (Chew, Chen et al. 2002). Darüber hinaus konnte eine verringerte Migration von Ptk2-Zellen nach LASP-1-Phosphorylierung an Serin 146 nachgewiesen werden (Butt, Gambaryan et al. 2003). Die Phosphorylierung an Tyrosin 171 erfolgt durch die Abelson (Abl) - Tyrosinkinase (Lin, Park et al. 2004) und die Src-Kinase (Traenka, Hauck et al. 2009). Wird LASP-1 durch die Src-Kinase phosphoryliert, führt dies zu einer Translokation des Proteins in fokale Kontakte in adhätierenden Zellen (Traenka, Hauck et al. 2009). Einen gegenteiligen Effekt hat die Phosphorylierung von LASP-1 durch die Abl-Tyrosinkinase in apoptotischen Zellen, welche zu einer Hemmung der Translokation von LASP-1 in die fokalen Kontakte führt. Unphosphoryliertes LASP-1 hingegen wird nach Stimulation der Zellen in die fokalen Kontakte verlagert. Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang auch eine gesteigerte H₂O₂ - und Cisplatin-induzierte Apoptose von LASP-1-depletierten Zellen beobachtet, was auf einen die Zellintegrität erhaltenden und proliferationsfördernden Effekt von LASP-1 hindeutet (Lin, Park et al. 2004).

1. Einleitung

Über die SH3-Domäne interagiert LASP-1 direkt mit mindestens sechs bisher bekannten Proteinen (siehe Abbildung 2). Eines dieser Proteine ist Lipoma preferred partner (LPP), ein ubiquitär exprimiertes Protein welches sowohl in Zelladhäsionen als auch im Zellkern lokalisiert ist. Es interagiert unter anderem mit dem Tumor-Suppressorgen Scrib, und α -actinin, wirkt im Nucleus aber auch als Ko-Aktivator von Transkriptions-Faktoren (Grunewald, Pasedag et al. 2009). LASP-1 bindet über die SH3-Domäne direkt an LPP (Keicher, Gambaryan et al. 2004). Eine Phosphorylierung von LASP-1 an Serin 146, die zu einer Abnahme von LASP-1 in fokalen Kontakten führt, scheint auch die in der Folge verminderte Bindung an LPP zu beeinflussen (Mihlan, Reiss et al. 2013). Ein Einfluss von LASP-1 auf die Tumorigenese über eine Interaktion mit LPP erscheint durch die Bindung von LASP-1 an LPP einerseits, durch die Interaktion von LPP mit Transkriptionsfaktoren andererseits durchaus möglich (Grunewald, Pasedag et al. 2009). LPP gehört der gleichen Proteinfamilie an wie Zyxin, ein weiterer wichtiger Bindungspartner von LASP-1. Auch Zyxin liegt vorwiegend in fokalen Adhäsionen von Zellen vor, kann aber auch im Zellkern gefunden werden (Wang and Gilmore 2003). LASP-1 bindet direkt an Zyxin und liegt mit diesem in Ko-Lokalisation in den fokalen Adhäsionen vor (Li, Zhuang et al. 2004). Die genaue Funktion dieser Protein-Interaktion zwischen LASP-1 und Zyxin ist bisher nicht abschliessend geklärt. Eine Beeinflussung der Zytoskelett-Organisation durch die gegenseitige Interaktion ist wahrscheinlich. Ein siRNA-silencing von LASP-1 in BT-20 Brustkrebszellen führte zu einer Abnahme von Zyxin an den fokalen Kontakten, bei insgesamt gleich bleibender Zyxin-Expression und auch gleicher Konfiguration der fokalen Kontakte in den transfizierten Zellen. Allerdings konnte nach LASP-1-Knockdown eine verminderte Migrationsfähigkeit der Zellen beobachtet werden, die durch einen Verlust von Zyxin an den fokalen Kontakten erklärt werden könnte (Grunewald, Kammerer et al. 2007). Darüber hinaus ist auch für Zyxin eine Funktion der Ko-Aktivierung von nukleären Transkriptionsfaktoren beschrieben (Wang and Gilmore 2003), so dass auch hier eine indirekte Beeinflussung der Gentranskription durch LASP-1 prinzipiell denkbar erscheint. In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte ein weiterer Bindungspartner der LASP-1-SH3-Domäne identifiziert werden: das Protein ZO-2 (Zonula Ocludens Protein 2), welches wie LASP-1 im Zytosol und im Zellkern vorliegt (Mihlan, Reiss et al. 2013). Mihlan et al. konnten nachweisen, dass eine Phosphorylierung von LASP-1 an Ser 146 zwar zu einer Abnahme

1. Einleitung

der Bindung zwischen LASP-1 und Zyxin sowie LPP führt, die Bindung an ZO-2 davon aber unbeeinflusst bleibt. Gleichzeitig führt eine Forskolin-Stimulation der Zellen zu einer Zunahme an LASP-1 und phospho-LASP-1 sowie ZO-2 im Zellkern. LASP-1 besitzt kein sogenanntes nukleäres Importsignal. Über die Bindung an ZO-2 könnte aber ein Transport in den Zellkern ermöglicht werden, um dort möglicherweise Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen (Mihlan, Reiss et al. 2013).

Mit seinen verschiedenen Domänen und den bekannten Interaktionspartnern stellt LASP-1 ein vielseitiges Protein dar, das durch seine ubiquitäre Expression in humanen Geweben eine funktionelle Rolle in physiologischen Prozessen der Zellmotilität- und Regulation spezifischer Zellfunktionen einnehmen kann. LASP-1 ist zum Beispiel in humaner Magenschleimhaut physiologisch hoch exprimiert (Orth, Cazes et al. 2015). Im Tiermodell (Kaninchen) konnte eine klare Korrelation zwischen der Histamin-induzierten, cAMP-abhängigen LASP-1-Phosphorylierung in Parietal-Zellen und deren sekretorischen Aktivität gezeigt werden. Eine Forskolin - induzierte LASP-1-Phosphorylierung führte zudem zu einer intrazellulären Translokation von LASP-1 in Bereiche der aktiven HCL-Sekretion, in die intrazellulären Canaliculi (Chew, Parente et al. 2000). Die genaue Funktion von LASP-1 im Prozess der physiologischen Magensäure-Sekretion bleibt bislang unklar. In LASP-1 Knock-Out-Mäusen (LASP1 ^{-/-}) konnte eine im Vergleich zum Wild-Typ unveränderte basale HCL-Sekretion der Parietalzellen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich im Knock-Out-Modell eine verstärkte Säuresekretion nach Histamin-Stimulation, sowie eine verzögerte Abnahme der Säuresekretion nach Zugabe eines Säureblockers (Ranitidin) (Chew, Chen et al. 2008). Eine solche Säureblockade erfolgt durch endozytotische Prozesse der entsprechenden Kanalproteine (H⁺ / K⁺ - ATPase) – die Untersuchungen von Chew et al. (2008) deuten somit auf eine mögliche, physiologische Beteiligung von LASP-1 in diesen Endozytose-Prozessen hin.

Ebenso im Tiermodell (Ratte) konnte eine physiologische Expression von LASP-1 im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden, mit sehr hoher Expression im Cerebellum, Cortex-Arealen und im Hippocampus und relativ dazu geringerer Expression z.B. im Bereich des Hirnstamms. In den untersuchten Geweben war LASP-1 vor allem im neuronalen Zellkörper und in den sogenannten dendritischen Spines, Punkten der Zell-Zell-Interaktion und postsynaptischen Fortleitung der durch Bindung von

1. Einleitung

Neurotransmittern ausgelösten Signale, lokalisiert. Die Verteilung von LASP-1 in sich entwickelnden hippocampalen Neuronen verändert sich mit fortschreitender Entwicklung. In vitro ist LASP-1 in hippocampalen Neuronen zunächst in den Wachstumskegeln der aussprossenden Axone, erst später (nach 4-7 Tagen) entlang der Dendriten nachzuweisen (Phillips, Anderson et al. 2004). Diese dynamische Veränderung der Lokalisation von LASP-1 in sich entwickelnden Neuronen deutet auf eine Rolle von LASP-1 in der neuronalen Entwicklung hin. Diese Beobachtung wird durch den Nachweis einer gesteigerten Expression von LASP-1 in PC 12-Zellen (Ratte, abgeleitet aus Phäochromozytom) nach Exposition gegenüber neuronalen Wachstumsfaktoren (NGF, nerve growth factor), gestützt (Chen, Maures et al. 2008).

Nach der Erstbeschreibung von LASP-1 in Lymphknoten-Metastasen von Mamma-Carcinomen wurde LASP-1 in mittlerweile zahlreichen Tumorentitäten auf seine pathophysiologische Funktion hin untersucht. Eine besonders starke Überexpression von LASP-1 gegenüber normalem, nicht entartetem Gewebe konnte in Brustkrebs-Zellen nachgewiesen werden (Vergleiche Figure 3: Orth, Cazes et al. 2015). Grunewald et al. konnten nach siRNA-Knockdown von LASP-1 eine deutlich verminderte Proliferation und Migration von Brustkrebszellen (BT-20) beobachten. Eine Überexpression von LASP-1 in PTK-2 Zellen führte im Gegensatz dazu zu einer Steigerung der Migrationsfähigkeit (Grunewald, Kammerer et al. 2006). Diese Beobachtungen der verminderten Migration- und Proliferation nach LASP-1-silencing konnten unter anderem in Ovarial-Carcinomen (Grunewald, Kammerer et al. 2007), in Ösophageal-Carcinomen (He, Yin et al. 2013) und hepatozellulären Carcinomen (Wang, Li et al. 2013) unabhängig bestätigt werden. Passend zu den Resultaten der Proliferations-Assays führte eine LASP-1-Depletion in Brustkrebs- und Ovarialkrebs-Zellen zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus (Grunewald, Kammerer et al. 2006, Grunewald, Kammerer et al. 2007). Diese Beobachtungen deuten auf eine Rolle von LASP-1 in der Zellzyklus-Regulation in humanen Tumorentitäten hin.

Durch einen Nachweis von LASP-1 in humanen Tumorproben erlangen die in vitro erhobenen Daten klinische Relevanz. So konnte eine signifikante positive Assoziation zwischen der LASP-1-Positivität (Immunhistochemie) und der Tumorgroße (> T1-Tumorstadium, $p=0.0159$) sowie dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen

($p=0.0066$) in Brustkrebs-Präparaten von 83 Patientinnen hergestellt werden (Grunewald, Kammerer et al. 2007). Auch im klarzelligen Nierenzell-Carcinom konnte eine Korrelation zwischen der LASP-1-Expression und der Tumorgröße ($p=0.002$), dem TNM-Stadium ($p=0.005$), dem Auftreten von Tumor-Rezidiven ($p=0.006$) und der Mortalität der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (Yang, Zhou et al. 2014). Die Assoziation mit einem schlechteren Überleben bei zytosolischer LASP-1-Expression der Tumoren bestätigt sich im hepatozellulären Carcinom: Wang et al. identifizierten eine zytosolische LASP-1-Expression als unabhängigen Prädiktor eines signifikant schlechteren Gesamtüberlebens der betroffenen Patienten (Wang, Li et al. 2013).

1.3 Zielsetzung der Dissertation

Das LIM- und SH3-Domänen Protein LASP-1 wurde in Vorarbeiten zu dieser Dissertation in Medulloblastomen mit einem Zugewinn auf Chromosom 17q als funktionell relevantes und als eines der am stärksten überexprimierten Proteine auf Chromosom 17q in Medulloblastomen identifiziert. Medulloblastome mit einem Isochromosom 17q oder einem Zugewinn auf Chromosom 17q sind häufig, neigen sehr stark zur Metastasenbildung und sind mit einer entsprechend schlechten Prognose verbunden. Das für LASP-1 codierende Gen ist auf dem Chromosom 17q lokalisiert und qualifiziert als mögliches Kandidaten-Onkogen, welches für den aggressiveren Verlaufstyp dieser Tumore mit verantwortlich gemacht werden könnte.

Ziel dieser Dissertation war es daher, die bisherigen Erkenntnisse über LASP-1 (insbesondere die gesteigerte Migrations- und Proliferationsfähigkeit von LASP-1-überexprimierenden Zellen), im humanen Medulloblastom zu überprüfen, und somit das Transkript eines Kandidaten-Onkogen auf Chromosom 17q in Medulloblastomen *in vitro* zu charakterisieren.

Das LASP-1 Expressionsmuster wurde zunächst in etablierten Medulloblastom-Zelllinien mittels Immunfluoreszenz-Aufnahmen dargestellt. Migrations-, Proliferations- und Adhäsionsassays mit LASP-1-depletierten und unbehandelten Medulloblastom-Zellen wurden durchgeführt um die funktionelle Rolle von LASP-1 in dieser Tumorentität zu charakterisieren. Die aus diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse

1. Einleitung

sollten darüber hinaus eine experimentelle Grundlage für parallel am deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Pfister) durchgeführte Studien (insbesondere Immunhistochemie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung) mit Tumorproben und Korrelationsanalysen mit klinischen Daten der betroffenen Patienten, darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kulturzellen

DAOY, D 283Med, UW 228-2, D425Med	Medulloblastom-Zelllinien (human)
-----------------------------------	-----------------------------------

2.1.2 Medien, Lösungen und Seren in der Zellkultur

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
DMEM (Dulbecco`s modified Eagle Medium)	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
MEM Alpha Medium (Minimal Essential Medium)	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
Improved MEM (Richter`s modification)	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
OPTI-MEM® - I (Reduced Serum Medium)	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
Penicillin / Streptomycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution (1x) T3924	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Fibrinogen	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.3 Reagenzien für Transfektionsversuche, siRNA-Sequenzen

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
HiPerFect ® Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland

2. Material und Methoden

<i>siRNA</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-LASP-1 (siRNA „A“)	5′ - AAG GTG AAC TGT CTG GAT AAG - 3′ (Target –Sequenz, entspricht Basen 49 – 69) 5′ - CUUAUCCAGACAGUUCACCDTDT - 3′ (Antisense Sequenz)	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
Anti-LASP-1 (siRNA „C“)	5′ - AAGCATGCTTCCATTGCGAGA - 3′ (Target-Sequenz, entspricht Basen 80 – 100) 5′ - UCUCGCAAUGGAAGCAUGCUU –3′ (Antisense Sequenz)	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
siControl Non-Targeting siRNA #5 by Dharmacon	5′ - UGGUUUACAUGUCGACUAA – 3′	Dharmacon, Lafayette, CO, USA

2.1.4 Reaktionskits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, WI 53711 USA

2.1.5 Primär - und Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse und Immunfluoreszenz

Primärantikörper

<i>Bezeichnung/Antigen</i>	<i>Typ</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
LASP-1	polyklonal, Kaninchen	1:6000 (Western-Blot) 1:1000 (Immunfluoreszenz)	immunoGlobe ®, Himmelstadt, Deutschland
β-Aktin	polyklonal, Kaninchen	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

2. Material und Methoden

LASP anti- phospho Ser 146 IG 566	polyklonal Kaninchen	1:5000 (Western-Blot) 1:500 (Immunfluoreszenz)	immunoGlobe [®] , Himmelstadt, Deutschland
dpLASP	polyklonal, Kaninchen	1:300 (Immunfluoreszenz)	immunoGlobe [®] , Himmelstadt, Deutschland

Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse

<i>Bezeichnung/Antigen</i>	<i>Markierung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Goat-anti-rabbit IgG (polyklonale 1. AK)	Meerrettich-Peroxidase	1:5000	Bio-Rad, München, Deutschland
Goat-anti-mouse IgA (monoklonale 1. AK)	Meerrettich-Peroxidase	1:5000	Bio-Rad, München, Deutschland

Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

<i>Bezeichnung/Antigen</i>	<i>Markierung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Goat-anti-rabbit IgA	Cy3-labeled	1:500	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Oregon Green Phalloidin	FITC	1:50	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Chemikalien, Reagenzien

<i>Name/Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Acrylamidlösung (Rotiphorese [®] Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ECL und ECL plus	Amersham, München, Deutschland
Entwicklerlösung (Diamino-Benzidin)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2. Material und Methoden

Fibrinogen	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad, München, Deutschland
Mowiol 4-88	Hoechst, Frankfurt, Deutschland
NaOH 2N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Protein Grössenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Temed	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween	Serva, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
24 mm Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
6, 48 und 96-Well Platten	Cellstar, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Boyden Chamber	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Cryotube Vials / Kryoröhrchen	Nunc®, Waltham MA, USA
Desinfektionsmittel	Teralind liquid, SchülkeMayr, Norderstedt, Deutschland
Filme für Chemilumineszenz	X-Ray Film Suer RX, FUJI medical GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Insulinspritzen Omnican 40 1,0 ml	B.Braun, Melsungen Deutschland
Nitrocellulosemembran	PROTRAN®, Schleicher&Schuell, Bioscience GmbH, Dassel, Deutschland
Objektträger	Hartenstein, Würzburg, Deutschland Menzel, Gläser GmbH, Braunschweig, Deutschland
Parafilm M	American National Can, Greenwich CT, USA
Pipettenaufsätze	2, 10, 25 ml costar stripette, Corning, New York, USA

2. Material und Methoden

Pipettenspitzen	Biosphere Filter-Tips, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	15 ml /50 ml: Greiner, Frickenhausen, Deutschland 1,5 ml /2ml: Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitshandschuhe	Kimberly-Clark, SafeSKIN PFE, Zaventem, Belgien
Zellkulturflaschen	T25 & T75 Cellstar. Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

2.1.8 Puffer und Lösungen

10 % APS	1g Ammoniumpersulfat in 10 ml H ₂ O
Elektrophoresepuffer 1L	25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS 192 mM Glycin pH 8.9
Transferpuffer 10L	25 mM Tris (30g) 192 mM Glycin (144g) 20% Methanol (2L) pH 10.0
PFA Lösung	4% Paraformaldehyd in PBS
Mowiol	Mowiol 4-88; 50% Glycerol; 0,2 M Tris pH 8.5; 2.5% DABCO
PBS (steriles phosphate buffered saline)	80g (1.37 M) NaCL 2g (0.027 M) KCL 26,8g (0,1 M) Na ₂ HPO ₄ -7 H ₂ O 2,4g (0,018 M) KH ₂ PO ₄ ad 1L dd H ₂ O; pH 7.4 einstellen; autoklavieren
Ponceau S	0,5 % Ponceau S in 10% -ige Essigsäure
Sammelgelpuffer (Puffer A)	0.5 M Tris/HCL pH 6.7
Trenngelpuffer (Puffer B)	3 M Tris / HCL pH8.9
SDS Stopp 3x	200 mM Tris / HCL pH 6,7 6 % (w/v) SDS

2. Material und Methoden

	15 & (w/v) Glycerin 30 µg / ml Bromphenolblau ad H ₂ O
0,1 % Triton / PBS	100 µl Triton X-100 in 100 ml PBS
3 % TBS-T Milch	3g (3% w/v) Milchpulver in 100ml TBS-T
0,1 % TBS-T	1 ml Tween; 1 l 1xTBS

2.1.9 Geräte und Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezeichnung / Modell und Hersteller</i>
Brutschrank	Labotect, Model 3336, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Noras, Würzburg, Deutschland
Feinwaagen	Universal und Type 1801, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filmentwickler	XOMAT M35, Kodak Industrie, Cedex, Frankreich OPTIMAX, PROTEC, Oberstenfeld, Deutschland
Hood, sterilGard	The Baker Company, Stanford, Maine, USA
Heizplatte	Stirrer/Hotplate, Corning, New York, USA
Magnetrührer	Ika, JankeKunkel, Staufen, Deutschland
Mikroinjektions-Spritzen	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikroskop	Lichtmikroskop: Axiovert 25, ZEISS, Jena, Deutschland
pH-Meter	PHM 82 Standard pH-Meter, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipette (elektrisch)	accu-jet pro, Brand, Wertheim, Deutschland
Pipette (manual)	2, 10, 20, 200, 1000 µl Eppendorf-Reference, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Brand GmbH+CO KG, Wertheim, Deutschland
Spannungsgeräte	PowerPac™ HC Power Supply, BIO-RAD Laboratories, Hercules CA, USA Power Pac™ 300 und Model 200/2.0 Power Supply BIO-RAD, Hercules CA, USA
Software	WIN MDI Microsoft Office 2010 Exel, Power Point, Word

2. Material und Methoden

Wasserbad	Julabo MB, Seelbach, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	Zellkultur: ROTANTA/S und ROTIXA/K (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) Tischzentrifuge: 5415 C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Kühlzentrifuge: 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkulturbedingungen

Die in dieser Arbeit genutzten, etablierten humanen Medulloblastom-Zelllinien DAOY (adhärent), D283Med (teiladhärent), UW 228-2 (adhärent), sowie D425Med (teiladhärent) wurden zuvor freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Stefan Pfister (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien DAOY und D283Med wurden im Vorfeld von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) erworben. Die Medulloblastom-Zelllinie UW 228-2 wurde freundlicherweise durch S. Clifford, Newcastle, United Kingdom, bereitgestellt. DAOY wurde im Jahr 1985 durch Jacobsen et al. aus einer Biopsie eines soliden, desmoplastischen cerebellären Medulloblastoms gewonnen und als Kultur-Zelllinie etabliert (Jacobsen, Jenkyn et al. 1985). Ebenso im Jahre 1985 wurde D283Med aus peritonealen, metastatischen Absiedlungen eines cerebellären Medulloblastoms etabliert und durch Friedmann et al. beschrieben (Friedman, Burger et al. 1985). UW 228-2 wurde durch Keles et al. im Jahre 1995 etabliert (Keles, Berger et al. 1995). Die Zelllinie D 425Med wurde aus dem cerebellären Medulloblastom eines 6-jährigen Patienten gewonnen (Bigner, Friedman et al. 1990). Für die Zelllinie D283Med wird ein Isochromosom 17q Status beschrieben (Bigner, Friedman et al. 1990), DAOY hingegen wird als Träger einer Trisomie des Chromosoms 17 charakterisiert (Castellino, De Bortoli et al. 2008). Eine initiale Karyotypisierung der Zelllinie UW228-2 beschreibt einen Verlust der Heterozygotie auf dem distalen Ende des Chromosoms 17p (Keles,

2. Material und Methoden

Berger et al. 1995). Für die Zelllinie D 425Med wird unter anderem ein Zugewinn auf Chromosom 17q beschrieben (Aldosari, Wiltshire et al. 2002).

Alle Zelllinien wurden bis zur einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml in verschiedenen großen Zellkulturflaschen (T25/T75) im Brutschrank unter einer mit CO₂-gesättigten (5%) Atmosphäre, und bei einer steten Temperatur von 37° C kultiviert.

Ein entsprechendes Wachstum der Zellen konnte bei den verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen Kulturmedien erreicht werden. Die Zelllinien DAOY und UW-228-2 wurden in DMEM (Dulbecco`s modified Eagle Medium, LifeTechnologies) mit 4.5g/L Glucose und L-Glutamin kultiviert. Die Zellen der Linie D 283Med wurden in MEM Alpha Medium (Minimal Essential Medium, LifeTechnologies) kultiviert; D 425Med wurde in Improved MEM (LifeTechnologies) kultiviert. Alle Medien wurden vor Nutzung mit hitzeinaktiviertem Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS; DAOY, D 283Med, UW 228-2: zu 10%; D 425Med: zu 20%) sowie zu 1% mit einer Streptomycin/Penicillin-Mischung versetzt. Die Nutzung der Zellen in den entsprechenden Experimenten erfolgte stets in den Passagen P2-P6. Zellen, die sich in höheren oder niedrigeren Passagen befanden, wurden nicht verwendet. Während der Kultivierung erfolgte eine regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle der Zellen auf Hinweise bakterieller Verunreinigung (verlangsamtes oder vermindert adhärentes Wachstum, vermehrtes Absterben der Zellen). Entsprechende Zellen wurden verworfen.

2.2.2 Lagerung, Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Lagerung der Zellen aller Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von - 80 °C. Auch zum Einfrieren wurden keine Zellen in höheren Passagen als P6 genutzt. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen in einer T25-Zellkulturflasche bis zu einem konfluierenden Wachstum kultiviert. Das vorhandene Medium wurde abgesaugt, restliches Medium durch einmaliges Waschen mit sterilem PBS (Phosphate Buffered Saline) entfernt, und die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung von der Wachstumsfläche abgelöst. Nach dem Zentrifugieren (s.2.2.3) wurde der Trypsin enthaltende Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml entsprechendem Medium aufgenommen. Dem Medium wurde zum Einfrieren 10% DMSO zugefügt. Die

2. Material und Methoden

Zellsuspension wurde zur Lagerung in 1,8 ml fassende Kryoröhrchen überführt. In einem Styropor-Rack wurden die Zellen zunächst für 4h bei -20°C, dann für 24h bei -80°C und letztlich in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, und in einem Wasserbad mit 37°C Temperatur wenige Minuten angetaut um die Zellsuspension dann zu 2,5 ml vorgelegtem Medium hinzuzufügen. Das Gemisch wurde zentrifugiert, der DMSO enthaltende Überstand verworfen, das Zellpellet in 5ml Medium aufgenommen und zunächst immer in eine T25-Zellkulturflasche überführt.

2.2.3 Splitten und Wachstum der Kulturzellen über mehrere Passagen

Nach dem Auftauen und erstem adhären Wachsen in einer T25-Flasche, wurde zum Splitten das vorhandene Medium abgesaugt, Reste des Mediums durch 2-maliges Waschen mit sterilem PBS (1ml bei T25-Flasche, 3ml bei T75-Flasche) entfernt, und den Zellen Trypsin-EDTA (auch hier 1ml bei T25-Flasche, 3ml bei T75-Flasche) hinzugegeben. Durch 2-minütige Inkubation mit Trypsin konnten die adhären Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden, durch Hinzufügen von 4ml (bei T75-Flasche: 9 ml) Medium zur entstandenen Zellsuspension, konnte die Wirkung des Trypsins gestoppt werden. Es folgte ein Zentrifugieren der Suspension bei 100 x g, der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 1ml (bei T75 in 3ml) resuspendiert und in gewünschter Verdünnung auf entsprechende Zellkulturflaschen oder Wells verteilt. Diese Prozedur wurde zur Vorbereitung aller nachfolgenden Versuche entsprechend angewendet. Die nur teiladhären wachsenden Zellen der Zelllinie D 283Med und D 425Med zeigten stets ausreichende Mengen adhären wachsender Zellen, die für die folgenden Versuche, wie oben beschrieben, genutzt und vorbereitet werden konnten.

2.2.4 Zell-Transfektion mittels Transfektionsreagenzien und siRNA-Komplexen

Um das Verhalten der verschiedenen Medulloblastom-Zelllinien in Abhängigkeit der LASP-1 Expression untersuchen zu können, wurde als grundlegendes Prinzip für die folgenden Versuche in dieser Arbeit die Methode der RNA-Interferenz mittels siRNA (short interfering RNA) angewendet. RNA-Interferenz mittels doppelsträngiger RNA-Moleküle wurde zunächst am Beispiel von *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire, Xu et al. 1998) um wenig später auch zur Regulation der Proteinexpression in Säugetierzellen in vitro etabliert zu werden (Elbashir, Harborth et al. 2001). Ziel dieser Methode ist es, durch Transfektion doppelsträngiger siRNA-Oligonukleotide in lebende Zellen eine Hemmung der zellulären Proteinexpression auf post-transkriptioneller Ebene, zu erreichen. Mit Hilfe von Transfektionsreagenzien werden die synthetisch erstellten Oligonukleotide in das Zellinnere verbracht, wo diese durch die sogenannten Dicer-Ribonuclease gebunden werden und dem als RNA induced silencing complex bezeichneten Enzymkomplex zugeführt werden. In diesem Komplex werden die Doppelstränge der zugeführten siRNA entwunden, der zur zellulären mRNA komplementäre (antisense) Strang verbleibt im Enzymkomplex, der zur mRNA identische Strang (sense) wird abgebaut. Es erfolgt der Schritt der Hemmung der Proteinexpression, indem der zum eingebrachten antisense Strang komplementäre intrazelluläre mRNA Strang zerstört wird. Die Proteinbildung, z.B. von LASP-1, wird damit unterbunden. Dieser Prozess wird als siRNA – Knockdown oder auch als siRNA – silencing bezeichnet (Novina and Sharp 2004).

Die Medulloblastom-Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden (im Folgenden als siRNA „A“ und „C“ bezeichnet) transfiziert, die sich gegen folgende LASP-1 – Sequenzen richten:

A: 5´-AAG GTG AAC TGT CTG GAT AAG-3´ (entspricht Basen 49-69)

C: 5´-AAG CAT GCT TCC ATT GCG AGA-3´ (entspricht Basen 80-100)

2. Material und Methoden

Insgesamt wurden in Vorversuchen drei verschiedene siRNA-Konstrukte, sowohl einzeln als auch in Kombination miteinander, an den Medulloblastom-Zellen getestet, wobei mit den o.g. Oligonukleotiden die effizientesten Knockdown-Ergebnisse erzielt werden konnten. Alle Oligonukleotide, inklusive der Kontroll-siRNA, wurden von Dharmacon RNA Technologies (Lafayette CO, USA) bezogen.

Für den Prozess der Transfektion wurde das Transfektionsreagenz HiPerFect® (Qiagen, Hilden, Deutschland) genutzt. Vor der Transfektion wurden die jeweiligen Zellen in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro 6-Well ausgebracht, und unter den bereits genannten für die jeweilige Zelllinie optimalen Zellkulturbedingungen für 24 Stunden bis zu einer Konfluenz von 30-50% inkubiert. Die Transfektion erfolgte jeweils mit 2.5µg (5µl Stocklösung) siRNA. Hierzu wurde am Tag der Transfektion die siRNA Stocklösung in 100µl Medium mit reduziertem Serum-Anteil, Opti-MEM®, (Reduced-Serum Medium Opti-MEM®, Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verdünnt, sowie zusätzlich mit 5 µl HiPerFect® Transfektionsreagenz in 100µl OptiMEM® vermischt. Dieses Gemisch (zusammen 210µl) wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das jeweilige Zellmedium wurde zwischenzeitlich abgesaugt und anschliessend durch 1ml OptiMEM® ersetzt. Die siRNA-Komplexe wurden tröpfchenweise zu dem Medium in die 6-Wells gegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen über 4 Stunden. Anschliessend wurde das mit Transfektionsreagenz und siRNA versetzte Medium wieder abgesaugt und durch das für die Zellen spezifische Medium mit 20% FBS ersetzt. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 42-48 Stunden, ehe die Zellen für die jeweiligen Experimente eingesetzt wurden. Als Kontrollen wurden parallel Transfektionen mit einer nicht gegen LASP-1-Sequenzen gerichteten Kontroll-siRNA (siControl Non-Targeting siRNA #5, Dharmacon), sowie mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect® ohne siRNA durchgeführt, um mögliche toxische Effekte der benutzten Reagenzien auf die Zellen von einem LASP-1-Knockdown-Effekt abzugrenzen. Alle Experimente wurden nach Optimierung des Transfektionsverfahrens in mindestens drei unabhängigen Versuchen durchgeführt, um repräsentative und statistisch valide Ergebnisse in dieser Arbeit darstellen zu können.

2.2.5 Denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli

Die denaturierende Gelelektrophorese sowie die anschließende Western Blot Analyse sind etablierte Methoden um einen qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen z.B. in gewonnenen Zell-Lysaten zu ermöglichen. Alle in dieser Arbeit mittels Western Blot zu analysierenden Proben wurden in SDS-Stopp-Puffer aufgenommen, anschließend für 5 Minuten bei 95° gekocht, somit denaturiert und durch SDS negativ beladen. Für die spätere Verwendung konnten die Proben dann bei -20°C gelagert werden.

Grundlage für die Western Blot Analyse ist die vorweg durchgeführte Auftrennung der in der Probe enthaltenen Proteine in einer Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Die in dieser Arbeit genutzte SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese wurde mit 10%-Acrylamid enthaltenden Trenngelen sowie darüber geschichteten Sammelgelen nach folgender Zusammensetzung durchgeführt:

	Sammelgel	10% - Trenngel
Acrylamid-Lösung	0,7 ml	6,6 ml
0,5 M Tris-Puffer (A), pH 6,7	0,65 ml	-
3 M Tris-Puffer (B), pH 8,9	-	2,5 ml
SDS 10%	50 µl	0,2 ml
dH ₂ O	3,6 ml	10,6 ml
Temed	5,0 µl	12,5 µl
APS 10%	200 µl	200 µL

Die in beiden Gelen verwendete Acrylamid-Lösung ist eine Fertiglösung (30% Acrylamid, 0,8% Bis-Acrylamid) der Firma Roth (Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Die in SDS-Stopp aufgenommenen Proben (max. 30µl) wurden mittels Hamilton-Spritze in die vorgefertigten Taschen des Sammelgels gegeben. Bei jeder Gelelektrophorese wurde zusätzlich eine Probe eines Proteinstandards aufgetragen, um die identifizierten

Proteine später einer definierten molekularen Größe zuordnen zu können. Die zuvor durch SDS negativ beladenen Proteine wandern bei dem hier angewendeten Prinzip im elektrischen Feld, werden dabei zunächst im Sammelgel bei einer angelegten Spannung von 70V in einer gemeinsamen Front konzentriert, um dann im Trenngel entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt zu werden. Die angelegte Spannung wurde nach Erreichen der gemeinsamen Front im Sammelgel auf 150V erhöht.

2.2.6 Western Blot nach Towbin und Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern

Um die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine mittels spezifischer Antikörper darstellbar machen zu können, erfolgte als nächster Schritt in einem sogenannten Western Blot der Transfer der Proteine vom Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Towbin, Staehelin et al. 1979). Dieser Transfer erfolgte in einer Blotkammer über 1 Stunde, bei 2 A und bei 4°C Umgebungstemperatur. Nach erfolgtem Transfer wurde die nun mit den Proteinen beladene Nitrocellulosemembran in Ponceau-S-Lösung über wenige Minuten gefärbt, anschließend der Hintergrund mit dH₂O wieder entfärbt. So konnten die Proteinbanden bereits erstmals dargestellt werden, der stattgefundenen Proteintransfer konnte dokumentiert werden. Die Intensität der verschiedenen Banden in der Ponceau-Färbung diente zudem als Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran mit dH₂O und TBS wieder entfärbt.

Vor der Zugabe des Primärantikörpers wurden freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran durch Inkubation mit einem Blockmedium (3 % TBS-T Milk) über 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt.

Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser wurde in TBST-Milk verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht unter permanenter Bewegung auf dem Schüttler. Am Folgetag folgte nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST-Milk über je 10 min der Nachweis des Primärantikörpers. Dies erfolgte durch einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Auch dieser wurde in Blockmedium verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung auf die Membran aufgebracht. Nach einem letzten Waschschrift über 15 min mit PBS wurden

die Membranen mit dem Detektionsmedium ECL, einem Mix aus zwei Lösungen der Firma Amersham, bedeckt. Nach 1 min Inkubation wurde dieser Mix wieder entfernt, die Nitrocellulosemembran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und sofort in der Dunkelkammer für wenige Sekunden bis mehrere Minuten auf einem Detektionsfilm exponiert. Die auf den Filmen dargestellten Banden konnten mit den aufgetragenen Proteinstandards verglichen und bei Bedarf densitometrisch quantifiziert werden. Die Darstellung der zu untersuchenden Proteine erfolgte immer parallel zu einer Darstellung von β -Aktin als Ladungskontrolle. Der Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen konnte durch den Western Blot sowie durch die vorangegangene Ponceau-Färbung geschehen.

2.2.7 Immunfluoreszenz

Zur Darstellung der Lokalisation der Proteine LASP-1 und F-Aktin in den verwendeten Medulloblastom-Zellen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen am Tag vor Färbung auf sterilen Deckgläschen in 6-Well-Platten im entsprechenden Medium kultiviert, um bei der Färbung eine Konfluenz von ca. 70%, zu erreichen.

Am Tag der Färbung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen über 10 Minuten in 4%-Paraformaldehyd (PFA) auf Eis fixiert, über 10 Minuten mit 50mM NH_4Cl blockiert, über weitere 10 Minuten in 0,1% Triton/PBS permeabilisiert und letztlich 30 Minuten lang mit 3% goat serum in 0,1% Triton/PBS geblockt. In Zwischenschritten wurden die Deckgläschen mit den darauf fixierten Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Nach dem Blocken und erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Hierzu wurde der jeweilige Primärantikörper in 1ml 3% goat serum in 0,1% Triton/PBS verdünnt auf die Zellen gegeben um diese anschließend für 1h bei 37°C zu inkubieren. Nach erneutem gründlichem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des entsprechenden Zweit-Antikörpers. Als Zweit-Antikörper für LASP-1 und phospho-LASP-1 wurde ein Cy3 (Indocarbocyanin) – markierter IgA - Antikörper (goat-anti-rabbit) verwendet, der in 3%-goat serum verdünnt wurde. Gleichzeitig zur Inkubation mit dem Zweit-Antikörper erfolgte die Färbung des Aktins mit Oregon-green-Phalloidin –

2. Material und Methoden

hierbei ist keine Markierung mit einem Zweitantikörper notwendig. Es erfolgte eine einstündige Inkubation (abgedunkelt und bei Raumtemperatur) der Zellen mit dem Gemisch aus Zweit-Antikörper und Oregon-green-Phalloidin. Nach erneutem, mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte ein letztes Reinigen mit destilliertem Wasser. Der vorbereitete Objektträger wurde mit einem Tropfen (10 μ l) Mowiol betropft, die Deckgläschen mit den darauf befindlichen adhären, fixierten und nun gefärbten Zellen wurden in diesem Mowiol eingebettet. Über die darauffolgende Nacht wurden die Objektträger bei 4°C gekühlt gelagert, um das Mowiol antrocknen zu lassen. Am Folgetag konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Dieses Vorgehen wurde für alle genutzten Zelllinien gleichermaßen angewendet. Für die Immunfluoreszenz-Darstellung der Zellen der Linien D 283Med und D 425Med wurden die Deckgläschen aufgrund verminderter Adhärenz der Zellen vor Aussaat der Zellen über Nacht mit Kollagen beschichtet.

2.2.8 Prüfen der Viabilität und Zellzahlbestimmung der Kulturzellen nach Färbung mit Trypan-Blau

Vor den im Folgenden beschriebenen Migrations-, Proliferations-, und Adhäsionsassays erfolgte je eine Viabilitätsdarstellung und Auszählung der transfizierten als auch der nicht transfizierten Kulturzellen, um toxische Effekte der Transfektionsreagenzien auf die Zellen frühzeitig im Versuchsaufbau zu erkennen und bei Bedarf eine bestimmte Zellzahl pro Volumeneinheit einzustellen. Die Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe einer Färbung mit dem sauren Farbstoff Trypan-Blau überprüft. Mit diesem Farbstoff ist es möglich, viable Zellen von toten, nekrotischen Zellen unter dem Lichtmikroskop zu unterscheiden, da eine Anfärbung der Zellen nur erfolgt wenn die Permeabilität, die Integrität der Zell-Membran gestört ist. Aus den zu untersuchenden Zellsuspensionen wurden je 2 μ l der Suspension entnommen und zu 2 μ l vorgelegtem Trypan-Blau hinzugegeben. Diese Lösung (nun 4 μ l) wurde vorsichtig in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter einem Phasenkontrastmikroskop konnten in dieser Kammer die durch das Trypan-Blau angefärbten, toten Zellen von den viablen Zellen unterschieden und ausgezählt werden – tote Zellen färbten sich hierbei blau an. Durch den erhaltenen Mittelwert der viablen Zellen pro Quadrant der Neubauer-Zählkammer, konnte die Anzahl der viablen Zellen in

der eigentlichen Zellsuspension hochgerechnet werden und durch Zugabe von Medium oder Re-Suspension eines Zellpellets in einer geringeren Menge Medium für die folgenden Versuche angepasst werden.

2.2.9 Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit von Medulloblastom-Zellen in Abhängigkeit der LASP-1 Expression wurde mit einem modifizierten Boyden Chamber Assay mit BSA (Bovine Serum Albumin)-beschichteten Kammern (Transwell chambers, Corning Star) mit einer Porengröße von 8µm Durchmesser durchgeführt. Sofern im Versuchsaufbau vorgesehen, wurden die entsprechenden Zellen, wie unter 2.2.4 beschrieben, mit LASP-1 siRNA transfiziert. Alle Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn des Migrationsversuches auf nährstoffarmes Medium mit 1% FBS umgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen abtrypsiniert, um nach Überprüfung der Viabilität und Auszählung der Zellen in der Neubauerkammer in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen in 100 µl Inkubationsmedium mit 1mM MgCl₂ resuspendiert zu werden. Die Unterseite der die Filterkammer teilenden Membran, wurde vor Beginn der Migrationsversuche mit 100µl Fibronectin-Lösung (1mg/ml) als chemotaktisch wirkende Substanz, benetzt. Die Zellsuspension wurde anschließend in den oberen Teil der Kammer, die Filterkammer, pipettiert. In den unteren Teil der Kammern wurden 500µl nährstoffreiches Medium (mit 10% FBS) pipettiert. Die Zellsuspension wurde anschließend über 4h bei 37°C inkubiert. Die Zellen konnten somit über 4h aus dem nährstoffarmen in das nährstoffreiche Medium durch die Membran migrieren. Nach 4h wurden die an der Oberseite der Membran verbliebenen, nicht migrierten Zellen vollständig mit einem Wattestäbchen entfernt. An der Unterseite der Membran befanden sich nun die migrierten Zellen, die nachfolgend mit einer 1-prozentigen (w/v) Kristallviolett-Lösung in 2% Ethanol eingefärbt wurden. Nach einem Waschschriff mit dH₂O wurde das durch die Zellen gebundene Kristallviolett durch 20-minütige Inkubation der Membran in 200µl Essigsäure (10%) extrahiert. Am Ende des Migrationsassays konnte somit eine gefärbte Essiglösung erhalten werden, deren Farbintensität von der Anzahl der migrierten Zellen bestimmt wurde. Die Absorption der gefärbten Lösungen wurde anschließend am ELISA-Reader bei 595nm gemessen. Die erhaltenen Werte spiegelten die Anzahl der migrierten Zellen wieder, wobei eine höhere

Anzahl migrierter Zellen zu einer stärkeren Absorption führte. Als Eichung erfolgte die Messung der Absorption von dH₂O, bei entsprechend fehlender Absorption einer Migration von 0% entsprechend. Die mit der Migration korrelierenden Werte der Absorption wurden in ein Verhältnis zu den Kontrollen gesetzt und in Prozent angegeben. Bei jedem Versuchsaufbau erfolgte zusätzlich zur Messung transfizierter Zellen auch eine Messung unbehandelter und nur mit Transfektionsreagenz aber ohne siRNA behandelter Zellen.

2.2.10 Proliferationsassay

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens verschiedener Medulloblastom - Zelllinien in Abhängigkeit eines vorangegangenen, LASP-1-spezifischen siRNA Knockdowns, erfolgte mit dem *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)*. Dieser 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) - basierte Assay ist die Weiterentwicklung einer im Jahre 1983 von T. Mosmann beschriebenen Methode der Viabilitäts - und Proliferationsmessung von Zellen mittels Kolorimetrie (Mosmann 1983). Die Medulloblastom-Zellen wurden für diese Messung zunächst in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro 48-Well ausgesät und bei 37°C über Nacht kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion mit 0.2 µg LASP-1-spezifischer siRNA (Prozess der Transfektion s. 2.2.4). Die Zellen wurden für weitere 48 Stunden bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden entsprechend den Hersteller-Vorgaben im Protokoll 30µl der fertigen MTT-Färbelösung pro Well hinzugegeben. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation bei 37° wurden pro 48-Well 200µl Stop-Lösung des Assays hinzugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595nm am ELISA Reader gemessen. Die Absorptionsmessung erfolgte im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen, sowie ebenso im Vergleich mit Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz sowie mit non-sense siRNA behandelt wurden. Die Proliferationsrate der behandelten Zellen wurde in Prozent der in der Absorptionsmessung für unbehandelte Zellen erhaltenen Werte angegeben.

2.2.11 Adhäsionsassay

Neben dem Migrations- und Proliferationsverhalten der o.g. Medulloblastom-Zellen wurde in dieser Arbeit auch deren Adhäsionsverhalten in Abhängigkeit der LASP-1-Expression, untersucht. Hierzu wurden zunächst 48-Wellns mit 10 µg/ml Fibrinogen (Sigma) über Nacht und bei 4°C beschichtet. Das Fibrinogen wurde hierzu in zu 0.1% mit BSA (Bovine Serum Albumin) versetztem PBS verdünnt. Am Folgetag wurden die im Assay eingesetzten Zellen aus den entsprechenden Kulturflaschen, wie in 2.2.3 beschrieben, abgelöst. In den Waschschrinen wurde serumfreies Medium genutzt. Die Zellen wurden nach dem Ablösen in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml, in serumfreiem Medium resuspendiert. Je 200 µl dieser Zellsuspension wurden auf die beschichteten 48 Wells aufgebracht. Die Zellen wurden über 2h bei 37°C in den beschichteten Wells inkubiert. In dieser Zeit konnten die Zellen an der mit Fibrinogen beschichteten Oberfläche der Wells adhären. Nach 2h wurden nicht-adhärenente Zellen in einem vorsichtigen Waschschrin mit PBS entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden in 4% (w/v) Paraformaldehyd über 10 Minuten fixiert sowie in einem anschließenden Schrin mit 0.5% Kristallviolett für 20 Minuten eingefärbt. Überstehende Farblösung wurde anschließend in drei Waschschrinen mit PBS entfernt. Das verbleibende, von den fixierten, adhärenenten Zellen adsorbierte Kristallviolett wurde mit 10% Essiglösung wieder ausgewaschen. Die Absorption der dadurch entstandenen, gefärbten Lösung wurde dann am ELISA-Reader bei 595nm gemessen. Der Assay wurde mit transfizierten Medulloblastom-Zellen nach erfolgtem siRNA-Knockdown von LASP-1, sowie mit unbehandelten Zellen durchgeführt. Als Eichlösung am ELISA-Reader wurde parallel eine Messung mit dH₂O durchgeführt. Die Messwerte der Kontrollen (unbehandelte Zellen) wurden in der Auswertung als Referenz genutzt, davon abweichende Absorption, wurde hierzu ins Verhältnis gesetzt und in Prozent angegeben und spiegelte die Anzahl adhärenenter Zellen entsprechend wieder.

3. Ergebnisse

3.1 LASP-1 ist in Medulloblastom-Zelllinien hoch exprimiert und im Zytosol mit F-Aktin ko-lokalisiert

In Vorarbeiten zur Expression und Lokalisation von LASP-1 in humanen Zelllinien wurde LASP-1 als überwiegend im Zytosol vorliegend und in Ko-Lokalisation mit F-Aktin beschrieben (Schreiber, Moog-Lutz et al. 1998, Chew, Chen et al. 2002, Butt, Gambaryan et al. 2003). Die Expressions- und Lokalisationsmuster von LASP-1 in Medulloblastom-Zelllinien sind bisher nicht bekannt. Um diese Muster zu charakterisieren, wurden zunächst Immunfluoreszenzaufnahmen der Zelllinien DAOY, UW 228-2, D 425Med sowie D 283Med, wie unter 2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 3 verdeutlicht zunächst die starke Expression des LASP-1-Proteins in Medulloblastom-Zellen, die visuell der Expression von F-Aktin in etwa entspricht.

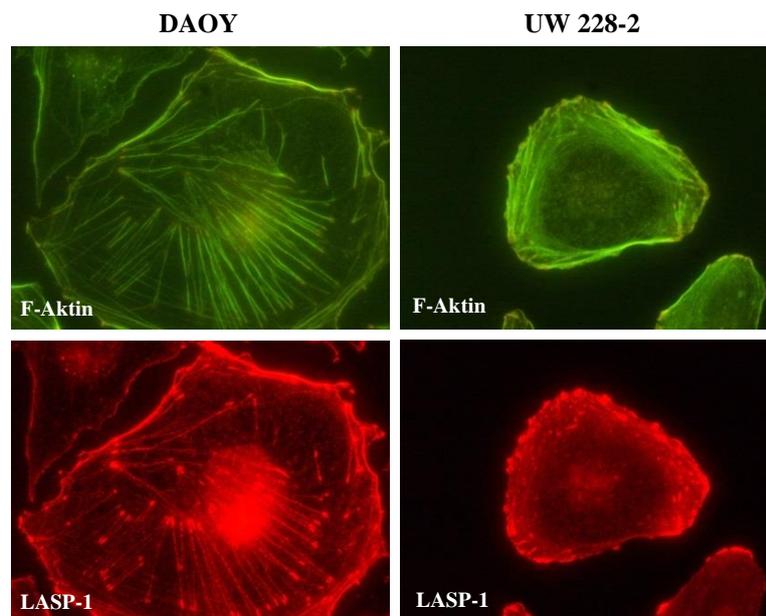


Abbildung 3: Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Zelllinien DAOY und UW 228-2 zur Darstellung des Verteilungsmusters von LASP-1 und F-Aktin in Medulloblastom-Zelllinien. Die Färbung von LASP-1 (rot) erfolgte mit einem polyklonalen LASP-1-Antikörper, die Färbung von F-Aktin (grün) mit Oregon Green Phalloidin. LASP-1 zeigt eine starke Ko-Lokalisation mit F-Aktin und Akkumulation im Bereich der fokalen Kontakte und Zellausläufer.

3. Ergebnisse

Weiterhin zeigt sich, dass LASP-1 auch in Medulloblastom-Zellen (DAOY, UW 228-2) im Zytosol, im Bereich der fokalen Kontakte und Zellausläufer, akkumuliert. Es bestätigt sich zudem eine starke Ko-Lokalisation mit F-Aktin.

Auch die teils in Suspension vorliegenden, teils adhärent wachsenden Zelllinien D 425Med und D 283Med zeigten ein entsprechendes Expressions - und Verteilungsmuster. Allerdings fällt auf, dass in den Zellen der Zelllinie D 283Med die Zellen weniger stark fokale Kontakte und Zellausläufer bilden, sowie im Vergleich mit den übrigen untersuchten Zelllinien eine weniger intensive Ko-Lokalisation von LASP-1 mit F-Aktin außerhalb der Zellausläufer vorliegt (Abbildung 4). Die Zellen der Linie D 425Med zeigen eine ähnliche LASP-1-Verteilung wie sie in den Zelllinien DAOY und UW 228-2 zu beobachten ist.

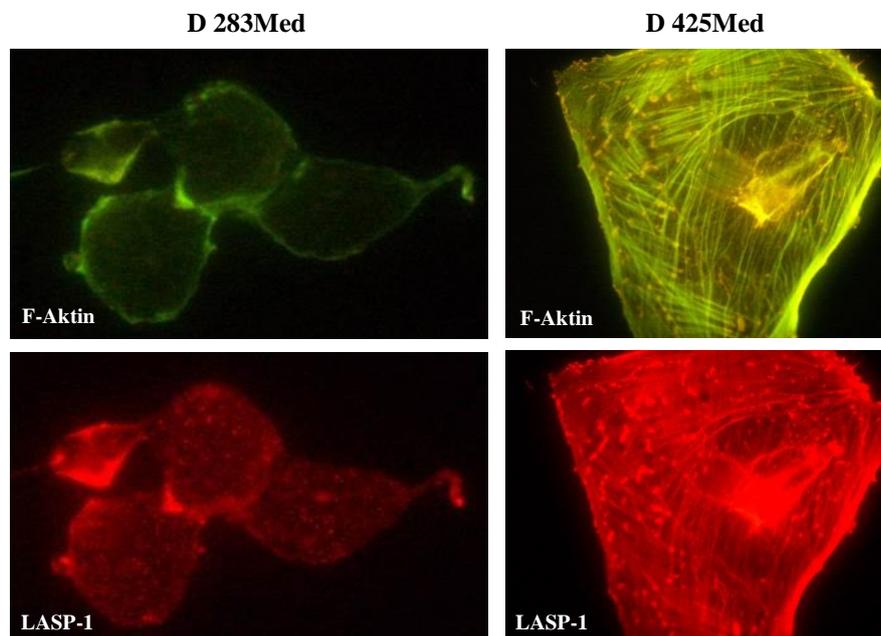


Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Zelllinien D 283Med und D 425Med. Färbung von LASP-1 (rot) mit einem polyklonalen LASP-1-Antikörper und F-Aktin (grün) mit Oregon Green Phalloidin. D 283Med und D 425Med sind im Gegensatz zu DAOY und UW 228-2 teiladhärent und teils in Suspension wachsenden Zelllinien. D 283Med: im Vergleich zu D 425Med, DAOY und UW 228-2 weniger stark ausgeprägte Ko-Lokalisation von LASP-1 mit F-Aktin.

3.2 Phosphoryliertes LASP-1 ist in Medulloblastom-Zelllinien überwiegend im Zellkern lokalisiert

LASP-1 kann durch PKA und PKG an Serin 146 (Ser146) phosphoryliert werden und somit in einer phosphorylierten (pLASP-1) und einer dephosphorylierten Form (dpLASP-1) vorliegen (Butt, Gambaryan et al. 2003). Der für die Immunfluoreszenz-Aufnahmen in Abbildung 3 und 4 genutzte LASP-1 Antikörper detektiert sowohl phospho- als auch dephospho-LASP-1. Bereits in diesen Aufnahmen fällt zusätzlich zur Ko-Lokalisation mit F-Aktin eine starke Akkumulation von LASP-1 im Zellkern auf, besonders akzentuiert in der Zelllinie DAOY (Abbildung 3).

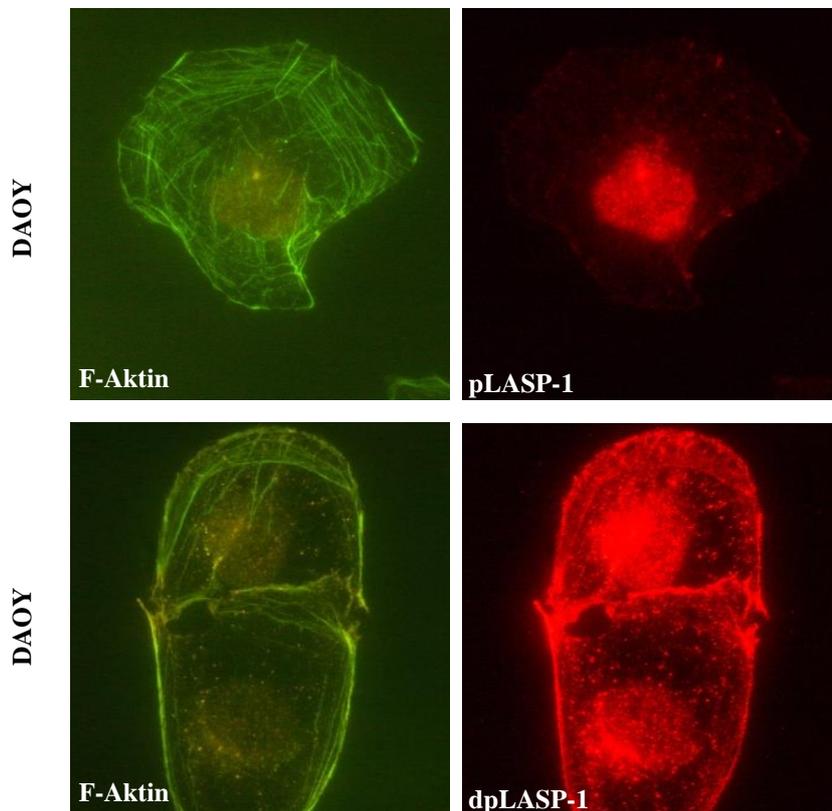


Abbildung 5: Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Zelllinie DAOY. Die Färbung von F-Aktin erfolgte mit Oregon Green Phalloidin, die Färbung von pLASP-1 mit LASP anti-phospho Ser 146 IG 566, sowie die Färbung von dpLASP-1 mit einem polyklonalen Antikörper gegen dephospho-LASP-1.

3. Ergebnisse

Um pLASP-1 von dpLASP-1 visuell unterscheiden zu können, wurden weitere Immunfluoreszenzen mit einem spezifisch gegen das an Ser146 phosphorylierte LASP-1 gerichteten Antikörper, angefertigt. Zudem erfolgte die Darstellung allein der dephosphorylierten Form von LASP-1, indem ein weiterer, nur gegen dpLASP-1 gerichteter Antikörper genutzt wurde.

Abbildung 5 und 6 verdeutlichen in den Zelllinien DAOY und UW 228-2 die unterschiedliche Verteilung von pLASP-1 und dpLASP-1. Während dpLASP-1 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu finden ist, scheint pLASP-1 fast ausschließlich perinukleär und im Zellkern vorzuliegen.

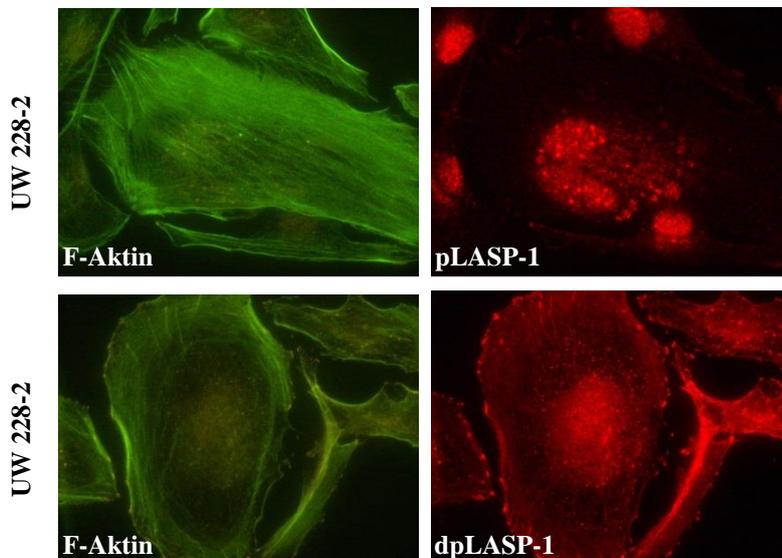


Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Zelllinie UW 228-2. Die Färbung von F-Aktin erfolgte mit Oregon Green Phalloidin, die Färbung von pLASP-1 mit LASP anti-phospho Ser 146 IG 566, sowie die Färbung von dpLASP-1 mit einem polyklonalen Antikörper gegen dephospho-LASP-1.

3.3 LASP-1-Knockdown hemmt die Proliferationsfähigkeit von humanen Medulloblastom-Zellen

Um die funktionelle Rolle von LASP-1 in Medulloblastom-Zellen zu charakterisieren, wurde zunächst der Einfluss von LASP-1 auf die Proliferationsfähigkeit

3. Ergebnisse

der Zellen der Linien DAOY, UW 228-2 sowie D 283Med, untersucht. Die Zellen wurden, wie unter 2.2.4 beschrieben, mit der Methode des siRNA-Knockdowns behandelt. Dabei wurden die Zellen mit einer Kombination zweier gegen LASP-1 gerichteter siRNAs (siRNA „A“ und „C“, s. 2.2.4), sowie mit einer Kontroll-siRNA (siControl Non-Targeting siRNA #5, Dharmacon), behandelt. So konnten in jedem Versuchsaufbau Kontrollparameter zu den mit LASP-1 siRNA behandelten Zellen erhoben werden. Ein siRNA-Knockdown von LASP-1 hatte bereits in anderen Tumorentitäten einen über 48h zunehmenden Effekt der Inhibition der Proteinexpression gezeigt (Grunewald, Kammerer et al. 2006). Auch in Medulloblastom-Zellen konnte eine suffiziente Abnahme der LASP-1 Proteinmenge nach einer Inkubationszeit von 42-48h nach Transfektion erzielt werden, wie anhand der in Abbildung 8 (B) gezeigten Western Blots mit β -Aktin-Ladungskontrolle zu erkennen ist.

Bereits lichtmikroskopisch konnte nach der Behandlung mit siRNA bei allen Zelllinien (DAOY, UW 228-2, D 283Med) eine Abnahme der Proliferation festgestellt werden (Abbildung 7).

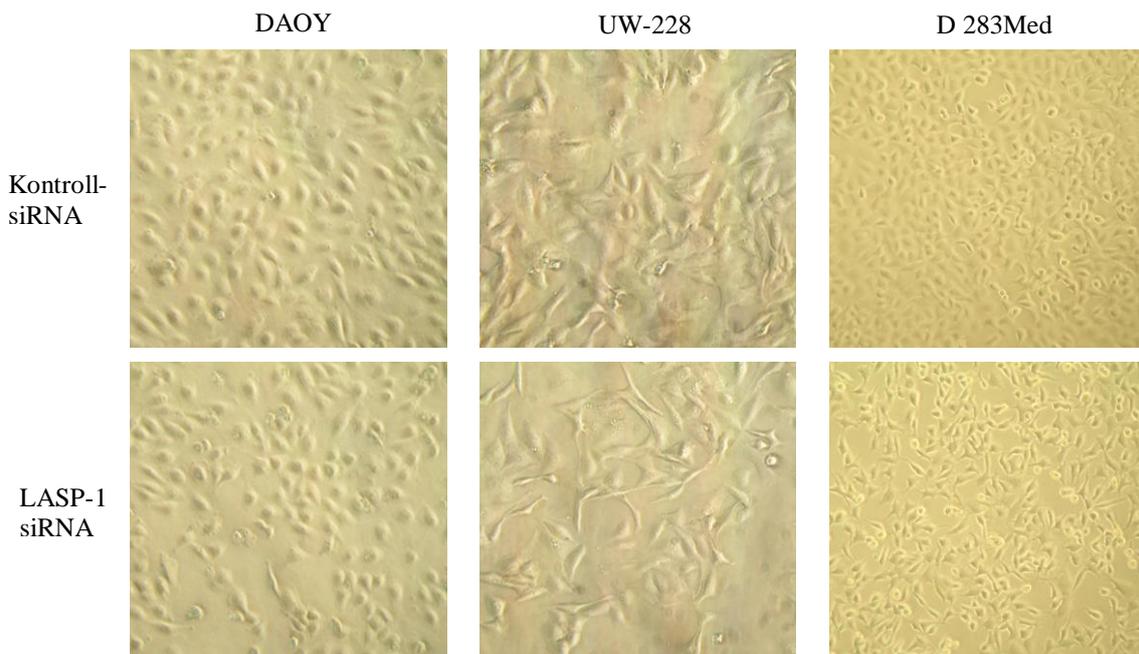


Abbildung 7: Lichtmikroskopie der Zelllinien DAOY, UW 228-2 und D 283Med. Aufnahme 48 Stunden nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siControl Non-Targeting siRNA #5, Dharmacon) und gegen LASP-1 gerichteter siRNA (siRNA „A“ und „C“). Visuelle Verdeutlichung der Abnahme der Proliferation der Medulloblastom-Zelllinien nach LASP-1-Knockdown gegenüber einer Kontrolle ohne Knockdown.

3. Ergebnisse

Der unter 2.2.10 beschriebene MTT-Proliferationsassay zeigte 48h nach siRNA-Knockdown eine erhebliche, im Vergleich zu den jeweils mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen statistisch signifikante Reduktion der Proliferationsrate der mit LASP-1-siRNA behandelten Zellen. Somit konnte für die Medulloblastom-Zelllinien DAOY, UW 228-2 und D283Med nachgewiesen werden, dass eine reduzierte LASP-1 Expression die Proliferation der Zellen hemmt (Abbildung 8 A).

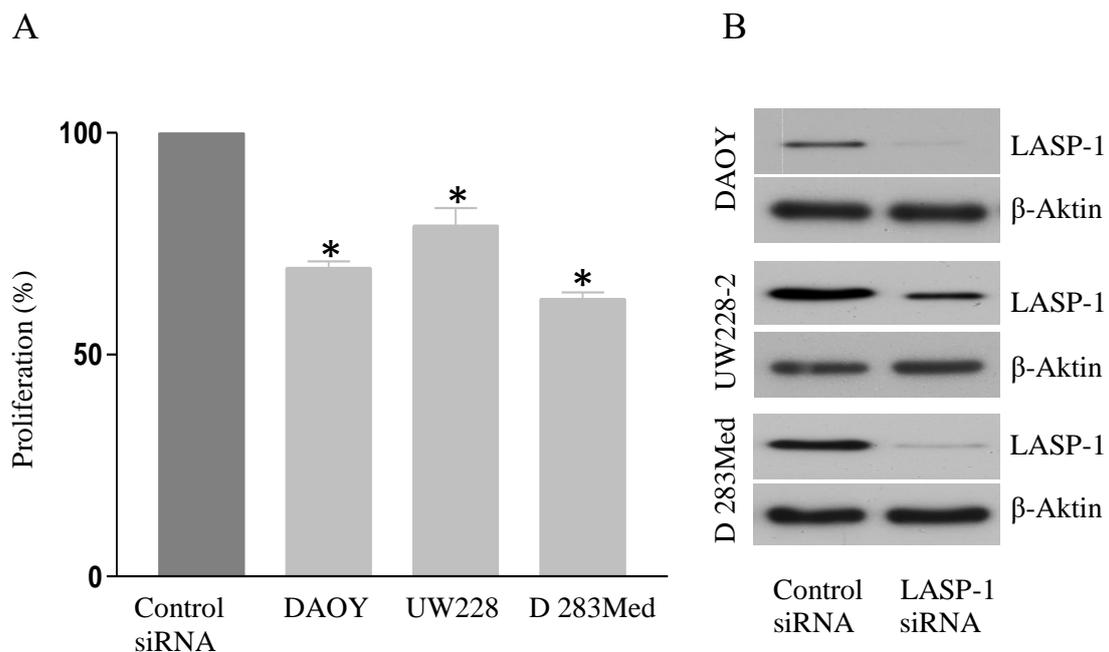


Abbildung 8: (A) MTT-Proliferations-Assay der Zelllinien DAOY, UW 228-2 und D 283 Med. Absorption bei 595nm am ELISA-Reader entspricht dem prozentualen Anteil (von 100%) der Proliferation gegenüber den mit Control-siRNA behandelten Zellen [Proliferation (%)] (B) Western-Blots (LASP-1, 38 kDa) der Zelllinien DAOY, UW-228-2 und D 283Med zum Nachweis der Knockdown-Effizienz 48h nach Transfektion mit LASP-1 siRNA („A“ und „C“), β -Aktin-Ladungskontrolle (40 kDa). *statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (entspricht 100%), $p < 0.001$ (Student's t test).

3. Ergebnisse

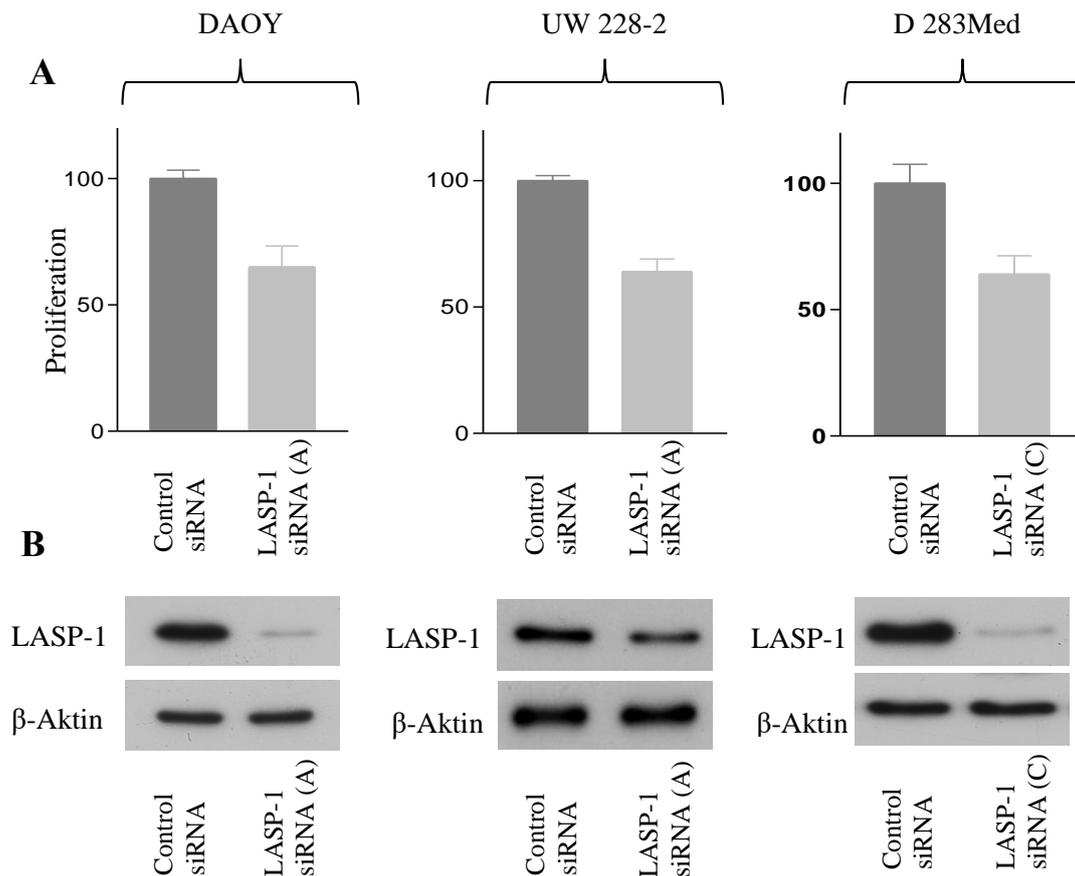


Abbildung 9: (A) MTT-Proliferations-Assay der Zelllinien DAOY, UW 228-2 und D 283Med nach Behandlung mit einzelner LASP-1-siRNA („A“ für DAOY und UW 228-2 und „C“ für D 283Med). Vergleich der Proliferationsrate (entspricht Absorption bei 595 nm am ELISA-Reader) mit Zellen nach Behandlung mit Kontroll-siRNA. (B) Korrespondierende Western-Blots als Nachweis der Knockdown-Effizienz (LASP-1, 38kDa und β -Aktin, 40kDa). Kontrolle (Control siRNA) entspricht jeweils 100%.

Auch ein siRNA-Knockdown mit einer einzelnen, gegen LASP-1 gerichteten siRNA führte in Zusatzexperimenten zu einer effizienten Unterdrückung der LASP-1-Expression (Abbildung 9B: DAOY und UW 228-2 nach Behandlung mit siRNA „A“ sowie D 283Med nach Behandlung mit siRNA „C“). Nach entsprechendem LASP-1-Knockdown wurde im MTT-Proliferationsassay eine Abnahme der Proliferationsrate (Abbildung 9A) der Zellen im Vergleich zu den jeweils mit Control-siRNA behandelten Zellen beobachtet. Allerdings war diese Abnahme der Proliferation nicht statistisch signifikant.

3.4 LASP-1-Knockdown hemmt die Fähigkeit der Zellmigration und steigert die Adhäsion von humanen Medulloblastom-Zellen

Tumorinvasion in umliegendes Gewebe sowie Migration und Ausbildung von Metastasen sind wesentliche Eigenschaften von Neoplasien (Hanahan and Weinberg 2000). Ein Knockdown von LASP-1 in BT-20-Brustkrebszellen führte zu verringerter Migration der Zellen (Grunewald, Kammerer et al. 2006). Um die Übertragbarkeit dieses Effektes auf Medulloblastom-Zellen zu überprüfen, und so die mögliche Rolle von LASP-1 in Medulloblastom-Zellen weiter zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Migrationsassays mit den humanen Medulloblastom-Zelllinien DAOY, UW 228-2 und D 283Med, durchgeführt.

Auch in diesem Versuchsaufbau wurden die mit einer Kombination aus Anti-LASP-1 siRNA „A“ und „C“ behandelten Zellen mit Kontrollen (Transfektion mit siControl Non-Targeting siRNA #5, Dharmacon) verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich mit Zellen, die ohne die Zugabe von siRNA lediglich mit dem Transfektionsmedium „HiPerfect“ behandelt wurden. Die Migrationsfähigkeit komplett unbehandelter, nicht transfizierter Zellen wurde als Referenz (entspricht 100%) herangezogen.

Alle Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation in nährstoffarmem Medium in die obere Kammer des Transwell-Chamber-Aufbaus gegeben (modifizierter Boyden chamber assay, s.2.2.9). Wie in 2.2.8 beschrieben, erfolgte nach Transfektion mit siRNA sowie bei den Kontroll-Zellen eine Überprüfung der Viabilität der Zellen mittels Trypanblaufärbung – ergaben sich Unterschiede in der Anzahl der viablen Zellen, wurden diese durch eine Anpassung der Verdünnung der Zellsuspensionen vor Ausplattieren der Zellen in der Migrationskammer, ausgeglichen. Eine Auswertung erfolgte nach einer 4-stündigen Phase der Migration der Zellen in Richtung chemotaktiver Stimulanzen und nährstoffreichem Medium.

3. Ergebnisse

Die photometrische Auswertung zeigte in allen untersuchten Zelllinien eine statistisch signifikante Reduktion der Zellmigration gegenüber den unbehandelten Zellen der jeweiligen Zelllinie (Abbildung 10A). Die entsprechenden Western Blots (Abbildung 10B) zeigten eine effiziente Reduktion der LASP-1-Proteinexpression in den mit siRNA (Kombination aus siRNA „A“ und „C“) behandelten Zellen. Die Behandlung allein mit dem Transfektionsreagenz „HiPerfect“ ohne siRNA, sowie die Transfektion mit Control siRNA zeigten in keiner der drei untersuchten Zelllinien einen relevanten Effekt auf die LASP-1-Expression oder die Migrationsfähigkeit der Zellen. Ein toxischer Effekt des Transfektionsreagenz oder durch die Behandlung mit siRNA an sich konnte somit ausgeschlossen werden. Sowohl LASP-1-Expression als auch Migrationsfähigkeit waren in allen Kontrollen vergleichbar mit unbehandelten Referenz-Zellen der jeweiligen Zelllinie.

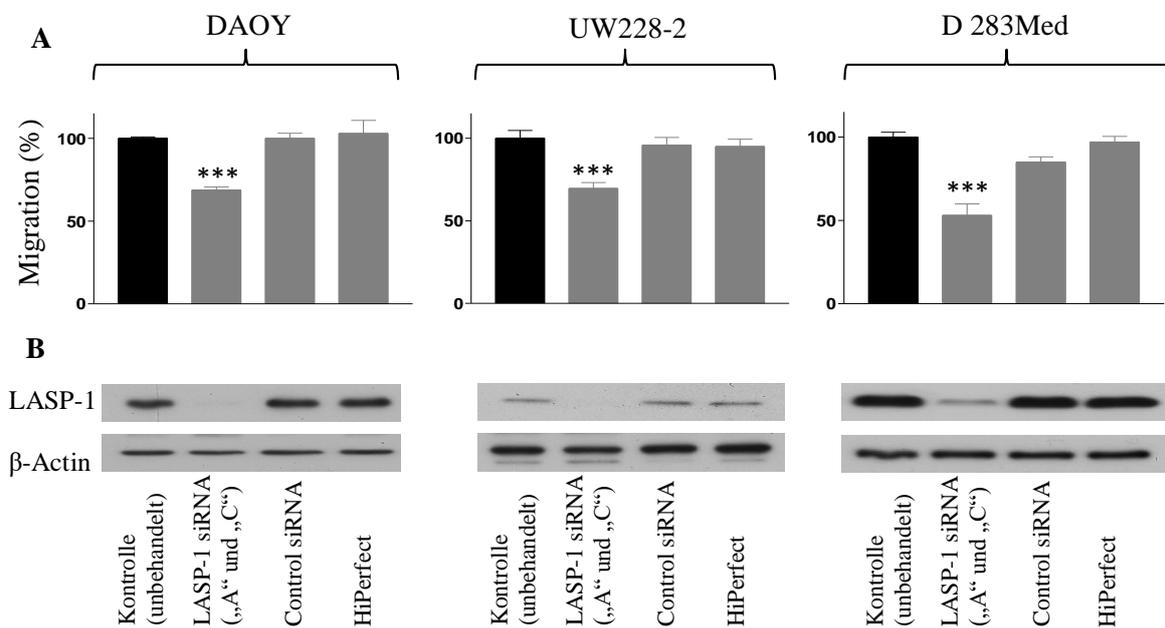


Abbildung 10: (A) Effekt des LASP-1-Knockdown in DAOY, UW 228-2 und D283Med auf die Migrationsfähigkeit der Zellen. Balken-Darstellung des prozentualen Anteils (von 100%, entspricht der unbehandelten Referenz: Kontroll-Zellen der jeweiligen Zelllinie) der migrierten Zellen nach Behandlung mit siRNA „A“ und „C“, nach Behandlung mit Control siRNA und nach Behandlung mit Transfektionsreagenz ohne siRNA („HiPerfect“). (B) Korrespondierende Western-Blots als Nachweis der Knockdown-Effizienz (LASP-1, 38 kDa; F-Actin, 40kDa) sowie Ausschluss toxischer Effekte auf die LASP-1-Expression durch das Transfektionsreagenz oder die siRNA-Behandlung an sich. ***statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (entspricht 100%), $p < 0.001$ (Student`s *t* test).

3. Ergebnisse

Die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen kann durch die Fähigkeit, an umliegendem Gewebe zu adhären, wesentlich beeinflusst werden. Um zu untersuchen, ob die verminderte Migrationsfähigkeit nach siRNA-Knockdown von LASP-1 mit einer veränderten Adhäsionsfähigkeit der Medulloblastom-Zellen einhergeht wurde in dieser Arbeit mit den oben genannten Zelllinien ein Adhäsionsassay durchgeführt (s.2.2.11).

Wie bereits in den Vorversuchen (Proliferations- und Migrationsassay), erfolgte auch im Adhäsionsassay eine Behandlung der Zellen (DAOY, UW 228-2, D 283Med) mit einer Kombination aus siRNA „A“ und „C“, mit der eine effiziente Depletion von LASP-1 in den jeweiligen Zellen erreicht werden konnte (Abbildung 11).

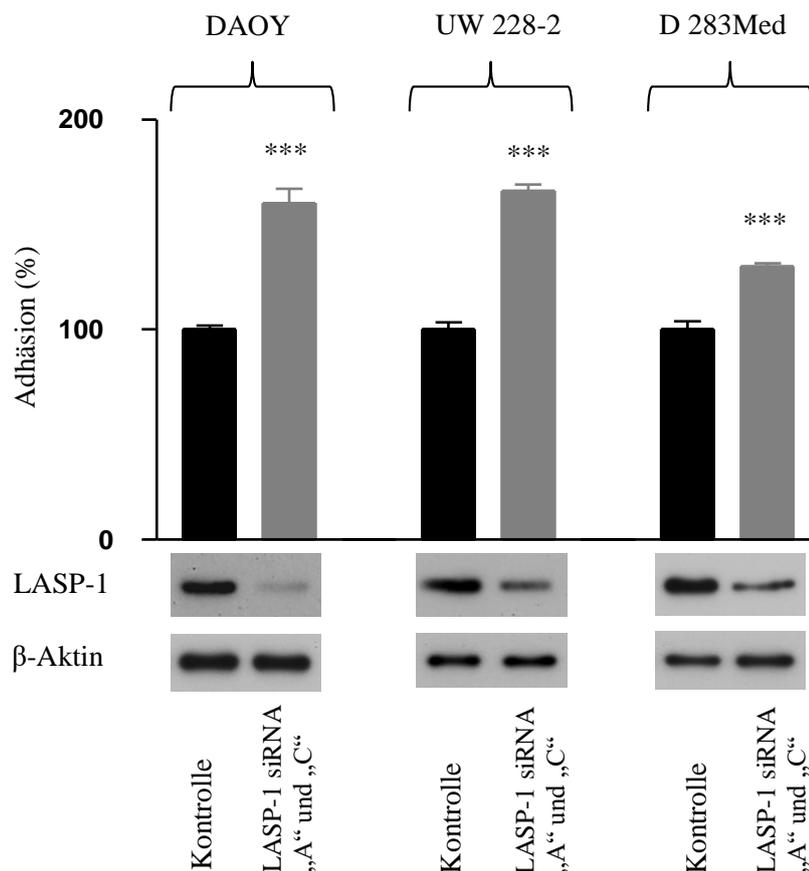


Abbildung 11: Adhäsionsfähigkeit von Zellen der Linien DAOY, UW 228-2 und D 283Med nach Transfektion mit siRNA „A“ und „C“ im Vergleich zu unbehandelten Zellen („Kontrolle“ – entspricht jeweils 100% als Referenz). Die Messung (Absorption am ELISA-Reader bei 595nm nach Färbung der adhären Zellen mit Kristall-Violett) erfolgte nach 2-stündiger Inkubation der Zellen auf Fibronectin-beschichteten 48Wells. Balkendarstellung des Mittelwertes (mit Standardfehler) von 6 Replikaten eines Experimentes (von insgesamt 3 mit vergleichbaren Ergebnissen). Western-Blots mit Nachweis der Knockdown-Effizienz. ***statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der jeweiligen Kontrolle (entspricht 100%), $p < 0.001$ (Student`s t test).

3. Ergebnisse

In 3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 6 Replikaten erfolgte eine Inkubation der mit siRNA behandelten Zellen und unbehandelten Zellen („Kontrolle“) auf einer mit Fibronectin beschichteten Oberfläche von 48-Well. Nach Kristallviolett-Färbung der nach zwei Stunden Inkubation adhären Zellen, erfolgte die Messung der Absorption bei 595nm am ELISA-Reader. Abbildung 11 zeigt, dass ein erfolgreicher LASP-1-Knockdown in allen untersuchten Medulloblastom-Zellen zu einer gesteigerten Adhäsion der Zellen führt. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen der gleichen Zelllinie ist die Steigerung der Adhäsion statistisch signifikant ($p < 0.001$ (Student's t test)).

4. Diskussion

Seit der Identifikation von LASP-1 in einer cDNA-Datenbank von Brustkrebsmetastasen durch Tomasetto et al. (Tomasetto, Moog-Lutz et al. 1995, Tomasetto, Regnier et al. 1995) wurde LASP-1 in einer Reihe von humanen Tumorzelllinien untersucht (Grunewald, Kammerer et al. 2006, Grunewald, Kammerer et al. 2007, Grunewald, Kammerer et al. 2007, Frietsch, Grunewald et al. 2010, Zhao, Wang et al. 2010, Wang, Li et al. 2013, Hailer, Grunewald et al. 2014, Yang, Zhou et al. 2014, Zheng, Yu et al. 2014).

Ziel dieser Dissertation war es, das auf Chromosom 17q codierte Zytoskelett-assoziierte Protein LASP-1 und dessen mögliche funktionelle Rolle im humanen Medulloblastom zu untersuchen. Insbesondere durch Studien zu Prozessen der Zellmigration-, Adhäsion, und Proliferation in Medulloblastomen konnten durch diese Dissertation Erkenntnisse gewonnen werden, die wesentliche Teile von Untersuchungen zu LASP-1 in anderen humanen Tumorzelllinien bestätigen. Im Kontext klinischer Daten bieten die Resultate dieser Arbeit zudem eine wichtige Grundlage für eine weitere Charakterisierung einzelner Medulloblastom-Subgruppen und deuten auf einen möglichen Nutzen von LASP-1 als prognostischen Marker in Medulloblastomen hin.

Das humane Medulloblastom stellt eine Tumorentität mit mehreren Subgruppen dar. Eine Klassifikation von Medulloblastomen kann nach histologischen Aspekten erfolgen (Louis, Ohgaki et al. 2007). Im vergangenen Jahrzehnt hat sich zudem ein Konsens entwickelt, der eine Unterteilung humaner Medulloblastome nach molekularen Kriterien sinnvoll erscheinen lässt (Thompson, Fuller et al. 2006, Kool, Koster et al. 2008, Northcott, Korshunov et al. 2011, Taylor, Northcott et al. 2012). Diese Einteilung in vier molekulare Kerngruppen korreliert wiederum mit klinischen Verlaufstypen. Von besonderer Bedeutung sind die Medulloblastome der sogenannten Gruppe 3 und Gruppe 4 (Taylor, Northcott et al. 2012), welche sich nicht durch eine wesentliche Aktivierung der WNT- oder SHH-Signalwege auszeichnen. Eine Meta-Analyse von Transkriptom-Daten, sowie Daten zu genetischen Aberrationen und klinischem Verlauf von bis zu 550 Medulloblastomen hat gezeigt, dass eine Bildung von Metastasen unabhängig vom Alter

4. Diskussion

der Patienten am häufigsten in den Gruppe 3 - (30%) und Gruppe 4 (31%) - Medulloblastomen auftritt. Patienten dieser Subgruppen zeigten in der Gesamtanalyse aller Patienten sowie bei Patienten unter 4 Jahren ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben. Parallel dazu war ein Verlust des Chromosoms 17p mit einem gleichzeitigen Zugewinn von Chromosom 17q am häufigsten in den Gruppen 3 und 4 zu finden. Der Zugewinn von Chromosom 17q war in beiden Gruppen die häufigste chromosomale Aberration (Kool, Korshunov et al. 2012). Interessanterweise ist ein Zugewinn von Chromosom 17q auch eine häufige erworbene chromosomale Aberration in späten Krankheitsstadien von Ovarial- und Mamma-Carcinomen (Hislop, Pratt et al. 2002, Dimova, Orsetti et al. 2009). In beiden Tumorentitäten wurde eine LASP-1-Überexpression sowie ein wesentlicher Einfluss von LASP-1 auf die Zellmigration- und Proliferation nachgewiesen (Grunewald, Kammerer et al. 2006, Grunewald, Kammerer et al. 2007).

Eine Untersuchung von 28 Medulloblastom-Primarien und deren Rezidivtumoren zeigte zudem, dass ein Zugewinn auf Chromosom 17q und ein Isochromosom 17q häufige erworbene Charakteristika der Rezidivtumore darstellen (Korshunov, Benner et al. 2008). Ein zugehöriges Ziel-Gen auf Chromosom 17, welches diesen Wachstums-Vorteil, und dazu notwendige pro-migratorische und pro-proliferative Effekte in Medulloblastomen, bedingen könnte, wurde bisher nicht sicher identifiziert.

LASP-1 ist auf Chromosom 17q11-21.3 codiert, und ist in Medulloblastomen mit Zugewinn von Chromosom 17q im Vergleich zu Medulloblastomen mit balanciertem Karyotyp signifikant überexprimiert (\log_2 ratio = 3.1) (Traenka, Remke et al. 2010). LASP-1-mRNA Expressionsdaten von 101 Medulloblastomen zeigen zudem eine statistisch hoch signifikante positive Assoziation zwischen: (1) starker LASP-1-Expression und dem Vorhandensein eines 17q-Zugewinns ($p < 0.001$) und (2) zwischen starker LASP-1-Expression und dem Vorhandensein von Metastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines Medulloblastoms ($p < 0.001$) (Traenka, Remke et al. 2010). Diese Assoziation konnte in einer zweiten unabhängigen Kohorte von 207 immunhistochemisch und mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) untersuchten Medulloblastomen bestätigt werden (Spearman Korrelationskoeffizient 17q - Zugewinn/LASP-1-Positivität: 0.32; 0.20-0.45; $p < 0.001$; Spearman Korrelations-

4. Diskussion

Koeffizient Metastasen-Status/LASP-1-Positivität: 0.31; 0.21-0.43; $p < 0.001$) (Traenka, Remke et al. 2010). Im Kontext der bisherigen Erkenntnisse zu LASP-1 existiert somit ein vielversprechendes Kandidaten-Gen, das für den genannten pro-migratorischen, pro-proliferativen Effekt und letztlich maligneren Verlaufstyp von Medulloblastomen mit Aberrationen auf Chromosom 17 verantwortlich sein könnte.

Die vorliegende Arbeit konnte LASP-1 in vitro als funktionell relevantes Protein in etablierten humanen Medulloblastom-Zelllinien identifizieren und charakterisieren. Eine LASP-1-Depletion mittels siRNA führte zu einer signifikant verringerten Proliferations- und Migrationsfähigkeit der untersuchten Medulloblastom-Zellen. LASP-1 beeinflusst also zwei, für aggressive Tumor-Phänotypen essentielle Eigenschaften, in von humanen Medulloblastomen abgeleiteten Zelllinien. Diese Resultate bestätigen bisherige Erkenntnisse über LASP-1 in weiteren Tumorentitäten: in den humanen Brustkrebszelllinien BT-20 und MCF-7 führte ein siRNA-Knockdown von LASP-1 zu einer verminderten Zellproliferation, in BT-20-Zellen führte der Knockdown auch zu einer verminderten Migrationsfähigkeit der Zellen (Grunewald, Kammerer et al. 2006). Eine vergleichbare Reduktion der Zellproliferation- und Migration wurde nach LASP-1-Knockdown in Ovarial-Carcinom-Zellen (SKOV-3) (Grunewald, Kammerer et al. 2007) sowie nach LASP-1 siRNA-silencing in Zellen eines humanen hepatozellulären Carcinoms (HepG2) nachgewiesen (Wang, Li et al. 2013). Ein Doxycyclin induzierter LASP-1 Knockdown in shRNA (small hairpin RNA) – transfizierten Prostata-Carcinom-Zellen (LNCaP) führte ebenso zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation- und Migration (Hailer, Grunewald et al. 2014). Interessanterweise führte eine durch die Transfektion von epithelialen PTK2-Zellen (nicht human) mit einem Wild-Typ LASP-1 pcDNA3-Plasmid herbeigeführte LASP-1 Überexpression zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit. Diese Beobachtung konnte in humanem HCC (Hepatocelluläres Carcinom) nach LASP-1 cDNA-Transfektion der Zelllinie MHCC-97 L bestätigt werden (Wang, Li et al. 2013). Im Kontext dieser mittlerweile zahlreichen Studien zu LASP-1 in humanen Carcinomzellen, bestärken die Resultate der vorliegenden Dissertation die Interpretation, dass LASP-1 eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasenbildung spielt.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine signifikant gesteigerte Adhäsion der Medulloblastom-Zellen an die umgebende Matrix nach LASP-1-Knockdown nachgewiesen werden. In Verbindung mit den Resultaten der Migrationsversuche erscheint diese Beobachtung logisch und nachvollziehbar, müssen die aktiver migrierenden Zellen doch aktiver Zellausläufer bilden, ihre Form verändern und im Verlauf der Tumorprogression in das umliegende Gewebe invadieren statt zu adhären. Es ist bekannt, dass LASP-1 in fokalen Kontakten und Zellmembranausläufern akkumuliert und in Ko-Lokalisation mit F-Aktin, vorliegt (Schreiber, Moog-Lutz et al. 1998, Chew, Chen et al. 2002). Dieses Verteilungsmuster konnte in Immunfluoreszenz-Aufnahmen der vorliegenden Arbeit in Medulloblastomen bestätigt werden (siehe Abbildung 3 und 4). In Zell-Zell-Kontakten konnte LASP-1 bisher nicht nachgewiesen werden (Schreiber, Moog-Lutz et al. 1998). Über die eingangs beschriebenen Nebulin-like-Repeats R1 und R2 hat LASP-1 die Möglichkeit in Zellausläufern an F-Aktin zu binden (Schreiber, Moog-Lutz et al. 1998). Invasions-Assays haben eine zytoplasmatische Lokalisation sowie eine Akkumulation von LASP-1 in Pseudopodien der invadierenden Zellen nachgewiesen (Spence, McGarry et al. 2006). Hier liegt LASP-1 ausserdem in Ko-Lokalisation mit dem Kelch Related Protein 1 (Krp1) vor mit welchem es ebenso über die Nebulin-like-Repeats R1 und R2 bindet. Der siRNA-Knockdown von sowohl LASP-1 als auch Krp1 haben zu einer deutlichen Verkürzung der von Fibroblasten gebildeten Pseudopodien geführt, was die Bedeutung von LASP-1 und Krp1 in der Bildung der pseudopodialen Elongation von Zellen verdeutlicht (Spence, McGarry et al. 2006). Interessanterweise konnten Lin et al. zunächst nachweisen, dass eine Behandlung von Fibroblasten (NIH 3T3 Zelllinie) mit Wachstumsfaktoren zu einer Re-Lokalisation von LASP-1 aus dem Zytoplasma der Zellperipherie in fokale Adhäsionen führte. Ein siRNA-Knockdown von LASP-1 zeigte in COS-7- und NIH 3T3-Zellen allerdings keinen Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit der Zellen, trotz einer eingeschränkten Migrationsfähigkeit der Zellen (Lin, Park et al. 2004). Obwohl in vitro eine verminderte Invasionsfähigkeit von Tumorzellen nach LASP-1 silencing in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte (Chiyomaru, Enokida et al. 2012, He, Yin et al. 2013, Zhao, Ren et al. 2015), scheint die direkte Rolle von LASP-1 in der Adhäsion indes also unklar. Auch in LASP-1-depletierten Prostata-Carcinom-Zellen, die eine verminderte Migration und Proliferation zeigten, konnte zwar eine

4. Diskussion

verminderte Adhäsionsfähigkeit der Zellen im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden, dies blieb allerdings ein statistisch nicht signifikanter Trend ($P=0.054$) (Hailer, Grunewald et al. 2014). Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen somit erstmals einen direkten Effekt von LASP-1 auf die Adhäsionsfähigkeit von humanen Tumorzellen, wobei die Beobachtung einer gesteigerten Adhäsion nach LASP-1-Depletion die Charakterisierung von LASP-1 als ein die Tumorprogression förderndes Protein weiter unterstreicht. Die Bindung zwischen LASP-1 und Krp1 wird in Co-Lokalisation mit dem Integrin CD44 und dem Adaptor-Protein Ezrin beschrieben (Grunewald and Butt 2008). Interessanterweise führte aber ein Knockdown von Ezrin in Medulloblastomen nicht wie ein LASP-1-silencing zu einer gesteigerten, sondern zu einer verminderten Adhäsionsfähigkeit der untersuchten Zelllinien DAOY und ONS76 (Osawa, Smith et al. 2009).

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen verglichen Grunewald et al. benignes Brustgewebe mit Proben von Ductalen in situ Carcinomen (DCIS), mit invasiv wachsenden Mamma-Carcinomen sowie mit Geweben von Mamma-Carcinom-Metastasen in Lymphknoten. Dabei zeigte sich in allen DCIS-Proben eine schwache LASP-1-Färbung und, in invasiv wachsenden Mamma-Carcinomen eine sehr starke LASP-1-Expression, die sich in den Lymphknoten-Metastasen nochmals bestätigte (Grunewald, Kammerer et al. 2006). Invasive Mamma-Carcinome zeigten in einer weiteren, grösseren Studie eine signifikant höhere durchschnittliche LASP-1-Expression als z.B. Fibroadenome ($p=0.0176$) (Grunewald, Kammerer et al. 2007). In der gleichen Studie konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der LASP-1-Expression und der Tumorgrosse ($p=0.0159$) und dem Vorhandensein von Lymphknoten-Metastasen ($p=0.0066$) hergestellt werden (Grunewald, Kammerer et al. 2007). Diese Daten deuten darauf hin, dass die LASP-1-Positivität von Tumoren mit einem schlechteren Outcome assoziiert sein könnte. Tatsächlich konnten Frietsch et al. für Mamma-Carcinome mit einer starken nukleären LASP-1-Färbung ein Zusammenhang mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben aufzeigen ($p=0.025$). Dieser Zusammenhang verliert sich, wenn man sich die Korrelation zwischen der hohen zytoplasmatischen LASP-1-Expression und dem Gesamtüberleben anschaut (Frietsch, Grunewald et al. 2010). Für andere Tumorentitäten konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der LASP-1-Expression und dem Gesamtüberleben beobachtet werden: in Colorectalen Carcinomen

ist eine hohe LASP-1-Expression mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert; als unabhängiger prognostischer Marker konnte LASP-1 in dieser Studie allerdings nicht etabliert werden (Zhao, Wang et al. 2010). Anders in Magen-Carcinomen (Zheng, Yu et al. 2014), in Adenocarcinomen des Pancreas (Zhao, Ren et al. 2015) und in klarzelligen Nierenzell-Carcinomen (Yang, Zhou et al. 2014): hier konnte jeweils eine Korrelation von signifikant schlechterem Gesamtüberleben und hoher LASP-1-Expression bestätigt werden.

Auch für Medulloblastome existieren entsprechende Daten: In 207 immunhistochemisch untersuchten Medulloblastomen zeigte sich eine signifikante Assoziation der LASP-1-Immunoreaktivität und sowohl vermindertem Progress-freiem Überleben ($p=0.001$) als auch dem Gesamtüberleben ($p<0.001$) der Patienten. In einer multivariaten Regressions-Analyse der gleichen Kohorte war der LASP-1-Status zudem, neben dem Vorliegen eines 17q-Zugewinns und einer großzellig/anaplastischen Tumorphistologie ein unabhängiger prognostischer Marker (Traenka, Remke et al. 2010). Interessanterweise existierten gerade in dieser Kohorte nur wenige Tumor-Proben mit einer starken nukleären Lokalisation von LASP-1, womit die Immunfluoreszenzdaten in der vorliegenden Arbeit, die LASP-1 als überwiegend zytosolisch lokalisiert darstellen konnte, bestätigt werden. Darüber hinaus waren in der erwähnten Kohorte (Traenka, Remke et al. 2010) alle histologisch als desmoplastisch eingeordneten Tumore LASP-1 negativ, was im Gegensatz zur Beobachtung der deutlich LASP-1-positiven Zellen der Zelllinie DAOY in dieser Arbeit steht. DAOY wurde ursprünglich aus einem desmoplastischen, cerebellären Medulloblastom abgeleitet. Diese Beobachtung zeigt gleichzeitig eine wesentliche Limitation der vorliegenden Arbeit auf: genetische und molekulare Veränderungen der Zellen gegenüber der ursprünglich aus humanen Medulloblastomen etablierten und charakterisierten Zelllinie sind nicht ausgeschlossen.

Immunfluoreszenz-Aufnahmen mit spezifischen Färbungen gegen LASP-1, phospho-LASP-1 und dephospho-LASP-1 konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die phosphorylierte Form von LASP-1 überwiegend im Zellkern lokalisiert scheint. Mihlan et al. konnten erst kürzlich nachweisen, dass nach Forskolin-Stimulation und konsekutiver Phosphorylierung von LASP-1 an Serin-146 die nukleäre Konzentration von phospho-LASP-1 in den Brustkrebszelllinien BT-20 und MDA-MB231 deutlich

zunimmt (Mihlan, Reiss et al. 2013). Dies bestätigt die Beobachtungen zur Lokalisation von pLASP in Medulloblastomen in dieser Dissertation. Die Funktion des nukleären pLASP bleibt indes unklar. Mihlan et al. betonen, dass die Konzentration der aktiven Proteinkinase A in malignen Brustkrebszellen vierfach gegenüber normalem Brustgewebe erhöht ist. Durch diese erhöhte Aktivität könnte ein höherer Anteil an phosphoryliertem LASP-1 und der konsekutive Import von pLASP-1 in den Zellkern erklärt werden (Mihlan, Reiss et al. 2013). Die aberrante Aktivierung des Sonic Hedgehog (SHH) -Signalweges ist charakteristisch für eine der molekularen Subgruppen der Medulloblastome (Taylor, Northcott et al. 2012). Die für Gruppe 3 und Gruppe 4 charakteristischen chromosomalen Aberrationen, wie der Zugewinn von Chromosom 17q und Verlust von Chromosom 17p, sind in der SHH-Gruppe kaum zu finden (Kool, Korshunov et al. 2012). Interessanterweise konnte LASP-1 aber als ein downstream Ziel-Transkript von SHH identifiziert werden. Eine Aktivierung von SHH führte zu einer Induktion von LASP-1 (Ingram, Wicking et al. 2002). Umgekehrt wird die PKA-Aktivität als essentiell beschrieben, um Effektoren von SHH in Medulloblastomen zu inhibieren, so z.B. den Transkriptionsfaktor GLI (Caretta and Mucignat-Caretta 2011). Eine hohe Aktivität von SHH könnte somit eine hohe, regulatorische Aktivität der PKA zur Folge haben, und somit einen hohen Phosphorylierungs-Grad von LASP-1 in Subgruppen von Medulloblastomen erklären. Der Überlegung von Mihlan et al. folgend könnte dies dann auch eine Akkumulation von pLASP-1 in den Zellkernen von Medulloblastomen hervorrufen. Ob pLASP-1 dann im Zellkern die Funktion eines Transkriptionsfaktors übernimmt konnte bisher weder in Medulloblastom-Zellen noch in anderen Tumorentitäten abschliessend geklärt werden.

Die genauen Mechanismen die nach einem LASP-1-Knockdown zu den beobachteten Veränderungen der Zellmigration-, Proliferation und Adhäsion führen, konnten durch die in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht aufgedeckt werden. Transkriptom-Analysen der Zelllinien D283 und DAOY nach einer Behandlung mit gegen LASP-1 gerichteter und auch in der vorliegenden Arbeit verwendeter siRNA „A“ und „C“ konnten allerdings einen Einblick in die durch LASP-1 beeinflussten Signalwege und Transkripte geben. So zeigten sich nach LASP-1-Knockdown mRNAs von in Zelladhäsions-Prozessen beteiligten Proteinen (CEACAM1, NRCAM) als stark hochreguliert. Im Gegensatz hierzu waren in Zellinvasion und Migration beteiligte

4. Diskussion

Proteine entsprechend stark herunterreguliert: MMP19, ADAM9, TMP3 (Traenka, Remke et al. 2010). Die bisherigen Untersuchungen zu LASP-1 in humanen Carcinomen haben sich im Wesentlichen auf aggressive Tumorentitäten konzentriert. Zu diesen gehört auch das in dieser Arbeit untersuchte Medulloblastom. Microarray-Daten zeigen allerdings, dass LASP-1 auch in Meningeomen hoch, sogar noch höher als in Medulloblastomen, exprimiert ist (Vergleiche Abbildung 4 in (Orth, Cazes et al. 2015)). Meningeome, ebenso Tumoren des zentralen Nervensystems, werden nach WHO dem Grad I zugeordnet und zeichnen sich demnach in der Regel durch langsames, nicht infiltratives Wachstum aus (Louis, Ohgaki et al. 2007). Dies steht im Gegensatz zu den Eigenschaften von Medulloblastomen. Untersuchungen in Meningeomen könnten somit ein zukünftiger Ansatzpunkt sein, um die Eigenschaften von LASP-1 und vor allem Regulationsmechanismen von LASP-1 besser zu verstehen.

Zusammenfassend ist es mit dieser Dissertation gelungen, das Transkript eines vielversprechenden Gens auf Chromosom 17q, LASP-1, in seiner Funktion in Medulloblastomen zu charakterisieren. LASP-1 scheint in den bisher untersuchten humanen Tumorentitäten eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und Progression maligner Metastasen-Bildung einzunehmen. Interessant ist dabei, dass funktionelle in vitro Untersuchungen über unterschiedliche Tumorentitäten hinweg zu gleichartigen Ergebnissen der Beeinflussung von Migration und Proliferation durch LASP-1 kommen. Die klinische Implikation der Ergebnisse dieser Dissertation werden durch immunhistochemische und genetische Untersuchungen sowie mRNA Expressionsdaten in zwei unabhängigen Patientenkohorten unterstützt: (1) eine starke Expression von LASP-1 in Medulloblastomen ist signifikant mit dem Vorhandensein eines Zugewinns auf Chromosom 17q assoziiert und (2) Patienten mit starker LASP-1-Expression leiden häufiger bereits bei Erstdiagnose der Erkrankung an Metastasen (Traenka, Remke et al. 2010). Kongruent hierzu war das Auftreten von Metastasen (Stadium M1-M4) in einer großen Meta-Analyse von Medulloblastom-Patienten in den Gruppe 3 und 4 Medulloblastomen deutlich häufiger. Über alle Subgruppen hinweg ($p < 0.001$) sowie jeweils in Gruppe 3 ($p = 0.035$) und Gruppe 4 ($p = 0.028$) - Medulloblastomen zeigten die Kaplan-Meier Kurven ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben der Patienten mit einem gesicherten Zugewinn auf Chromosom 17q (Kool, Korshunov et al. 2012).

Die signifikante Assoziation mit dem Vorhandensein eines Zugewinns auf Chromosom 17q unterstützt die Annahme, dass mit LASP-1 ein wichtiges Kandidatengen auf diesem Chromosom identifiziert werden konnte, das mit einem maligneren klinischen Verlaufstyp assoziiert ist. Die Perspektive in der Behandlung der Medulloblastome basiert unter anderem auf der molekularen Differenzierbarkeit und daraus ableitbaren, gezielten und personalisierten Therapiemöglichkeiten (Remke, Ramaswamy et al. 2013, DeSouza, Jones et al. 2014). Immunhistochemische Analysen von einer kleinen Anzahl (n=11) von Primärtumoren und deren Rezidiven zeigten einen frappanten Unterschied in der LASP-1-Färbung von Tumorkomplexen die im Primarius keine LASP-1-Expression aufwiesen (n=5), dann aber im Rezidivtumor eine signifikante LASP-1-Expression zeigten (n=2) (siehe Abbildung 12, adaptiert von (Traenka, Remke et al. 2010)). Sechs Primärtumore wiesen eine starke LASP-1-Färbung auf, die auch in den entsprechenden Rezidivtumoren erhalten blieb (Traenka, Remke et al. 2010). Diese kleine, aber aufgrund der Färbungen der verschiedenen Präparate sehr interessante Studie, deutet darauf hin, dass eine solche Immunreaktivität auf LASP-1 ein verlässlicher Marker in der Routine werden könnte. Lässt sich die Assoziation von LASP-1 mit schlechterem Gesamt- und progressfreiem Überleben in grösseren Kohorten validieren, könnte die LASP-1-Positivität von Primär- und/oder Rezidivtumoren als Biomarker und Entscheidungsgrundlage für eine Therapieanpassung im Sinne einer Eskalation oder De-Eskalation dienen.

Sichere Methoden der molekularen Stratifizierung, z.B. zur Erkennung von Medulloblastomen die sich durch eine Aktivierung von Wnt-Signalwegen auszeichnen, werden im Hinblick auf mögliche Therapie De-Eskalationen bereits erforscht (Goschzik, Zur Muhlen et al. 2015). Solche Entscheidungen zur Therapie (De-)Eskalation können einen Gewinn oder Verlust sowohl von verbleibender Lebensqualität als auch einen Gewinn oder Verlust von Überlebenswahrscheinlichkeit nach sich ziehen. Ein prognostischer Marker muss eine hohe Zuverlässigkeit in der Vorhersage eines möglichen klinischen Verlaufs oder Therapieansprechens bieten, um zum Beispiel auch den in diesen Fällen oftmals entscheidenden Eltern der Betroffenen eine sichere Grundlage für eine Entscheidung zu geben (Henrich, Marra et al. 2014). Ein viel versprechender Marker wie LASP-1 sollte daher in kommenden klinischen Studien prospektiv überprüft werden.

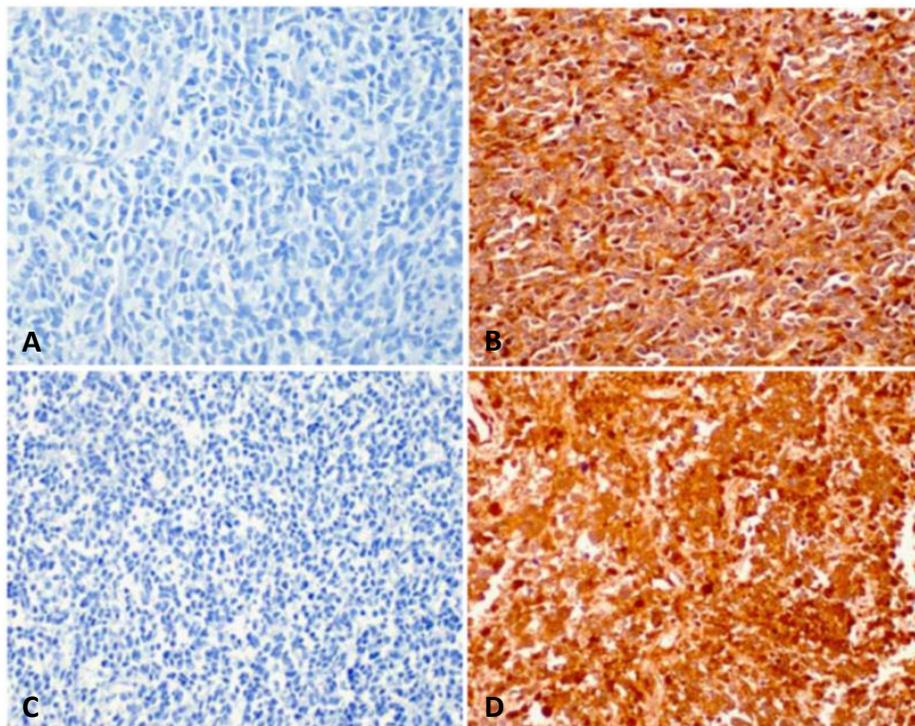


Abbildung 12: Beispielhafte immunhistochemische Darstellung zweier Medulloblastome mit erworbener LASP-1-Expression im Verlauf der Erkrankung. **A+C:** Primärtumoren, **B+D** lokale Rezidivtumore der entsprechenden Patienten. **A+C** zeigen kein Ansprechen der Immunhistochemie auf LASP-1, **B+D** zeigen eine deutliche LASP-1-Positivität in den Rezidivtumoren. Abbildung übernommen aus: Traenka, Remke et al. 2010; Suppl. Material, Figure 4.

5. Zusammenfassung

Medulloblastome (MB) gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Kindes- und Jugendalters, in der Gruppe der intrakraniell und intraspinal gelegenen Tumoren stellen sie gar die häufigste Entität in dieser Altersgruppe dar. Die Einteilung der nach WHO Grad IV klassifizierten Medulloblastome erfolgt derzeit hauptsächlich in vier Subgruppen entsprechend der jeweils vorherrschenden molekulargenetischen Veränderungen. Aberrationen der Chromosomen 7 und 17 sind dabei die häufigsten molekulargenetischen Veränderungen der als Hochrisiko-MB eingestuften Tumoren der Gruppe 3 und 4.

Das LIM- und SH3-Domänen-Protein „LASP-1“ ist auf Chromosom 17 in der Region q11 – q21.3 codiert und wird im humanen Organismus ubiquitär exprimiert. LASP-1 wurde in vergleichenden mRNA-Analysen als eines der am stärksten hochregulierten Transkripte in MB mit Chromosom 17q – Zugewinn identifiziert. Als ein Aktin – bindendes Gerüstprotein spielt LASP-1 eine wichtige Rolle in der Zytoskelettorganisation humaner Zellen. Die pathophysiologische Bedeutung einer LASP-1-Überexpression wurde bereits unter anderem in Brustkrebs- und Ovarialkrebszellen demonstriert, in denen ein LASP-1-silencing die Migration und Proliferation der Zellen hemmte.

Die Ergebnisse dieser Dissertation unterstreichen bisherige Annahmen, dass eine LASP-1-Überexpression eine wichtige Rolle in der Tumorigenese und Metastasenbildung humaner Tumoren spielt. Mittels Immunfluoreszenz konnte die Ko-Lokalisation von LASP-1 und F-Aktin in MB bestätigt werden. Aufgefallen ist dabei eine besonders starke Akkumulation der phosphorylierten Variante von LASP-1 in MB-Zellkernen. Funktionelle Untersuchungen zu LASP-1 in MB erbrachten zudem folgende Ergebnisse: ein LASP-1 silencing mittels small-interfering-RNA (siRNA) führte zu einer signifikant verringerten Proliferations- und Migrationsfähigkeit der untersuchten Tumorzellen. Die Adhäsionsfähigkeit der MB-Zellen konnte durch ein LASP-1-silencing hingegen signifikant gesteigert werden – ein erstmaliger direkter Nachweis des möglichen Einflusses von LASP-1 auf die Adhäsionsfähigkeit humaner Tumorzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen bisherige Erkenntnisse zur Funktion von LASP-1 in humanen Tumorzellen und übertragen diese auf das humane Medulloblastom. Parallel zu dieser Dissertation durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen (DKFZ, Heidelberg) stellten eine signifikante Korrelation einer hohen LASP-1-Expression in humanen MB und einem Zugewinn auf Chromosom 17q, einer fortgeschrittenen Metastasierung sowie schlechterem progressfreien und schlechterem Gesamtüberleben her. Nicht zuletzt im Kontext individualisierter Therapieansätze, basierend auf jeweiligen molekulargenetischen Veränderungen der Tumoren, könnte LASP-1 somit als ein prognostischer Marker in humanen Medulloblastomen dienen und zum Beispiel eine Therapie-(De)Eskalation stützen.

6. Literaturverzeichnis

- Aldosari, N.**, R. N. Wiltshire, A. Dutra, E. Schrock, R. E. McLendon, H. S. Friedman, D. D. Bigner and S. H. Bigner (2002). "Comprehensive molecular cytogenetic investigation of chromosomal abnormalities in human medulloblastoma cell lines and xenograft." *Neuro Oncol* **4**(2): 75-85.
- Bigner, S. H.**, H. S. Friedman, B. Vogelstein, W. J. Oakes and D. D. Bigner (1990). "Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts." *Cancer Res* **50**(8): 2347-2350.
- Butt, E.**, S. Gambaryan, N. Gottfert, A. Galler, K. Marcus and H. E. Meyer (2003). "Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146." *J Biol Chem* **278**(18): 15601-15607.
- Caretta, A. and C. Mucignat-Caretta** (2011). "Protein kinase a in cancer." *Cancers (Basel)* **3**(1): 913-926.
- Castellino, R. C.**, M. De Bortoli, X. Lu, S. H. Moon, T. A. Nguyen, M. A. Shepard, P. H. Rao, L. A. Donehower and J. Y. Kim (2008). "Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D." *J Neurooncol* **86**(3): 245-256.
- Chen, L.**, T. J. Maures, H. Jin, J. S. Huo, S. A. Rabbani, J. Schwartz and C. Carter-Su (2008). "SH2B1beta (SH2-Bbeta) enhances expression of a subset of nerve growth factor-regulated genes important for neuronal differentiation including genes encoding urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase 3/10." *Mol Endocrinol* **22**(2): 454-476.
- Chew, C. S.**, X. Chen, R. J. Bollag, C. Isales, K. H. Ding and H. Zhang (2008). "Targeted disruption of the Lasp-1 gene is linked to increases in histamine-stimulated gastric HCl secretion." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**(1): G37-G44.
- Chew, C. S.**, X. Chen, J. A. Parente, Jr., S. Tarrer, C. Okamoto and H. Y. Qin (2002). "Lasp-1 binds to non-muscle F-actin in vitro and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly in vivo." *J Cell Sci* **115**(Pt 24): 4787-4799.
- Chew, C. S.**, J. A. Parente, Jr., X. Chen, C. Chaponnier and R. S. Cameron (2000). "The LIM and SH3 domain-containing protein, lasp-1, may link the cAMP signaling pathway with dynamic membrane restructuring activities in ion transporting epithelia." *J Cell Sci* **113** (Pt 11): 2035-2045.
- Chiyomaru, T.**, H. Enokida, K. Kawakami, S. Tatarano, Y. Uchida, K. Kawahara, K. Nishiyama, N. Seki and M. Nakagawa (2012). "Functional role of LASP1 in cell viability and its regulation by microRNAs in bladder cancer." *Urol Oncol* **30**(4): 434-443.
- Clifford, S. C.**, M. E. Lusher, J. C. Lindsey, J. A. Langdon, R. J. Gilbertson, D. Straughton and D. W. Ellison (2006). "Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis." *Cell Cycle* **5**(22): 2666-2670.
- DeSouza, R. M.**, B. R. Jones, S. P. Lowis and K. M. Kurian (2014). "Pediatric medulloblastoma - update on molecular classification driving targeted therapies." *Front Oncol* **4**: 176.

- Dimova, I.**, B. Orsetti, V. Negre, C. Rouge, L. Ursule, L. Lasorsa, R. Dimitrov, N. Doganov, D. Toncheva and C. Theillet (2009). "Genomic markers for ovarian cancer at chromosomes 1, 8 and 17 revealed by array CGH analysis." *Tumori* **95**(3): 357-366.
- Elbashir, S. M.**, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* **411**(6836): 494-498.
- Ellison, D. W.**, O. E. Onilude, J. C. Lindsey, M. E. Lusher, C. L. Weston, R. E. Taylor, A. D. Pearson and S. C. Clifford (2005). "beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee." *J Clin Oncol* **23**(31): 7951-7957.
- Fire, A.**, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Friedman, H. S.**, P. C. Burger, S. H. Bigner, J. Q. Trojanowski, C. J. Wikstrand, E. C. Halperin and D. D. Bigner (1985). "Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med." *J Neuropathol Exp Neurol* **44**(6): 592-605.
- Frietsch, J. J.**, T. G. Grunewald, S. Jasper, U. Kammerer, S. Herterich, M. Kapp, A. Honig and E. Butt (2010). "Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long-term survival in female breast cancer." *Br J Cancer* **102**(11): 1645-1653.
- Gajjar, A. J. and G. W. Robinson** (2014). "Medulloblastoma-translating discoveries from the bench to the bedside." *Nat Rev Clin Oncol* **11**(12): 714-722.
- Goschzik, T.**, A. Zur Muhlen, G. Kristiansen, C. Haberler, H. Stefanits, C. Friedrich, K. von Hoff, S. Rutkowski, S. M. Pfister and T. Pietsch (2015). "Molecular stratification of medulloblastoma: comparison of histological and genetic methods to detect Wnt activated tumours." *Neuropathol Appl Neurobiol* **41**(2): 135-144.
- Gray, C. H.**, L. C. McGarry, H. J. Spence, A. Riboldi-Tunnicliffe and B. W. Ozanne (2009). "Novel beta-propeller of the BTB-Kelch protein Krp1 provides a binding site for Lasp-1 that is necessary for pseudopodial extension." *J Biol Chem* **284**(44): 30498-30507.
- Grunewald, T. G.** and E. Butt (2008). "The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both?" *Mol Cancer* **7**: 31.
- Grunewald, T. G.**, U. Kammerer, M. Kapp, M. Eck, J. Dietl, E. Butt and A. Honig (2007). "Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma." *BMC Cancer* **7**: 198.
- Grunewald, T. G.**, U. Kammerer, E. Schulze, D. Schindler, A. Honig, M. Zimmer and E. Butt (2006). "Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells." *Exp Cell Res* **312**(7): 974-982.
- Grunewald, T. G.**, U. Kammerer, C. Winkler, D. Schindler, A. Sickmann, A. Honig and E. Butt (2007). "Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation." *Br J Cancer* **96**(2): 296-305.
- Grunewald, T. G.**, S. M. Pasedag and E. Butt (2009). "Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Protooncogene LPP." *Transl Oncol* **2**(3): 107-116.

- Hailer, A.,** T. G. Grunewald, M. Orth, C. Reiss, B. Kneitz, M. Spahn and E. Butt (2014). "Loss of tumor suppressor mir-203 mediates overexpression of LIM and SH3 Protein 1 (LASP1) in high-risk prostate cancer thereby increasing cell proliferation and migration." *Oncotarget* **5**(12): 4144-4153.
- Hall, J. M.,** M. K. Lee, B. Newman, J. E. Morrow, L. A. Anderson, B. Huey and M. C. King (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." *Science* **250**(4988): 1684-1689.
- Hammarstrom, A.,** K. D. Berndt, R. Sillard, K. Adermann and G. Otting (1996). "Solution structure of a naturally-occurring zinc-peptide complex demonstrates that the N-terminal zinc-binding module of the Lasp-1 LIM domain is an independent folding unit." *Biochemistry* **35**(39): 12723-12732.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg** (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- He, B.,** B. Yin, B. Wang, C. Chen, Z. Xia, J. Tang, Y. Yuan, X. Feng and N. Yin (2013). "Overexpression of LASP1 is associated with proliferation, migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* **29**(3): 1115-1123.
- Henrich, N.,** C. A. Marra, L. Gastonguay, D. Mabbott, D. Malkin, C. Fryer, E. Bouffet, M. D. Taylor, J. Hukin, N. Scantlebury and L. Lynd (2014). "De-escalation of therapy for pediatric medulloblastoma: trade-offs between quality of life and survival." *Pediatr Blood Cancer* **61**(7): 1300-1304.
- Hislop, R. G.,** N. Pratt, S. C. Stocks, C. M. Steel, M. Sales, D. Goudie, A. Robertson and A. M. Thompson (2002). "Karyotypic aberrations of chromosomes 16 and 17 are related to survival in patients with breast cancer." *Br J Surg* **89**(12): 1581-1586.
- Ingram, W. J.,** C. A. Wicking, S. M. Grimmond, A. R. Forrest and B. J. Wainwright (2002). "Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells." *Oncogene* **21**(53): 8196-8205.
- Jacobsen, P. F.,** D. J. Jenkyn and J. M. Papadimitriou (1985). "Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice." *J Neuropathol Exp Neurol* **44**(5): 472-485.
- Kaatsch, P. S.,** C; (2014). "German Childhood Cancer Registry - Report 2013/2014 (1980 - 2013). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz. ." www.kinderkrebsregister.de.
- Keicher, C.,** S. Gambaryan, E. Schulze, K. Marcus, H. E. Meyer and E. Butt (2004). "Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase." *Biochem Biophys Res Commun* **324**(1): 308-316.
- Keles, G. E.,** M. S. Berger, J. Srinivasan, D. D. Kolstoe, M. S. Bobola and J. R. Silber (1995). "Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines." *Oncol Res* **7**(10-11): 493-503.
- Kool, M.,** A. Korshunov, M. Remke, D. T. Jones, M. Schlanstein, P. A. Northcott, Y. J. Cho, J. Koster, A. Schouten-van Meeteren, D. van Vuurden, S. C. Clifford, T. Pietsch, A. O. von Bueren, S. Rutkowski, M. McCabe, V. P. Collins, M. L. Backlund, C. Haberler, F. Bourdeaut, O. Delattre, F. Doz, D. W. Ellison, R. J. Gilbertson, S. L. Pomeroy, M. D. Taylor, P. Lichter and S. M. Pfister (2012). "Molecular subgroups of medulloblastoma:

an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas." *Acta Neuropathol* **123**(4): 473-484.

Kool, M., J. Koster, J. Bunt, N. E. Hasselt, A. Lakeman, P. van Sluis, D. Troost, N. S. Meeteren, H. N. Caron, J. Cloos, A. Mrcic, B. Ylstra, W. Grajkowska, W. Hartmann, T. Pietsch, D. Ellison, S. C. Clifford and R. Versteeg (2008). "Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features." *PLoS One* **3**(8): e3088.

Korshunov, A., A. Benner, M. Remke, P. Lichter, A. von Deimling and S. Pfister (2008). "Accumulation of genomic aberrations during clinical progression of medulloblastoma." *Acta Neuropathol* **116**(4): 383-390.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Li, B., L. Zhuang and B. Trueb (2004). "Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1." *J Biol Chem* **279**(19): 20401-20410.

Lin, Y. H., Z. Y. Park, D. Lin, A. A. Brahmabhatt, M. C. Rio, J. R. Yates, 3rd and R. L. Klemke (2004). "Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1." *J Cell Biol* **165**(3): 421-432.

Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* **114**(2): 97-109.

Mihlan, S., C. Reiss, P. Thalheimer, S. Herterich, S. Gaetzner, J. Kremerskothen, H. J. Pavenstadt, U. Lewandrowski, A. Sickmann and E. Butt (2013). "Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions." *Oncogene* **32**(16): 2107-2113.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.

Northcott, P. A., A. Korshunov, S. M. Pfister and M. D. Taylor (2012). "The clinical implications of medulloblastoma subgroups." *Nat Rev Neurol* **8**(6): 340-351.

Northcott, P. A., A. Korshunov, H. Witt, T. Hielscher, C. G. Eberhart, S. Mack, E. Bouffet, S. C. Clifford, C. E. Hawkins, P. French, J. T. Rutka, S. Pfister and M. D. Taylor (2011). "Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants." *J Clin Oncol* **29**(11): 1408-1414.

Novina, C. D. and P. A. Sharp (2004). "The RNAi revolution." *Nature* **430**(6996): 161-164.

Orth, M. F., A. Cazes, E. Butt and T. G. Grunewald (2015). "An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1): a versatile structural, signaling, and biomarker protein." *Oncotarget* **6**(1): 26-42.

Osawa, H., C. A. Smith, Y. S. Ra, P. Kongkham and J. T. Rutka (2009). "The role of the membrane cytoskeleton cross-linker ezrin in medulloblastoma cells." *Neuro Oncol* **11**(4): 381-393.

Pfister, S., M. Remke, A. Benner, F. Mendrzyk, G. Toedt, J. Felsberg, A. Wittmann, F. Devens, N. U. Gerber, S. Joos, A. Kulozik, G. Reifenberger, S. Rutkowski, O. D. Wiestler, B. Radlwimmer, W. Scheurlen, P. Lichter and A. Korshunov (2009). "Outcome

prediction in pediatric medulloblastoma based on DNA copy-number aberrations of chromosomes 6q and 17q and the MYC and MYCN loci." *J Clin Oncol* **27**(10): 1627-1636.

Phillips, G. R., T. R. Anderson, L. Florens, C. Gudas, G. Magda, J. R. Yates, 3rd and D. R. Colman (2004). "Actin-binding proteins in a postsynaptic preparation: Lasp-1 is a component of central nervous system synapses and dendritic spines." *J Neurosci Res* **78**(1): 38-48.

Pietsch, T., A. Waha, A. Koch, J. Kraus, S. Albrecht, J. Tonn, N. Sorensen, F. Berthold, B. Henk, N. Schmandt, H. K. Wolf, A. von Deimling, B. Wainwright, G. Chenevix-Trench, O. D. Wiestler and C. Wicking (1997). "Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched." *Cancer Res* **57**(11): 2085-2088.

Pizer, B. L. and S. C. Clifford (2009). "The potential impact of tumour biology on improved clinical practice for medulloblastoma: progress towards biologically driven clinical trials." *Br J Neurosurg* **23**(4): 364-375.

Raffel, C., R. B. Jenkins, L. Frederick, D. Hebrink, B. Alderete, D. W. Fults and C. D. James (1997). "Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations." *Cancer Res* **57**(5): 842-845.

Raman, D., J. Sai, N. F. Neel, C. S. Chew and A. Richmond (2010). "LIM and SH3 protein-1 modulates CXCR2-mediated cell migration." *PLoS One* **5**(4): e10050.

Ramaswamy, V., M. Remke, D. Shih, X. Wang, P. A. Northcott, C. C. Faria, C. Raybaud, U. Tabori, C. Hawkins, J. Rutka, M. D. Taylor and E. Bouffet (2014). "Duration of the pre-diagnostic interval in medulloblastoma is subgroup dependent." *Pediatr Blood Cancer* **61**(7): 1190-1194.

Remke, M., V. Ramaswamy and M. D. Taylor (2013). "Medulloblastoma molecular dissection: the way toward targeted therapy." *Curr Opin Oncol* **25**(6): 674-681.

Rutkowski, S. (2012). "Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Medulloblastom im Kindes- und Jugendalter " *AWMF-Register Nr. 025/009*(www.kinderkrebsinfo.de).

Schreiber, V., C. Moog-Lutz, C. H. Regnier, M. P. Chenard, H. Boeuf, J. L. Vonesch, C. Tomasetto and M. C. Rio (1998). "Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions." *Mol Med* **4**(10): 675-687.

Sengupta, R., A. Dubuc, S. Ward, L. Yang, P. Northcott, B. M. Woerner, K. Kroll, J. Luo, M. D. Taylor, R. J. Wechsler-Reya and J. B. Rubin (2012). "CXCR4 activation defines a new subgroup of Sonic hedgehog-driven medulloblastoma." *Cancer Res* **72**(1): 122-132.

Spence, H. J., L. McGarry, C. S. Chew, N. O. Carragher, L. A. Scott-Carragher, Z. Yuan, D. R. Croft, M. F. Olson, M. Frame and B. W. Ozanne (2006). "AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins." *Mol Cell Biol* **26**(4): 1480-1495.

Taylor, M. D., L. Liu, C. Raffel, C. C. Hui, T. G. Mainprize, X. Zhang, R. Agatep, S. Chiappa, L. Gao, A. Lowrance, A. Hao, A. M. Goldstein, T. Stavrou, S. W. Scherer, W.

T. Dura, B. Wainwright, J. A. Squire, J. T. Rutka and D. Hogg (2002). "Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma." *Nat Genet* **31**(3): 306-310.

Taylor, M. D., P. A. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y. J. Cho, S. C. Clifford, C. G. Eberhart, D. W. Parsons, S. Rutkowski, A. Gajjar, D. W. Ellison, P. Lichter, R. J. Gilbertson, S. L. Pomeroy, M. Kool and S. M. Pfister (2012). "Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus." *Acta Neuropathol* **123**(4): 465-472.

Thompson, M. C., C. Fuller, T. L. Hogg, J. Dalton, D. Finkelstein, C. C. Lau, M. Chintagumpala, A. Adesina, D. M. Ashley, S. J. Kellie, M. D. Taylor, T. Curran, A. Gajjar and R. J. Gilbertson (2006). "Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations." *J Clin Oncol* **24**(12): 1924-1931.

Tomasetto, C., C. Moog-Lutz, C. H. Regnier, V. Schreiber, P. Basset and M. C. Rio (1995). "Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains." *FEBS Lett* **373**(3): 245-249.

Tomasetto, C., C. Regnier, C. Moog-Lutz, M. G. Mattei, M. P. Chenard, R. Lidereau, P. Basset and M. C. Rio (1995). "Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17." *Genomics* **28**(3): 367-376.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4354.

Traenka, C., M. Remke, A. Korshunov, S. Bender, T. Hielscher, P. A. Northcott, H. Witt, M. Ryzhova, J. Felsberg, A. Benner, S. Riester, W. Scheurlen, T. G. Grunewald, A. von Deimling, A. E. Kulozik, G. Reifenberger, M. D. Taylor, P. Lichter, E. Butt and S. M. Pfister (2010). "Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma." *Cancer Res* **70**(20): 8003-8014.

Traenka, J., C. R. Hauck, U. Lewandrowski, A. Sickmann, S. Gambaryan, P. Thalheimer and E. Butt (2009). "Integrin-dependent translocation of LASP-1 to the cytoskeleton of activated platelets correlates with LASP-1 phosphorylation at tyrosine 171 by Src-kinase." *Thromb Haemost* **102**(3): 520-528.

Wang, H., W. Li, X. Jin, S. Cui and L. Zhao (2013). "LIM and SH3 protein 1, a promoter of cell proliferation and migration, is a novel independent prognostic indicator in hepatocellular carcinoma." *Eur J Cancer* **49**(4): 974-983.

Wang, Y. and T. D. Gilmore (2003). "Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear." *Biochim Biophys Acta* **1593**(2-3): 115-120.

Wilne, S., J. Collier, C. Kennedy, A. Jenkins, J. Grout, S. Mackie, K. Koller, R. Grundy and D. Walker (2012). "Progression from first symptom to diagnosis in childhood brain tumours." *Eur J Pediatr* **171**(1): 87-93.

Yang, F., X. Zhou, S. Du, Y. Zhao, W. Ren, Q. Deng, F. Wang and J. Yuan (2014). "LIM and SH3 Domain Protein 1 (LASP-1) Overexpression Was Associated with Aggressive Phenotype and Poor Prognosis in Clear Cell Renal Cell Cancer." *PLoS One* **9**(6): e100557.

Zeltzer, P. M., J. M. Boyett, J. L. Finlay, A. L. Albright, L. B. Rorke, J. M. Milstein, J. C. Allen, K. R. Stevens, P. Stanley, H. Li, J. H. Wisoff, J. R. Geyer, P. McGuire-Cullen, J. A. Stehens, S. B. Shurin and R. J. Packer (1999). "Metastasis stage, adjuvant

treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study." J Clin Oncol **17**(3): 832-845.

Zerbini, C., R. D. Gelber, D. Weinberg, S. E. Sallan, P. Barnes, W. Kupsky, R. M. Scott and N. J. Tarbell (1993). "Prognostic factors in medulloblastoma, including DNA ploidy." J Clin Oncol **11**(4): 616-622.

Zhao, L., H. Wang, C. Liu, Y. Liu, X. Wang, S. Wang, X. Sun, J. Li, Y. Deng, Y. Jiang and Y. Ding (2010). "Promotion of colorectal cancer growth and metastasis by the LIM and SH3 domain protein 1." Gut **59**(9): 1226-1235.

Zhao, T., H. Ren, J. Li, J. Chen, H. Zhang, W. Xin, Y. Sun, L. Sun, Y. Yang, J. Sun, X. Wang, S. Gao, C. Huang, H. Zhang, S. Yang and J. Hao (2015). "LASP1 is a HIF1alpha target gene critical for metastasis of pancreatic cancer." Cancer Res **75**(1): 111-119.

Zheng, J., S. Yu, Y. Qiao, H. Zhang, S. Liang, H. Wang, Y. Liu, F. Zhou, J. Jiang and S. Lu (2014). "LASP-1 promotes tumor proliferation and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer." J Cancer Res Clin Oncol.