

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie,
Zentrallabor**

der Universität Würzburg

Vorstand: Univ.-Professor Dr. med. Ulrich Walter

**Zelluläre, histologische und statistische
Untersuchungen zur Funktion des Proteins LASP-1 in
humanen Ovar- und Mammakarzinomen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Thomas Georg Philipp Grünewald

aus Starnberg

München, November 2008

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Walter

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Dietl

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19. November 2008

Der Promovend ist Arzt

Für meine Familie

Vorwort

Seit dem Beginn der Aufklärung gilt bis heute die menschliche Vernunft als das geeignete Instrument zum systematischen und damit wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn. Doch wie soll man dieses Instrument richtig einsetzen? Wie kann man Fehler vermeiden und wo liegen die Grenzen der Vernunft?

Als junger Wissenschaftler lag es in meinem Selbstverständnis genau auf diese Fragen zu aller erst eine Antwort zu finden. Fündig wurde ich in den „Regulae ad directionem ingenii“, den Regeln zum richtigen Gebrauch des Verstandes, verfasst von einem der Gründungsväter der Aufklärung, René Descartes (1596 - 1650). Descartes gibt vier scheinbar einfache Anweisungen zur richtigen Verwendung der Vernunft an, um alles Menschenmögliche zu tun, Irrtum zu vermeiden. Folgende Regeln, die ich kurz zitieren möchte, waren für mich von großem Wert für die Anfertigung dieser Dissertation und werden auch für meine weitere wissenschaftliche Laufbahn ein Leitfaden zu neuen Erkenntnissen sein:

„Als ich in meiner Jugend geniale Erfindungen kennen lernte, suchte ich, ob ich sie nicht selbständig finden könnte, auch ohne Studium eines Autors: dabei kam ich allmählich darauf, dass ich bestimmte Regeln benützte:

1. ...unter Vermeidung aller Vorurteile nur das als wahr anzuerkennen, was sich klar und deutlich erkennen lässt.
2. ...Problemstellungen soweit als möglich in Teile zu zerlegen.
3. ...vom einfachen Objekt gleichsam stufenweise zum Komplizierteren zu schreiten.
4. ...durch genaue Aufzählungen die Sicherheit des Systems sicherzustellen, damit ich nichts übersehe.

In uns liegen die Keime der Erkenntnis, wie (die Funken) in einem Feuerstein, die von den Philosophen durch die Vernunft zutage gefördert werden.“

(Aus „Descartes - die Genese des cartesianischen Rationalismus“; Wolfgang Röd; C.H. Beck, München 1995)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologischer und nosologischer Hintergrund	1
1.2 Funktionelle Struktur des Proteins LASP-1	2
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	6
2. Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Kulturzellen	7
2.1.2 Lösungen, Medien und Seren für die Zellkultur	7
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	8
2.1.4 Transfektionsreagenzien, small interfering RNAs und Vektoren	9
2.1.5 Antikörper, Fluoreszenz-markierte Antikörper und Phalloidin	10
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	11
2.1.7 Geräte und Software	12
2.2 Methoden	14
2.2.1 Gewebeproben	14
2.2.2 Immunhistochemie	14
2.2.3 Patientenstudie	16
2.2.3.1 Aufarbeitung der Gewebeproben	16
2.2.3.2 Histopathologische Befundung der LASP-1-Expression	16
2.2.4 Zellkulturbedingungen	19
2.2.5 Splitten adhärenter Zellen	19
2.2.6 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen	20
2.2.7 Sequenzen der siRNA Oligonukleotide	20
2.2.8 Aufbereitung der siRNA und Transfektion der Zellen mit siRNA	21
2.2.9 Überexpression von LASP-1 in BT20- und PTK2-Zellen	23
2.2.10 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test	23
2.2.11 Denaturierende Gelelektrophorese (nach Laemmli 1970 [42])	24
2.2.12 Western-blot (nach Towbin et al. 1979 [43])	25
2.2.12.1 Transfer auf die Nitrocellulosemembran	25
2.2.12.2 Proteinfärbung auf der Nitrocellulosemembran	26
2.2.12.3 Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern	26
2.2.13 Zählung der Zellen und Proliferationsassay	28
2.2.14 Viabilitätsmessung mit Trypan-Blau	28
2.2.15 Ausschluss von Apoptose und Caspase-3-Standard	29
2.2.16 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse	29
2.2.17 Immunfluoreszenz	30
2.2.18 Migrationsassay	32
2.2.19 Statistische Auswertung der Daten	32
3. Ergebnisse	34
3.1 LASP-1 wird von Ovar- und Mammakarzinomen überexprimiert	34
3.2 Patientenstudie: LASP-1-Expression korreliert signifikant mit Staging von ductalen Mammakarzinomen	36
3.3 LASP-1-knock-down hemmt die Proliferation	42
3.4 ENAH-knock-down hemmt nicht die Proliferation	45
3.5 LASP-1-knock-down induziert Akkumulation in der G2-Phase	47
3.6 LASP-1-knock-down reduziert Zyxin-Konzentration an fokalen Kontakten	48

3.7 LASP-1-Expression in nicht-neoplastischen Zellen steigert die Migration	51
4. Diskussion	54
4.1 Diskussion der Ergebnisse	54
4.1 Relevanz der Daten und Perspektive	61
5. Zusammenfassung	63
6. Appendix: Rohdaten der Patientenstudie	65
6.1 Invasive ductale Mammakarzinome	65
6.2 Ductale Carcinomata in situ (DCIS)	67
6.3 Fibroadenome	67
7. Literaturverzeichnis	69

1. Einleitung

1.1 Epidemiologischer und nosologischer Hintergrund

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau und verursacht etwa 20 % der Krebstodesfälle bei Frauen. Das Lebenszeitrisiko einer Frau der westlichen Welt an Brustkrebs zu erkranken beträgt 12.5 % [1].

Trotz aller Bemühungen konnte in den letzten 30 Jahren die Mortalität des Mammakarzinoms nur unwesentlich herabgesetzt werden. Sie liegt zur Zeit etwa bei 30 pro 100.000 Frauen pro Jahr und ist damit die häufigste Todesursache bei Frauen in der Altersgruppe zwischen 35 und 55 Jahren [2].

Eierstockkrebs ist weltweit betrachtet der sechsthäufigste Krebs bei Frauen, mit schätzungsweise 190.000 neuen Fällen und 114.000 Todesfällen pro Jahr, die durch dieses Neoplasma verursacht werden [3, 4]. Epitheliale Ovarkarzinome repräsentieren dabei ca. 90 - 95 % aller malignen Eierstocktumore [5, 6], welche, wegen fehlender oder unspezifischer Symptome in frühen Stadien, in über 60 % der Fälle erst in fortgeschrittenen Tumorstadien erkannt werden [6].

Das metastasierte Mammakarzinom sowie das metastasierte Ovarkarzinom sind bislang generell unheilbar, verbunden mit einem mittleren Überleben von nur wenigen Jahren. Trotz aller Anstrengungen, das therapeutische Ergebnis zu verbessern, bleibt das Ovarkarzinom der tödlichste gynäkologische Tumor der westlichen Welt [7], was sich in einer mittleren Fünf-Jahres-Überlebensrate von unter 35 % widerspiegelt [8, 9]. Deshalb sind neue therapeutische und diagnostische Weiterentwicklungen unerlässlich.

Die Überexpression verschiedener membranständig und zytosolisch lokalisierter Proteine, wie z. B. HER-2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) bei Mammakarzinomen, bestimmen maßgeblich das Tumorwachstum und die Prognose der Patientinnen.

HER-2/neu überexprimierende Mammakarzinome werden seit 1998 mit dem monoklonalen humanisierten murinen IgG1-Klasse Antikörper Trastuzumab (Herceptin®; Genentech Corporation, CA, USA) erfolgreich behandelt. Trastuzumab ist daher eine wichtige therapeutische Option mit bewiesener

Indikation bei fortgeschrittenem metastasiertem Brustkrebs [10]. Motiviert durch die Erfolgsgeschichte von Herceptin[®]/Trastuzumab in den vergangenen Jahren, ist die Identifikation neuer Gene, die in Krebszellen selektiv überexprimiert sind und womöglich das Potential haben, als ideale Angriffspunkte für neuartige Arzneimittel zu dienen, ein erklärtes Ziel der onkologischen Forschung [11].

Über 90 % aller epithelialen Ovarumore sind sporadischer Natur, ohne Keimbahnmutationen in bekannten Suszeptibilitätsloci. Die restlichen Karzinome des Ovars sind erblich bedingt. Neuere Studien haben gezeigt, dass Frauen mit einem Verlust der Heterozygotie im BRCA1 (breast cancer 1) Gen, das auf dem Chromosomenabschnitt 17q21 lokalisiert und kausal an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt ist, ein im Vergleich zur Normalbevölkerung sechs- bis 61-fach erhöhtes Risiko haben, zusätzlich zum Mammakarzinom ein Ovarkarzinom zu entwickeln [12].

1.2 Funktionelle Struktur des Proteins LASP-1

Das Gen des LIM- und SH3-Domänen Proteins, LASP-1 (LIM and SH3 protein 1), das erstmals mittels einer cDNA-Datenbank von Brustkrebsmetastasen beschrieben wurde, liegt wie das BRCA1 Gen auf dem humanen Chromosomenabschnitt 17q21 - eine Region, die in 20-30 % aller Mammakarzinome mutiert ist [13, 14].

Microarray Analysen aus embryonalem und fetalem bovinem Brustgewebe zeigten, dass LASP-1 vor allem in den Phasen der frühen Brustentwicklung im epithelialen Gewebe exprimiert wird, hier später jedoch nur noch in geringem Maße nachweisbar ist [15], was auf eine mögliche Beteiligung von LASP-1 an der zellulären Migration und Proliferation, sowie Differenzierung der Brustdrüsenzellen während der Organogenese hinweisen könnte. Die These einer funktionellen Bedeutung von LASP-1 für die Organogenese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass LASP-1 als hochkonserviertes Protein speziesübergreifend auch in vielen anderen Geweben speziell in der frühen Embryofetalzeit exprimiert wird [16, 17].

Das Gen für humanes LASP-1 codiert ein Protein, das, wie die untenstehende Grafik schematisch illustriert, aus 261 Aminosäuren besteht und mit einer N-terminalen LIM-Domäne, gefolgt von zwei Actinbindungsstellen (R1 und R2) und einer C-terminalen src-homology (SH3-) Domäne, ausgestattet ist. LASP-1 ist das erste Protein einer neu entdeckten Proteinfamilie, das LIM- und SH3-Domänen in dieser Weise kombiniert, und trägt deshalb das Suffix 1.



Die verschiedenen Proteinabschnitte von LASP-1 haben keine enzymatische Aktivität, sind aber für die Kommunikation mit anderen Proteinen notwendig: So vermitteln z. B. die Actinbindungsstellen des Proteins, die auch als „nebulin-like-repeats“ R1 und R2 bezeichnet werden, die Interaktion von LASP-1 und dem Actin-Zytoskelett. Bislang konnte eine Interaktion von LASP-1 mit dem Actin-Zytoskelett allerdings nur an Membranfortsätzen, nicht aber entlang der Actin-Stressfasern nachgewiesen werden [18-21].

Obwohl die genaue Funktion von LASP-1 immer noch weitestgehend unklar ist, konnten vorhergehende Arbeiten bereits zeigen, dass LASP-1 vorwiegend an Orten des „Actin-assembly“, wie fokalen Kontakten und Adhäsionspunkten, sowie an Lamellipodien, Pseudopodien und an „membrane-ruffles“ lokalisiert ist [22-24].

LASP-1 ist auch ein wichtiges Strukturprotein im ZNS und reichert sich dort spezifisch an der postsynaptischen Membran von dendritischen Spines an. Die artifizielle Überexpression von LASP-1 in Zellen des Phäochromozytoms führt darüber hinaus zur Ausbildung von axonalen und dendritischen Zellfortsätzen, was auf eine wichtige Funktion von LASP-1 in der neuronalen Differenzierung hinweist [25, 26]. Erst kürzlich konnte demonstriert werden, dass LASP-1 zusammen mit anderen Proteinen wie Fascin an fokalen Kontakten Actinfilamente als so genanntes „cross-linking“ Protein durch Quervernetzung stabilisieren kann. Dabei besteht aber keine feste Bindung, sondern nur eine

stärkere Anreicherung von LASP-1 an F-Actin, begleitet von einem beschleunigten Austausch mit dem nicht an F-Actin gebundenen Anteil von LASP-1 im Zytoplasma [27].

Die SH3-Domäne am C-Terminus vermittelt durch Bindung an Prolin-reiche Sequenzen Protein-Protein-Interaktionen mit Zyxin, Palladin, Dynamin, Pro-IL-16, lipoma preferred partner (LPP) und wahrscheinlich auch mit vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) [20, 28-31]. Des Weiteren interagiert LASP-1 durch seine zwei nebulin-like-repeats mit dem Kelch-related-protein 1, Krp1, einem Protein, das an fokalen Kontakten funktionell in die Zellmigration involviert ist. Mutationsanalysen von LASP-1 belegten aber, dass gerade seine SH3-Domäne für die pseudopodiale Elongation und Invasion notwendig ist [32]. Obwohl bislang noch kein Bindungspartner für die LIM-Domäne von LASP-1 identifiziert wurde, konnten bisherige Untersuchungen zeigen, dass das Doppel-Zink-Finger-Modul innerhalb der LIM-Domäne eine morphologisch und vielleicht auch funktionell unabhängige Faltungseinheit ist, die LASP-1 dazu befähigen könnte direkt an DNA zu binden [33]. Im Allgemeinen enthalten LIM-Domänen spezialisierte Doppel-Zink-Finger-Strukturen, interagieren mit vielen verschiedenen Proteinen (z. B. Zytoskelettproteinen) und bilden auch Homodimere, um dann als Transkriptionsfaktor wirksam zu sein [34, 35].

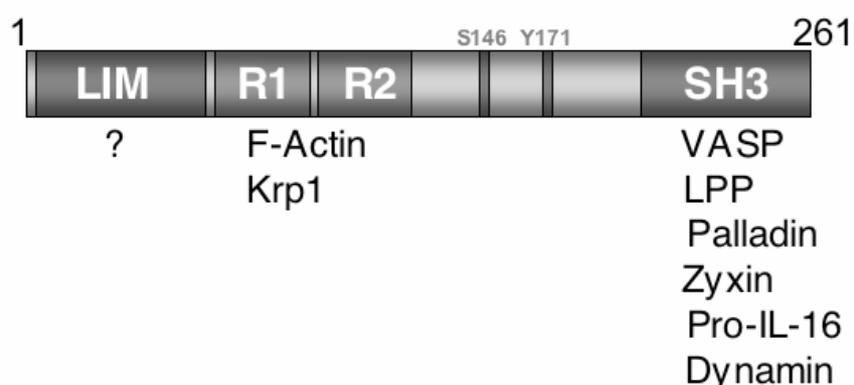
Die Präsenz von LIM- und SH3-Domänen und die daraus resultierenden Interaktionsmöglichkeiten deuten deshalb zusätzlich zur Funktion als Actinfilamentstabilisator auf eine Funktion als Adapterprotein in Proteinkomplexen höherer Ordnung hin.

Dadurch könnte LASP-1 auch als Signaltransduktor fungieren: So wurde bereits gezeigt, dass LASP-1 ein Phosphoprotein mit zwei spezifischen Phosphorylierungsstellen an Serin 146 und Tyrosin 171 ist [18, 24]. Die Erhöhung von intrazellulärem cAMP und cGMP mit nachfolgender Phosphorylierung an Serin 146 führt beispielsweise in gastralen Parietalzellen des Kaninchens zu einer partiellen Translokation von LASP-1 von der Membran weg zu den apikalen, F-Actin-reichen, intrazellulären Canaliculi, also den Orten der aktiven HCl-Sekretion, was dann auch tatsächlich die Säureproduktion der Zellen steigert [22, 23]. Wahrscheinlich bewirkt LASP-1 bei diesem Prozess in

Interaktion mit dem zytosolischen Protein Dynamin eine vermehrte Verschmelzung von intrazytoplasmatischen Vesikeln, die mit Säuresekretionsproteinen beladen sind, mit der Plasmamembran [31]. Darüber hinaus resultiert die Phosphorylierung von Serin 146 in einer Bewegung des Proteins aus den fokalen Kontakten heraus in das Zytosol, was mit einer verminderten Zellmigration verbunden ist [18].

Im Gegensatz dazu bewirkt die Phosphorylierung von LASP-1 an Tyrosin 171 durch die Abelson-Tyrosinkinase keine Veränderung der Migrationsdynamik, ist aber mit der Initiation von Apoptose und ebenfalls mit dem Verlust von LASP-1 an fokalen Kontakten assoziiert [24]. Die Abelson-Tyrosinkinase ist ein wichtiges Onkoprotein, das an der Entstehung von B-Zell-Lymphomen beteiligt ist [36]. In T-Lymphozyten konnte bereits gezeigt werden, dass LASP-1 mittels seiner SH3-Domäne mit Prointerleukin 16 (Pro-IL-16), dem Vorläuferprotein von Interleukin 16, interagiert [30]. Pro-IL-16 ist sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma von T-Zellen lokalisiert und kann im Zusammenspiel mit anderen Faktoren den Zellzyklus in der G0/G1-Phase arretieren [37], was impliziert, dass auch LASP-1 an der Zellzykluskontrolle beteiligt sein könnte.

Eine Übersicht über die multiplen Interaktionspartner von LASP-1, die bis dato bekannt sind, spiegelt untenstehende Grafik wider:



Weiterhin wurde eine verstärkte Expression von LASP-1 in metastasiertem Brustkrebs beobachtet, was auf eine Beziehung zwischen der LASP-1-Überexpression und Zellbeweglichkeit hinweisen könnte [14]. Erstaunlicherweise verringert sowohl die Überexpression, als auch die

Depletion von LASP-1 in COS-7-, HEK293- und MCF7-Zellen die basale und die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Zellmigration [24].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Aus den bisherigen funktionellen Beobachtungen ergeben sich die Fragen, welche Rolle LASP-1 in Tumorzellen spielt, und ob eine LASP-1-Überexpression tatsächlich für die Progression von malignen Erkrankungen verantwortlich sein kann?

Ziel meiner Promotionstätigkeit war es deshalb, mittels Experimenten auf zellulärer und histologischer Ebene die genaue Funktion von LASP-1 in Krebszellen zu untersuchen und mit einer Patientenstudie die klinische Relevanz der LASP-1-Überexpression in humanem Brustkrebsgewebe im Hinblick auf prognostische und therapeutische Möglichkeiten zu bestimmen.

Dazu wurde LASP-1 mittels RNA-Interferenz in verschiedenen Ovar- und Mammakarzinomzelllinien herunter reguliert und anschließend das zelluläre Proliferations- und Migrationsverhalten im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit Nonsens-Oligonukleotiden transfiziert wurden, verglichen. Immunfluoreszenz-Aufnahmen und Western-blots gaben dabei Aufschluss über Veränderungen der Lokalisation und Expression von bekannten LASP-1-Bindungspartnern. Mit durchflusszytometrischen Analysen wurde ferner die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht.

In einer begleitend durchgeführten Patientenstudie wurde in Kooperation mit der Würzburger Universitäts-Frauenklinik an Gewebeschnitten von invasiven Mammakarzinomen, ductalen Carcinomata in situ (DCIS) und Fibroadenomen die LASP-1-Expression histologisch beurteilt und mit den Parametern Alter zum Operationszeitpunkt, Tumorstaging und -grading sowie histopathologischen Kriterien wie Hormonrezeptorstatus und HER-2/neu-Status korreliert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kulturzellen

humane Brustkrebszelllinien:	BT20, MCF7
humane Ovarkarzinomzelllinie:	SKOV-3
Mesangiumzellen der australischen Beutelratte:	PTK2-Zellen (Potorous tridactylis kidney)

2.1.2 Lösungen, Medien und Seren für die Zellkultur

Name:	Hersteller:
Dulbecco`s modified Eagle medium (DMEM)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Reduced Serum Medium (OPTI-MEM® I)	Gibco, Paisley, Schottland, UK
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA, Linz, Österreich
Antibiotic/Antimycotic Solution (100×) A5955	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution (1×) T3924	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
HBCA	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	PAA, Linz, Österreich

Steriles 10×PBS : (phosphate buffered saline)

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na₂HPO₄·7H₂O 26,8 g

KH₂PO₄ 2,4 g; ad 1 l H₂O und pH 7,4 einstellen, dann autoklavieren.

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Name:	Hersteller:
Acrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
antibody diluent	DAKO, Hamburg, Deutschland
Antikörper Färbekit (LSAB-Kit K 0675)	DAKO, Hamburg, Deutschland
APES (3-Aminopropyltri-Ethoxysilan)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Beriglobin	Aventis-Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Caspase-3-Standard	AG Becker, Dermatologie, Uni-Würzb.
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ECL und ECL plus	Pierce, Rockford, IL, USA
Entwicklerlösung (Diamino-Benzidin)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bissuccinimidylsuccinat	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Histogreen Chromogen	Linaris, Wertheim, Deutschland
Kaninchen-Normalserum X 0902	DAKO, Hamburg, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (Non-Fat Dry Milk)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Mowiol 4-88	Hoechst, Frankfurt, Deutschland
MultiMark Multi-Coloured Standard	Invitrogen, Paisley, Schottland, UK
NaOH 2N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphorsäure (85 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Protein A Sepharose™ CL-4B und Sephadex G25	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Temed	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trizol [®] Reagent	Gibco, Paisley, Schottland, UK
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Wasserstoffperoxyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Alle anderen Chemikalien und Reagenzien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

2.1.4 Transfektionsreagenzien, small interfering RNAs und Vektoren

Name:	Hersteller:
METAFECTENE Transfektionsreagenz	Biontex, München, Deutschland

siRNA:	Hersteller:	Sequenz:
Anti-LASP-1	Dharmacon RNA Technologies, Lafayette, CO, USA	5'-CUUAUCCAGACAGUUCACCCdTdT-3'; entspricht Basen 49 - 69
scrambled Neuropilin1 (sNP1)	Dharmacon RNA Technologies, Lafayette, CO, USA	5'-AGAGAUGUAGUCGCUCGCUdTdT-3'; keine Entsprechungen
Anti-ENAH	Dharmacon RNA Technologies, Lafayette, CO, USA	5'-CUGUGUAGCUUGAUUGUACdTdT-3'; entspricht Basen 204 - 224

Vektor:	Hersteller:	Verwendungszweck/Resistenz:
pcDNA ₃	Invitrogen, Paisley, Schottland, UK	Expression in PTK2-Zellen; Ampicillin

2.1.5 Antikörper, Fluoreszenz-markierte Antikörper und Phalloidin

Primärantikörper:

Bezeichnung und Hersteller:	Antigen:	Typ:	Verdünnung:
VASP M4 (Nanotools, Tübingen, Deutschland)	VASP	polyklonal; Maus	1:1000
LASP-1 (immunoGlobe, Himmelstadt, Deutschland)	LASP-1	polyklonal; Kaninchen	1:10000
Anti-Vinculin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	Vinculin	monoklonal; Maus	1:200
Anti-Caspase-3 (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)	Caspase-3 Pro- Caspase-3	polyklonal; Kaninchen	1:1000
Anti-PKA (Priv.-Doz. Dr. med. Suzanne Lohmann, Universität Würzburg)	PKA	polyklonal; Kaninchen	1:1000
Anti-hMena (ENAH) (BD Bioscience, San Diego, CA, USA)	hMena (= ENAH)	monoklonal; Maus	1:2000
Anti-Zyxin (Dr. J. Wehland, GBF Braunschweig, Deutschland)	humanes Zyxin	Maushybridom -Überstand	1:100

Sekundärantikörper:

Bezeichnung und Hersteller:	Markierung:	Verdünnung:
Goat-anti-rabbit IgG (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	Meerrettich- Peroxidase	1:5000
Goat-anti-mouse IgA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	Meerrettich- Peroxidase	1:5000
Goat-anti-mouse IgA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)	FITC-labeled	1:5000
Goat-anti-rabbit IgA (Dianova, Hamburg, Deutschland)	Cy3-labeled	1:2000

EnVision/rabbit detection system (DAKO, Hamburg, Deutschland)	Meerrettich- Peroxidase	nicht notwendig
--	----------------------------	--------------------

Fluoreszenz-markiertes Phalloidin:

Bezeichnung und Hersteller:	Verdünnung:
Oregon green Phalloidin (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)	1:30

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Art:	Bezeichnung, Hersteller bzw. Versandhaus:
24 mm Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Desinfektionsmittel	Teralind liquid, Schülke&Mayr, Norderstedt, Deutschland
Filme für Chemilumineszenz	X-RAY Film Super RX; FUJI medical GmbH, Düsseldorf, 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
Pipettenspitzen	Filter-Tips, Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	(15 ml; 50 ml) Greiner, Frickenhausen, Deutschland (1,5 ml; 2 ml) Eppendorf, Hamburg, Deutschland
96-well Platten	Cellstar, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sicherheitshandschuhe	SafeSKIN PFE, Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien
six-well Platten	9 cm ² Cellstar, Greiner, Frickenhausen, Deutschland

2.1.7 Geräte und Software

Gerät:	Bezeichnung und Hersteller:
Blot-Kammer	TRANS-BLOT™, BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Brutschrank	Model 3336, Labotect, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer	LSR1, BectonDickinson Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Noras, Würzburg, Deutschland
ELISA-Reader	THERMOmax microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Feinwaagen	Universal und Type 1801, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filmentwickler	X-OMAT M 35 (Kodak-Industrie, Cedex, Frankreich) OPTIMAX (PROTEC, Oberstenfeld, Deutschland)
Geltrockner	MODEL583 Gel Dryer, BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Hood, sterilGard	The Baker Company, Stanford, Maine, USA
Magnetrührer	Ika, Janke&Kunkel, Staufen, Deutschland
Heizplatte	Stirrer/Hotplate, Corning, New York, USA
Linearschüttler	DUOMAX 1030, Heidolph, Düsseldorf, Deutschland
Kryotom	CM 1900, Leica, Bensheim, Deutschland
Mikroinjektionsspritzen	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Mikroskope	Lichtmikroskop: Axiovert 25 (ZEISS, Jena, Deutschland) Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 200 (ZEISS, Jena, Deutschland)
pH-Meter	PHM 82 STANDARD pH-METER, RADIOMETER, Kopenhagen, Dänemark
Photometer	Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Pipette (elektrisch)	accu-jet pro, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipetten (manual)	2, 100, 1000 µl Eppendorf-Reference, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäßständer	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Spannungsgeräte	GENE POWER SUPPLY GPS 200/400, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland; POWER PAC 200 und MODEL 200/2.0 POWER SUPPLY, BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Speedvac	Speed Vac® Plus SC 110 A, Savant Instruments Inc., New York, USA
Software	Graph Pad Prism 4.0a Macintosh Version Mac OS 10.3 Panther, Apple, CA, USA Metamorph 1.0, Molecular Devices Corp., USA Microsoft Office 2003 Macintosh Version MPLUS, Phoenix Flow Systems, San Diego, USA Odyssee System Li-Cor, Bad Homburg, Deutschland Statistika 7.0 Statsoft, Tulsa, USA
Wasserbad	Julabo MB, Seelbach, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); ROTANTA/S und ROTIXA/K (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
Zellzähler	Coulter counter Z2 (Beckman, Fullerton, CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebeproben

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Würzburg (Ethikantragsnummer: 67/04) wurde archiviertes, eingefrorenes Tumorgewebe aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg, unter strenger Einhaltung des Datenschutzes sowie aller vorgegebenen ethischen Richtlinien für den Umgang mit Patientenmaterial, für immunhistochemische Analysen bereitgestellt.

Die Gewebeproben stammten aus verschiedenen ductalen Carcinomata in situ (DCIS) ohne Anhalt für invasives bzw. metastatisches Wachstum, invasiven Mammakarzinomen mit/ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen und aus Fibroadenomen oder benignem Brustgewebe aus Mammareduktionsplastiken. Weiterhin wurden zehn epitheliale Ovarkarzinome histologisch untersucht. Die definitive Diagnose aus dem archivierten, pathologischen Befundprotokoll wurde immer durch Nachkontrolle eines Pathologen (Prof. Dr. med. Matthias Eck, Institut für Pathologie der Universität Würzburg) bestätigt. Dabei wurden alle Tumorproben, die in der Patientenstudie untersucht wurden, vorher nach WHO-Kriterien klassifiziert. Das Grading der invasiven Karzinome und einiger DCIS erfolgte anhand Kriterien der „Nottingham City Hospital Pathologists“ [38], das Staging analog der gültigen TNM-Parameter [39].

2.2.2 Immunhistochemie

Die humanen Gewebeproben wurden nach pathologischer Begutachtung in Paraffin fixiert. Aus den Tumorproben sowie aus dem benignen Mammagewebe wurden mit einem Kryotom 2 - 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf APES (3-Aminopropyltri-Ethoxysilan) beschichtete Objektträger aufgetragen und eine Stunde lang bei 60°C getrocknet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in

einem mehrstufigen Prozess entparaffiniert: Inkubation in Xylol für etwa 15 min; erneute Inkubation in frischem Xylol für etwa 5 min; danach zweimal 5 min in 100 % Ethanol, gefolgt von je 5 min in 90 % und 70 % Ethanol (in PBS verdünnt) und schließlich 10 min in PBS.

Zur Blockierung der endogenen Gewebesperoxidase wurden die Präparate 20 min in 1 % (v/v) H₂O₂ in Methanol gestellt, danach mit dH₂O gewaschen und in Pufferlösung (Zitronensäuremonohydrat 0.6 g / 300 ml dH₂O mit NaOH auf pH 6 titriert) bei 800 W für 15 min in der Mikrowelle gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wurden die Gewebeschnitte erneut mit dH₂O gespült. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren, erfolgte für 20 min eine Behandlung mit humanem Immunglobulin (Beriglobin) in PBS 1:10 mit darauf folgender Wäsche in PBS. Danach konnten die Gewebeschnitte mit polyklonalen Anti-LASP-1 Antikörpern in der Verdünnung 1:1000, gelöst in antibody diluent von DAKO (Hamburg, Deutschland), für 45 min bei RT inkubiert werden.

Parallel wurde stets eine Negativkontrolle mit Kaninchen-Normalserum 1:1000 angefertigt. Nach 45 min Inkubation in der feuchten Kammer wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und Lösung 1 des Nachweissystems aufgetragen und darin für 15 min inkubiert. Mit Lösung 2 wurde in gleicher Weise verfahren (Streptavidin-HRP). LASP-1 konnte so unter Verwendung des EnVision/rabbit detection systems (DAKO) und dem Chromogen Histogreen von Linaris (Wertheim, Deutschland) dargestellt werden. Zur Kontrastverstärkung wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) gegengefärbt und mit Leitungswasser gespült. Abschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (PBS mit 70 % und 90 % Ethanol, dann 2x mit 100 % Ethanol und danach 2x mit Xylol) entwässert. Zur Versiegelung der Gewebeschnitte diente Vitro-Clud.

2.2.3 Patientenstudie

2.2.3.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität Würzburg und unter Einhaltung aller datenschutzrechtlicher Bestimmungen wurden in Kooperation mit der Würzburger Universitäts-Frauenklinik Gewebeproben von 83 ductalen Mammakarzinomen, 25 DCIS und 18 Fibroadenomen, die alle von Patientinnen stammen, die in den Jahren 2000 bis 2006 in der Frauenklinik operiert wurden, gesammelt. Die Gewebeproben waren dabei stets in Paraffin als so genannte Paraffinblöcke konserviert und bei – 80°C aufbewahrt worden. Vor immunhistochemischer Färbung wurden von den Tumorproben mit einem Kryotom 2 - 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die dann, wie unter 2.2.2 beschrieben, entparaffiniert, gefärbt und versiegelt wurden.

2.2.3.2 Histopathologische Befundung der LASP-1-Expression

Für die histologische Bestimmung der LASP-1-Expression an Gewebeschnitten wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Matthias Eck (Institut für Pathologie der Universität Würzburg) ein spezielles „Scoring-System“ entwickelt, das im Folgenden genau erläutert wird.

Nach der Färbung wurden die Gewebeproben von drei Untersuchern, namentlich Frau Priv.-Doz. Dr. hum. biol. Ulrike Kämmerer (Universitäts-Frauenklinik, Würzburg), Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Elke Butt-Dörje und mir (beide Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallabor, Universität Würzburg), unabhängig voneinander, unter Verwendung eines Lichtmikroskops, befundet. Pro Histoschnitt wurden mindestens zehn high-power-fields in der Vergrößerung 40x begutachtet. Als Negativ-Kontrolle dienten Schnitte, bei denen der Primärantikörper durch PBS ersetzt wurde, und Tumorproben, die mit Kaninchen-Normalserum inkubiert wurden. Als Positiv-Kontrolle wurden Schnitte verwendet, in denen eine LASP-1-Färbung von

Myoepithelzellen oder glatten Gefäßmuskelzellen nachweisbar war (siehe auch Abbildung 2). Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, sind vier verschiedene Expressionsstärken von LASP-1 visuell unterscheidbar. Deshalb wurde den jeweiligen LASP-1 Färbeintensitäten ein Punktrangwert, der von mir so genannte LASP-1-Score, beginnend mit 0 für keine visuell nachweisbare LASP-1-Expression, bis hin zu 3 für eine sehr starke LASP-1-Expression, zugeordnet.

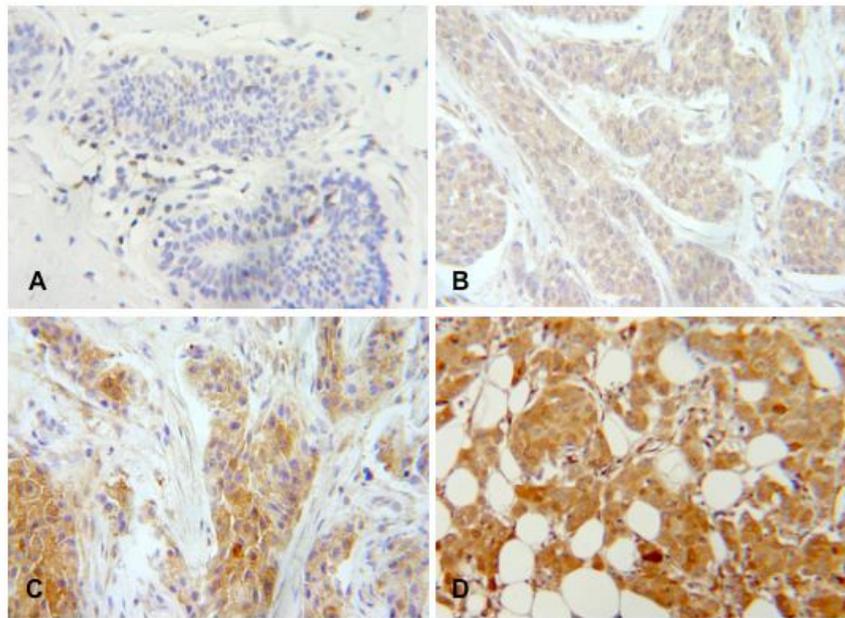


Abbildung 1: Auswahl von vier invasiven ductalen Mammakarzinomen mit unterschiedlichem LASP-1-Score (LS 0 bis 3) als Referenzproben für die Evaluation der LASP-1-Färbeintensität der übrigen Gewebeschnitte. LASP-1 braun, Hämatoxylin Gegenfärbung. Vergrößerung 100x. **A** entspricht LS 0, **B** LS 1, **C** LS 2 und **D** LS 3.

Des Weiteren wurde von allen drei Untersuchern die Anzahl der Zellen in Prozent geschätzt, die ein immunhistochemisches Färbesignal für LASP-1 zeigten. Je nach prozentualer Färbefraktion wurden die Schnitte anschließend mit einem weiteren Punktrangwert semiquantitativ stratifiziert. Waren zwischen 0 und 19 % der Zellen positiv für LASP-1 wurde der Histoschnitt mit 0 klassifiziert; bei 20 - 39% mit 1, bei 40 - 59 % mit 2, bei 60 - 79 % mit 3 und bei 80 % oder mehr LASP-1-positiver Zellen mit 4. Somit wurden jedem Gewebeschnitt sowohl ein Punktrangwert für die Färbeintensität (LASP-1-Score zwischen 0 und 3), als auch ein Punktrangwert für die Fraktion an LASP-1-

positiven Zellen (zwischen 0 und 4) zugeordnet. Im Falle einer retrospektiv festgestellten Uneinigkeit der Befunde der drei Untersucher wurde der entsprechende Gewebeschnitt von allen Untersuchern gemeinsam neu bewertet und ein Konsens gebildet. Nun konnte in Analogie zu den Leitlinien für die Bewertung des bereits sehr gut etablierten Hormonrezeptor-Immunreaktiven-Scores [40], durch Multiplikation der beiden Punktrangwerte ein neuer LASP-1-Immunreaktiver-Score (LASP-1-IRS) errechnet werden, der sowohl Färbeintensität, als auch Anteil der gefärbten Zellen berücksichtigt. Dieser LASP-1-IRS kann von 0 bis maximal 12 variieren, wobei die Werte 5, 7, 10 und 11 rechnerisch nicht möglich sind. Die Höhe des LASP-1-IRS repräsentiert somit die Höhe der LASP-1-Expression.

Des Weiteren wurden zu jeder Gewebeprobe alle relevanten Daten, wie Staging (TNM), Grading, Hormonrezeptorstatus, Alter zum OP-Zeitpunkt und der HER-2/neu Status, aus den entsprechenden pathologischen Befunden bzw. Berichten der Archive der Würzburger Universitäts-Frauenklinik gesucht und in einer Liste dokumentiert (siehe Anhang). Zur besseren statistischen Differenzierung wurden die Gewebeproben anhand des LASP-1-IRS in zwei Gruppen getrennt. Als „cut-off“ wurde der nicht-errechenbare LASP-1-IRS von 5 gewählt, da bei diesem Grenzwert die statistischen Ergebnisse am besten diskriminierbar waren und sich die höchsten Signifikanzwerte ergaben. Die beiden Gruppen wurden dabei als LASP-1-negativ bzw. LASP-1-positiv bezeichnet: „LASP-1-negativ“ bedeutet niedrige LASP-1-Expression (LASP-1-IRS < 5), „LASP-1-positiv“ bedeutet hohe LASP-1-Expression (LASP-1-IRS > 5) (siehe auch Ergebnisteil 3.2).

In einer statistischen Analyse mit Hilfe des Programms Statistika 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) wurde überprüft, ob der LASP-1-IRS und damit die Höhe der LASP-1-Expression mit einem der klinisch-pathologischen Parameter aus der angelegten Liste korreliert.

2.2.4 Zellkulturbedingungen

Die verschiedenen Zelllinien wurden sämtlich von Cell Line Services (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Unter einer mit 5 % CO₂ gesättigten Atmosphäre bei 37°C wurden die Zellen in einer Dichte von 1x10⁵ Zellen/ml in Zellkultur-Flaschen aus Plastik angezüchtet. Die BT20- und MCF7-Zellen, die jeweils aus einem humanen Brustkrebs stammen, wurden in HBCA-Medium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) kultiviert. Für die Anzucht der PTK2-Zellen (*Potorous tridactylis* kidney) wurde das DMEM Medium mit 2 mM Glutamin der Firma Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Die SKOV-3-Zellen wurden mit RPMI 1640 (PAA, Linz, Österreich) ernährt. Jedes Zellmedium enthielt 10 % hitzeinaktiviertes Kälberserum von PAA (Linz, Österreich) und 1 % einer Streptomycin/Ampicillin-Mischung. Die Zellen wurden regelmäßig auf mikrobielle Kontamination geprüft und im Falle einer Verunreinigung entsorgt.

2.2.5 Splitten adhärenter Zellen

Zum Splitten wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 2 ml sterilem PBS gewaschen und mit einem geringen Volumen (1 - 2 ml) Trypsin-EDTA bis zum Ablösen der Zellen bei RT inkubiert. Zu den abgelösten Zellen wurde das doppelte Volumen an Medium zugegeben. Dann wurden die Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 4 min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und je nach Zellmenge eine entsprechende Verdünnung der Zellsuspension in eine Kulturflasche eingespritzt. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen auf sterile Deckgläschen ausgesät.

2.2.6 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Zur Lagerung und Aufbewahrung adhärenter Kulturzellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen abtrypsinisiert (siehe 2.2.5) und in 0.5 ml Medium resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde 0.5 ml Medium bei – 4°C mit 24 % DMSO pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem Kryoröhrchen für 24 h bei – 80°C eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff bis zur Wiederverwendung aufbewahrt. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, direkt in ein Wasserbad (37°C) gelegt und kurz angetaut. Die noch gefrorenen Zellen wurden dann en bloc in eine mit Medium gefüllte Kulturflasche gegeben und in den Brutschrank (37°C) gestellt. Das DMSO und die abgestorbenen Zellen wurden nach dem Anwachsen der Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt.

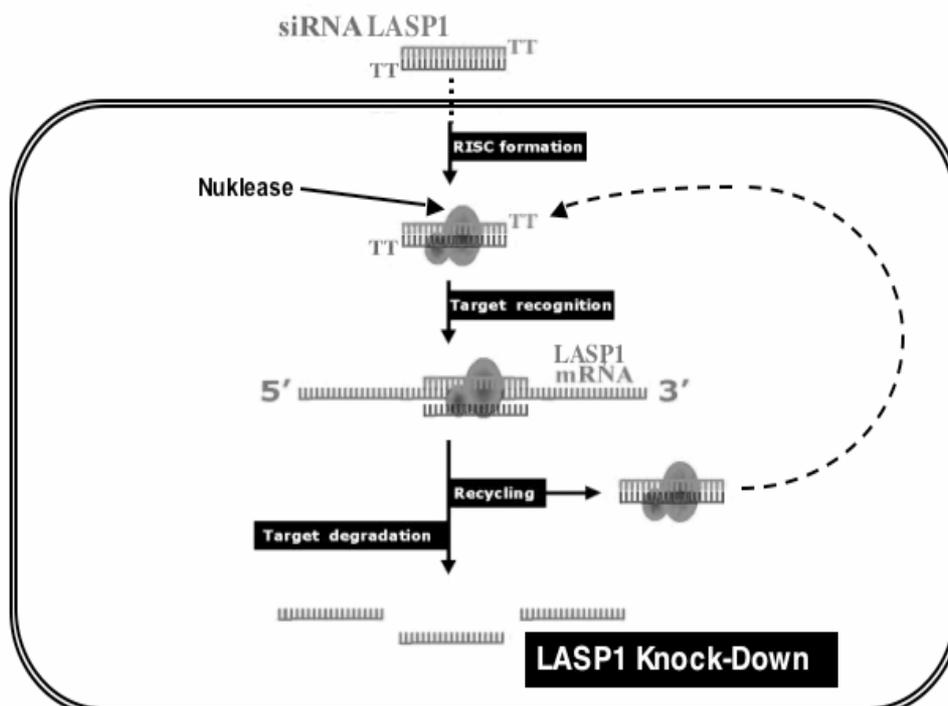
2.2.7 Sequenzen der siRNA Oligonukleotide

Die Proteinexpression von LASP-1 wurde durch siRNA-Duplexe, die gegen die Basensequenz 5'-AAGGTGAACTGTCTGGATAAG-3' der Basen 49 - 69 gerichtet sind, gehemmt. Die Translation der human enabled homolog (Drosophila) mRNA des Proteins ENAH wurde mit der siRNA mit der Basensequenz 5'-CUGUGUAGCUUGAUUGUACdTdT-3' (entspricht den Basen 204 - 224) inhibiert. Um sicher zu stellen, dass keine anderen mRNA-Moleküle, außer den gewünschten, beeinflusst werden, wurde jeweils eine Gegenkontrolle mit Hilfe der BLAST Datenbank im Internet für humane mRNA durchgeführt, welche die Spezifität der verwendeten siRNA Oligonukleotide bestätigte. Als Kontroll-siRNA wurden scrambled Neuropilin1 (sNP1) Oligonukleotide der Sequenz 5'-AGAGAUGUAGUCGCUCGCUdTdT-3' verwendet, die für keine bisher bekannte mRNA spezifisch sind, und deshalb nicht zur Herunterregulation irgendeines Proteins führen. Alle siRNA Moleküle wurden von der Firma Dharmacon RNA Technologies (Lafayette, CO, USA) bezogen. Die gewerblich erhältliche siControl Non-Targeting siRNA von Dharmacon

konnte aufgrund toxischer Effekte nicht für Versuche mit den unter 2.2.4 genannten Zelltypen benutzt werden.

2.2.8 Aufbereitung der siRNA und Transfektion der Zellen mit siRNA

RNA-Interferenz ist eine wirkungsvolle Methode um die Proteinexpression eines gewünschten Proteins durch posttranscriptionelle Hemmung der Translation zu unterbrechen (siehe auch nachfolgende Grafik). Nach Transfektion der Zellen mit den doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotiden, den so genannten small interfering RNAs (siRNAs), werden diese von einer sich bereits in der Zelle befindlichen Nuklease gebunden. Diese Formation aus siRNA und Nuklease wird RISC genannt, was für „RNA induced silencing complex“ steht. Die Nuklease entwindet daraufhin den siRNA-Doppelstrang zu einem Einzelstrang, der nun wiederum mit der mRNA, gegen die er sequenzspezifisch gerichtet ist, hybridisiert. So wird die Nuklease zu der mRNA geführt, die dann von ihr enzymatisch zerstört wird.



Dadurch kann das gewünschte Protein, z. B. LASP-1, von der Zelle nicht mehr nachproduziert werden, und je nach Halbwertszeit der bereits bestehenden Proteinmenge verarmt die Zelle mehr oder weniger schnell an dem herunterregulierten Protein. Diese Methode der sequenzspezifischen Inhibition der Translation wird auch als „knock-down“ oder „silencing“ bezeichnet.

Man geht bisher davon aus, dass RNA-Interferenz ein natürlicher Schutzmechanismus der Zellen zur Abwehr von Doppelstrang-RNA-Viren ist, der heute experimentell genutzt werden kann [41].

Für die Transfektion der Zellen in dieser Arbeit wurden Zellen (nicht älter als Passage 8) in der exponentiellen Wachstumsphase in six-well-Platten mit einer Zelldichte von 0.5×10^5 Zellen/well ausplattiert und 24 h bei normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 30 - 50 % Konfluenz mit 1 μg siRNA in reduced serum medium OPTI-MEM-I der Firma Gibco (Paisley, Schottland, UK) nach Protokollanweisungen des Herstellers transfiziert. Für die Bildung der siRNA-Lipid-Komplexe wurden 3 μl der siRNA Stocklösung (20 μM) mit 100 μl OPTI-MEM-I verdünnt, dann mit 3 μl Metafectene der Firma Biontex (München, Deutschland), ebenfalls verdünnt mit 100 μl OPTI-MEM-I, versetzt, und anschließend 17 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Zellmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und durch 1 ml OPTI-MEM-I ersetzt. Nach den 17 min Inkubationszeit wurden noch die siRNA-Lipid-Komplexe (206 μl) hinzugefügt (Gesamtvolumen dann 1206 μl).

Nach 4 h Inkubationszeit bei 37°C wurden zur Beendigung der Transfektion die 1206 μl abgesaugt und durch das zellspezifische Vollmedium mit 20 % fetalem Kälberserum ersetzt und die Zellen für weitere 36 - 54 h inkubiert. Für die Kontrollversuche wurde nur Metafectene oder 1 μg scrambled NP1 Oligonukleotide in Metafectene benutzt.

Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuche pro Experiment durchgeführt, von welchen die repräsentativen Ergebnisse in dieser Arbeit dargestellt sind.

2.2.9 Überexpression von LASP-1 in BT20- und PTK2-Zellen

Analog der Transfektion mit siRNA wurde auch die Transfektion zur Überexpression von LASP-1 durchgeführt. Die Plasmide mit dem humanen Wildtyp LASP-1 Gen stellte mir Herr Dr. med. Christian Keicher (Universität Würzburg) freundlicherweise zur Verfügung [20].

Zellen (nicht älter als Passage 8) in der exponentiellen Wachstumsphase wurden in six-well-Platten mit einer Zelldichte von 0.5×10^5 Zellen/well ausplattiert und 24 h unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 30 - 50 % Konfluenz mit 1 µg humanem Wildtyp LASP-1 Gen (hwtLASP-1), geklont in den Vektor pcDNA₃, in reduced serum medium OPTI-MEM-I nach Protokollanweisungen des Herstellers transfiziert. Für die Bildung der Plasmid-Lipid-Komplexe wurden 3 µl der hwtLASP-1 Stocklösung (20 µM) mit 100 µl OPTI-MEM-I verdünnt, dann mit 3 µl Metafectene, ebenfalls verdünnt mit 100 µl OPTI-MEM-I, versetzt, und anschließend 17 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Zellmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und durch 1 ml OPTI-MEM-I ersetzt. Nach den 17 min Inkubationszeit wurden noch die Plasmid-Lipid-Komplexe (206 µl) hinzugefügt (Gesamtvolumen nun 1206 µl). Nach 4 h Inkubationszeit bei 37°C wurden zur Beendigung der Transfektion die 1206 µl abgesaugt und durch das zellspezifische Vollmedium mit 20 % fetalem Kälberserum ersetzt und die Zellen für weitere 36 - 54 h inkubiert. Es wurden ebenfalls drei unabhängige Versuche für dieses Experiment durchgeführt, von welchen ein repräsentatives Ergebnis in dieser Arbeit dargestellt wird.

2.2.10 Proteinbestimmung mit dem BCA-Test

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde stets der BCA-Test durchgeführt: dazu wurden in eine 96-well Platte mit Deckel dreifach je 10 µl pro well Bovine Serum Albumin (BSA) als Standard zur Erstellung der Eichgeraden mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0.1 – 1.0 mg/ml)

pipettiert. Daneben wurden ebenfalls dreifach je 10 µl pro well Puffer sowie die zu messende Proteinprobe (in unterschiedlichen Verdünnungen) in die Vertiefungen der Platte überführt.

10 ml Pierce Lösung 1 wurde dann mit 200 µl Pierce Lösung 2 gemischt und jeweils 200 µl der Mischung zu jedem well zugegeben. Nach 30 min Inkubation im Dunkeln bei 37°C wurden im ELISA-Reader bei 595 nm die Absorption und damit anhand der Eichgeraden die Proteinkonzentration ausgewertet.

2.2.11 Denaturierende Gelelektrophorese (nach Laemmli 1970 [42])

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurden 9 × 15 cm Gele mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Die Gele bestanden aus einem 7 - 12 % Acrylamid Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel.

10 % Trenngel:

Trenngelpuffer	2.5 ml
Acrylamidlösung	6.6 ml
SDS 10 %	0.2 ml
dH ₂ O	10.6 ml
Temed	10 µl
APS 10 %	0.2 ml

Sammelgel:

Sammelgelpuffer	0.65 ml
Acrylamidlösung	0.7 ml
SDS 10 %	50 µl
dH ₂ O	3.6 ml
Temed	10 µl
APS 10 %	0.2 ml

Niedrig- bzw. höherprozentige Trenngele enthielten entsprechend weniger bzw. mehr Acrylamid und angepaßte Wassermengen.

Trenngelpuffer: 3 M Tris/HCl pH 8.9

Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris/HCl pH 6.7

APS 10 %: 10 % Ammonium-Persulfat (w/v) in dH₂O

SDS 10 %: 10 % Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) (w/v) in dH₂O

Die Proben wurden durch Zugabe von SDS-Stop-Solution (siehe unten) und durch kurzes Aufkochen (5 min bei 95°C) denaturiert. Nach Auftragen der

Proben und Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes wurden die denaturierten Proteine zunächst im Sammelgel konzentriert und danach im Trenngel entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Bis die blaue Farbfront der SDS-Stop-Solution das Trenngel erreicht hatte, wurde eine Spannung von 70 V angelegt, danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese wurde mit dem Erreichen des Gelendes der blauen Farbfront beendet.

SDS-Stop-Solution:

200 mM Tris/HCl pH 6.7
6 % (w/v) SDS
15 % (w/v) Glycerin
10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
30 μ g/ml Bromphenolblau; ad dH₂O

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris pH 8.9
0.1 % (w/v) SDS
192 mM Glycin

2.2.12 Western-blot (nach Towbin et al. 1979 [43])

2.2.12.1 Transfer auf die Nitrocellulosemembran

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nun vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde die Nitrocellulose luftblasenfrei auf das beladene Polyacrylamidgel gepresst und beide Schichten dann zusammen zwischen Blottingpapiere, die in Transferpuffer vorgequollen wurden, gelegt. Dieses Schichtwerk wurde wiederum zwischen zwei Kunststoffvliese in einem Plastikgitter gepresst. Das Kunststoffgitter mit den enthaltenen Schichten wurde dann in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gesetzt, wobei die Nitrocellulosemembran zum Positivpol zeigte. Der Transfer erfolgte für 45 - 60 min bei 2 A im Kühlraum (4°C), da sich durch das Anlegen eines elektrischen Spannungsfeldes der Transferpuffer auf über 40°C erhitzen kann und zur vollständigen Zerstörung der Proteine führen könnte, falls der Transfer bei RT stattfinden würde.

Transferpuffer:

Tris 15.0 g

Glycin 72.0 g

Methanol 1 l; ad 5 l dH₂O

pH 10.0 wurde durch Zugabe von ca. 23.0 g NaOH Tabletten eingestellt.

2.2.12.2 Proteinfärbung auf der Nitrocellulosemembran

Die Nitrocellulosemembran wurde zur Evaluation der Transfereffizienz mit Ponceau-S (0.1 % (w/v) in 5 % (v/v) Essigsäure) kurz angefärbt und der Hintergrund durch Schwenken in dH₂O entfärbt. Zur Dokumentation wurde das Bandenmuster auf der Nitrocellulosemembran fotokopiert und anschließend wieder mit TBS entfärbt.

10×TBS: (Tris buffered saline)

Tris 24.2 g

NaCl 17.3 g; ad 2 l H₂O und pH 7.5 einstellen.

2.2.12.3 Detektion spezifischer Proteine mit Antikörpern

Nach dem Transfer auf die Nitrocellulose wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blockmedium für 1 h bei RT abgesättigt. Im Anschluss daran wurde die geblockte Membran mit dem in TBS/T/Milk verdünnten Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Nitrocellulose dreimal mit TBS/T für jeweils 5 min gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Erstantikörpers erfolgte durch einen Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper und nachfolgende Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran mit dem in TBS/T/Milk verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert, anschließend dreimal je 5 - 10 min mit TBS/T gewaschen und dann für 1 min

mit ECL-Detektionsmix bedeckt. Nach Abtropfen der Detektionslösung wurde die Nitrocellulosemembran zwischen zwei Plastikfolien gelegt, glatt gestrichen und sofort für einige Sekunden bis zu mehreren Minuten auf einem ECL-Film exponiert.

<u>Blockmedium:</u>	3 % (w/v) Milchpulver in TBS	= 1.5 g; ad 50.0 ml TBS
<u>TBS/T:</u>	Tween in TBS	= 3.0 ml; ad 1.0 l TBS
<u>TBS/T/Milk:</u>	3 % (w/v) Milchpulver in TBS/T	= 1.5 g; ad 50.0 ml TBS/T
<u>ECL-Detektionsmix:</u>	50 % (v/v) ECL-Reagenz 1 50 % (v/v) ECL-Reagenz 2	

Die Proteinbanden wurden durch ein Autoradiogramm dargestellt, und die Signalintensität densitometrisch mit dem Odyssey System von Li-Cor (Bad Homburg, Deutschland) quantifiziert. Da die Herunterregulation des Proteins LASP-1 stets in Gegenkontrolle zu einer β -Actin-Ladekontrolle stattfand und beide Proteine ein ähnliches Molekulargewicht von 38 kDa (LASP-1) und 40 kDa (β -Actin) besitzen, war nach der Darstellung des Proteins LASP-1 ein Strippen der Nitrocellulosemembran, d. h. ein Ablösen beider Antikörper, die für die LASP-1-Darstellung benutzt worden waren, und eine erneute Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern notwendig. Zum Entfernen der Antikörper wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in 2 - 4 ml eines Strippingpuffers (siehe unten) bei 60°C inkubiert und dann ca. 30 sec mit PBS/TT gewaschen, bis der stechende Geruch des β -Mercaptoethanols des Strippingpuffers olfaktorisch nicht mehr nachweisbar war. Anschließend konnte die Nitrocellulosemembran erneut mit TBS/T/Milk geblockt werden und mit einem Anti- β -Actin-Antikörper inkubiert werden.

Strippingpuffer:

62.5 mM Tris pH 6.8

100 mM β -Mercaptoethanol

2 % SDS

2.2.13 Zählung der Zellen und Proliferationsassay

Zur Quantifizierung der Zellzahl und Untersuchung der Proliferationsrate wurden jeweils 50.000 Zellen in 9 cm² wells einer six-well-Platte ausgesät und am Folgetag, wie unter 2.2.8 beschrieben, entweder mit der siRNA gegen LASP-1 oder der Kontroll-siRNA (scrambled NP1) transfiziert. Zu definierten Zeitpunkten (0 h bis maximal 54 h) nach der Transfektion wurden die Zellen nach Absaugen und Verwerfen des Nährmediums mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst, in ein steriles 15 ml Plastikröhrchen überführt und mit 8 ml Nährmedium versetzt (Gesamtvolumen nun 10 ml). Anschließend wurden je 50 µl daraus entnommen und in einen sterilen Messbecher mit 10 ml isotonischer Kochsalzlösung pipettiert. Dieser wurde in die dafür vorgesehene Öffnung des Coulter counter (Beckman, Fullerton, CA, USA) gestellt und die vollautomatische Messung gestartet. Gezählt wurden zelluläre Partikel mit einem Durchmesser von mindestens 4 bis maximal 23 µm. Jede Messung wurde zu allen angegebenen Zeitpunkten als Triplikat durchgeführt.

2.2.14 Viabilitätsmessung mit Trypan-Blau

44 - 48 h nach Transfektion der Zellen wurden an den jeweiligen Zeitpunkten die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst und, wie oben beschrieben, die Zellzahl mit einem Coulter counter gemessen. Um die Viabilität der Zellen, d. h. die Integrität der Plasmamembran, zu bestimmen, wurden jeweils 2 µl Zellsuspension aus der 10 ml Gesamtlösung noch vor der eigentlichen Zellzählung entnommen und jeweils mit 2 µl Trypan-Blau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versetzt. Die nun bläuliche Lösung (4 µl) wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Anteile der Trypan-Blau-positiven und -negativen Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop von Zeiss (Jena, Deutschland) ausgezählt. Trypan-Blau färbt nur nekrotische Zellen, deren Zellmembran bereits durch Noxen für den Farbstoff permeabel ist. So konnte der Anteil an nekrotischen Zellen nach den Transfektionen bestimmt werden.

2.2.15 Ausschluss von Apoptose und Caspase-3-Standard

Zum Ausschluss von apoptotischen Prozessen, die eventuell durch eine Transfektion mit siRNA ausgelöst werden können, wurden parallel zu den LASP-1 Western-blots auch Western-blots mit einem Anti-Caspase-3-Antikörper (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt, der sowohl die nicht aktive Pro-Caspase-3, als auch die aktive Caspase-3 erkennt. Caspase-3 ist ein Schlüsselenzym, das bei Apoptose bereits früh aktiviert wird und für lange Zeit nach Beginn der Apoptose detektierbar ist [44, 45].

Zur Überprüfung der Funktionstüchtigkeit des Antikörpers wurden als Kontrolle immer auch 10 µg eines Caspase-3-Standards auf das Polyacrylamidgel geladen (siehe Abbildung 4 unter Ergebnisse 3.3), der mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. J. Becker der Universitäts-Hautklinik Würzburg zur Verfügung gestellt wurde. Bei diesem Standard handelt es sich um Fibroblasten, in welchen durch vierstündige Behandlung mit Staurosporin künstlich apoptotische Prozesse ausgelöst wurden und die anschließend in serumfreiem Zellmedium mit 10 % DMSO bei – 80°C eingefroren wurden.

2.2.16 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse

Für die Analyse der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen 44 - 48 h nach erfolgreicher siRNA-Transfektion mit Trypsin-EDTA abgelöst, in 10 ml Plastikreaktionsgefäße überführt und mit 100 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen für den Transport ins Institut für Humangenetik im Biozentrum Am Hubland der Universität Würzburg in 2 ml Vollmedium mit 10 % DMSO bei – 20°C eingefroren. Zur Analyse des Zellzyklus wurde mir freundlicherweise das Durchflusszytometer der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Detlev Schindler (Institut für Humangenetik der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

In den Laboren des Instituts für Humangenetik wurden die Zellen bei RT aufgetaut und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden

die Zellen mit DAPI der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 2 g/ml in Permeabilisierungspuffer für 30 min bei 4°C resuspendiert und gleichzeitig gefärbt. DAPI bindet dabei immer in konstantem Verhältnis an DNA. Dadurch wird die Differenzierung von diploiden Zellen in der G1-Phase und tetraploiden Zellen in der G2-Phase anhand der Signalintensität des fluoreszierenden DAPI, die direkt proportional zu der DNA-Menge ist, möglich. Für weitere technische Details siehe auch Bechtold et al. [46].

Permeabilisierungspuffer:

0.1 M Tris-HCl

0.154 M NaCl

0.5 mM MgCl₂

1 mM CaCl₂

0.1 % NP-40

0.2 % Rinderserumalbumin gelöst in dH₂O bei pH 7.4

Unter Verwendung des analytischen Dual-Laser Durchflusszytometers LSR1 der Firma BectonDickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland), wurden durch UV-Exzitation bivariate Durchflusshistogramme erstellt. Quantifiziert wurden die Ergebnisse der Zellzyklusverteilung mit der MPLUS AV Software von Phoenix Flow Systems (San Diego, CA, USA).

2.2.17 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und 48 h nach erfolgreicher Transfektion mit siRNA gegen LASP-1 in 4 %iger (w/v) Paraformaldehyd/PBS-Lösung auf Eis fixiert, fünfmal mit PBS gründlich gewaschen, 10 min mit 50 mM NH₄Cl blockiert, einmal mit PBS gewaschen, 10 min mit 0.1 % Triton/PBS permeabilisiert und 30 min mit 10 % goat-serum in 0.1 % Triton/PBS geblockt. Anschließend wurden die so präparierten Zellen für die Darstellung des Proteins LASP-1 mit einem

affinitätsgereinigten Anti-LASP-1 Antikörper in der Verdünnung 1:2000 für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach gründlicher Reinigung der Zellen mit PBS wurde als Zweitantikörper für LASP-1 ein Cy3-markierter goat-anti-rabbit IgA-Antikörper von Dianova (Hamburg, Deutschland) verwendet und die Zellen damit im Dunkeln für 30 min bei RT inkubiert. Für die Darstellung des Proteins Zyxin wurde als Primärantikörper muriner Zyxin Hybridoma Überstand, mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. J. Wehland vom GBF Braunschweig [47], in der Verdünnung 1:10 eingesetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Reinigung der Zellen mit PBS wurden die Zellen dann mit FITC-markierten goat-anti-mouse IgA-Antikörpern der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) in der Verdünnung 1:2000 für weitere 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Bei der Actin-Färbung mit Oregon green Phalloidin von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) ist der Farbstoff in Methanol gelöst und musste deshalb vor der Verdünnung in 10 % goat-serum in 0.1 % Triton/PBS 5 min durch Zentrifugation im Vakuum vom Methanol befreit werden. Ein Zweitantikörper ist bei der Actin-Färbung mit Oregon green Phalloidin nicht nötig.

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten, sowie nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper, wurden die Zellen jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Deckgläschen mit den adhärenen Zellen auf der Oberseite kurz mit dH₂O gewaschen, das Wasser dann an einem Papier abgetupft und in einen Tropfen Mowiol-Lösung, der bereits vorher auf den Objektträger aufgebracht wurde, mit der Oberseite nach unten zeigend (upside down) eingebettet. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden in 10 % goat-serum in 0.1 % Triton/PBS verdünnt. Die Verdünnungen sind unter 2.1.5 angegeben.

4 % PFA: 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS

0.1 % Triton/PBS: 0.1 % (v/v) Triton X 100 in PBS

Mowiol-Lösung: Mowiol 4-88; 50 % Glycerol; 0.2 M Tris pH 8.5; 2.5 % DABCO

2.2.18 Migrationsassay

Die Zellen wurden, nach Kultur im jeweiligen Vollmedium in 25 cm² Zellkulturflaschen, bei einer Konfluenz von 30 - 40 % mit entweder 2.5 µg siRNA gegen LASP-1, oder 2.5 µg Wildtyp LASP-1 Gen in pcDNA₃-Plasmiden, mit jeweils 10 µl Metafectene transfiziert. Nach 48 h Inkubationszeit unter Nährstoffentzug in FCS-armem Medium (nur 1 % FCS) wurden 1x10⁵ Zellen pro 100 µl Inkubationsmedium (mit 1 mM MgCl₂) in die obere Kammer einer BSA-beschichteten transwell-chamber mit 8 µm Porengröße der Firma Corning Star (Cambridge, MA, USA) ausplattiert. Innerhalb von 4 h konnten so die Zellen bei 37°C durch die Poren der Membran migrieren. Anschließend wurden die verbleibenden, nicht gewanderten Zellen auf der Oberseite der Membran vollständig mit einem Wattestäbchen entfernt.

Die Unterseite der Membran mit den migrierten Zellen wurde dann mit einer 1 %igen (w/v) Kristallviolettlösung in 2 % Ethanol für 30 sec gefärbt und danach mit dH₂O gewaschen. Zellgebundenes Kristallviolett wurde nun durch 20minütige Inkubation in 10 %iger Essigsäure extrahiert. Die Farbintensität der nun bläulichen Essigsäurelösung ist dabei direkt proportional zum Anteil der zuvor gewanderten Zellen. Durch Bestimmung der Absorption des Lichtes bei 595 nm im ELISA-Reader, die wiederum indirekt proportional zum Anteil der migrierten Zellen ist, erhält man im Vergleich zur Kontrollgruppe (z. B. nicht transfizierte Zellen) den relativen Anteil der migrierten Zellen, der in Abbildung 10 im Ergebnissteil unter 3.7 in Prozent dargestellt wurde. Als Eichlösung wurde die Absorption von dH₂O verwendet (Absorption ist null, was einer Migration von 0 % entspricht).

2.2.19 Statistische Auswertung der Daten

Für die statistische Analyse und Auswertung sämtlicher Daten, insbesondere der Ergebnisse aus der Patientenstudie, wurde das Programm Statistika 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) benutzt. Mittels des Fisher's exact und des Mann-

Whitney-Tests wurden multivariate, nicht-parametrische Daten untersucht. In der statistischen Analyse wurden die invasiven ductalen Mammakarzinome jeweils in Abhängigkeit vom Nodalstatus (positiv versus negativ) und dem maximalen Tumordurchmesser (T1 versus größer T1) in zwei Gruppen getrennt.

Diese dichotome Einteilung wurde auf der Basis einer großen Metaanalyse vorgenommen, die besagt, dass die zwei wichtigsten Prognoseparameter für Mammakarzinome der Nodalstatus und der maximale Tumordurchmesser zum Diagnosezeitpunkt sind [48]. Eine weitere Stratifikation der Tumorproben wurde deshalb nicht durchgeführt, weil auch bei größerem Tumorquerschnitt oder noch ausgeprägterem Lymphknotenbefall keine weiteren grundsätzlichen therapeutischen Implikationen bestehen [49].

Die von mir erhobenen Daten und die Ergebnisse der statistischen Analyse wurden stets von Frau Priv.-Doz. Dr. hum. biol. Ulrike Kämmerer, Leiterin des Forschungslabors der Würzburger Universitäts-Frauenklinik, validiert.

3. Ergebnisse

3.1 *LASP-1 wird von Ovar- und Mammakarzinomen überexprimiert*

Durch immunhistochemische Färbungen von LASP-1 in humanem Brustdrüsengewebe und humanen Eierstockkarzinomen konnten Einblicke in die Expressionsmuster von LASP-1 gewonnen werden.

Dabei dienten Gewebeproben von benignem Mammagewebe aus Mammareduktionsplastiken, Brustgewebe mit Komponenten ductaler Carcinomata in situ (DCIS), Tumorproben aus invasiv wachsenden ductalen Mammakarzinomen und Lymphknotenmetastasen fortgeschrittener Karzinome, sowie epitheliale Ovarkarzinome als Untersuchungsmaterial.

In den immunhistochemischen Aufnahmen von benignem Mammagewebe ist eine starke Expression von LASP-1 in Myoepithelzellen eindeutig erkennbar, wohingegen eine Expression sowohl in luminalen als auch in azinären Drüsenepithelzellen visuell nicht nachweisbar war (Abbildung 2A).

Im Gegensatz dazu wurde LASP-1 von hyperplastischen Drüsenepithelien mit Komponenten eines DCIS in eindeutig visuell erkennbarem Maße exprimiert (Abbildung 2B). In den meisten Aufnahmen von invasivem Brustkrebs wurde eine stark positive LASP-1-Färbung registriert (Abbildung 2C). Zusätzlich zu den jeweiligen Primärtumoren zeigten auch die dazugehörigen Lymphknotenmetastasen eine starke LASP-1-Überexpression (Abbildung 2D).

Ähnliche Beobachtungen konnten an epithelialen Ovarkarzinomen gemacht werden: In drei von zehn untersuchten Gewebeproben wurde LASP-1 stark (Abbildung 2E) und in zwei anderen mäßig stark exprimiert (Abbildung 2F). In den restlichen fünf Tumorschnitten von Ovarkarzinomen konnte in den Karzinomzellen visuell kein LASP-1 nachgewiesen werden. Interessanterweise waren aber benigne Ovar epithelzellen stets LASP-1-negativ, auch wenn sie sich räumlich in unmittelbarer Nachbarschaft zu LASP-1-positiven, malignen Ovarkarzinomzellen befanden (Abbildung 2G). In Analogie zum Expressionsmuster von LASP-1 in Myoepithelzellen von Mammagewebe,

konnte eine starke LASP-1-Expression auch in glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet werden (Abbildung 2H).

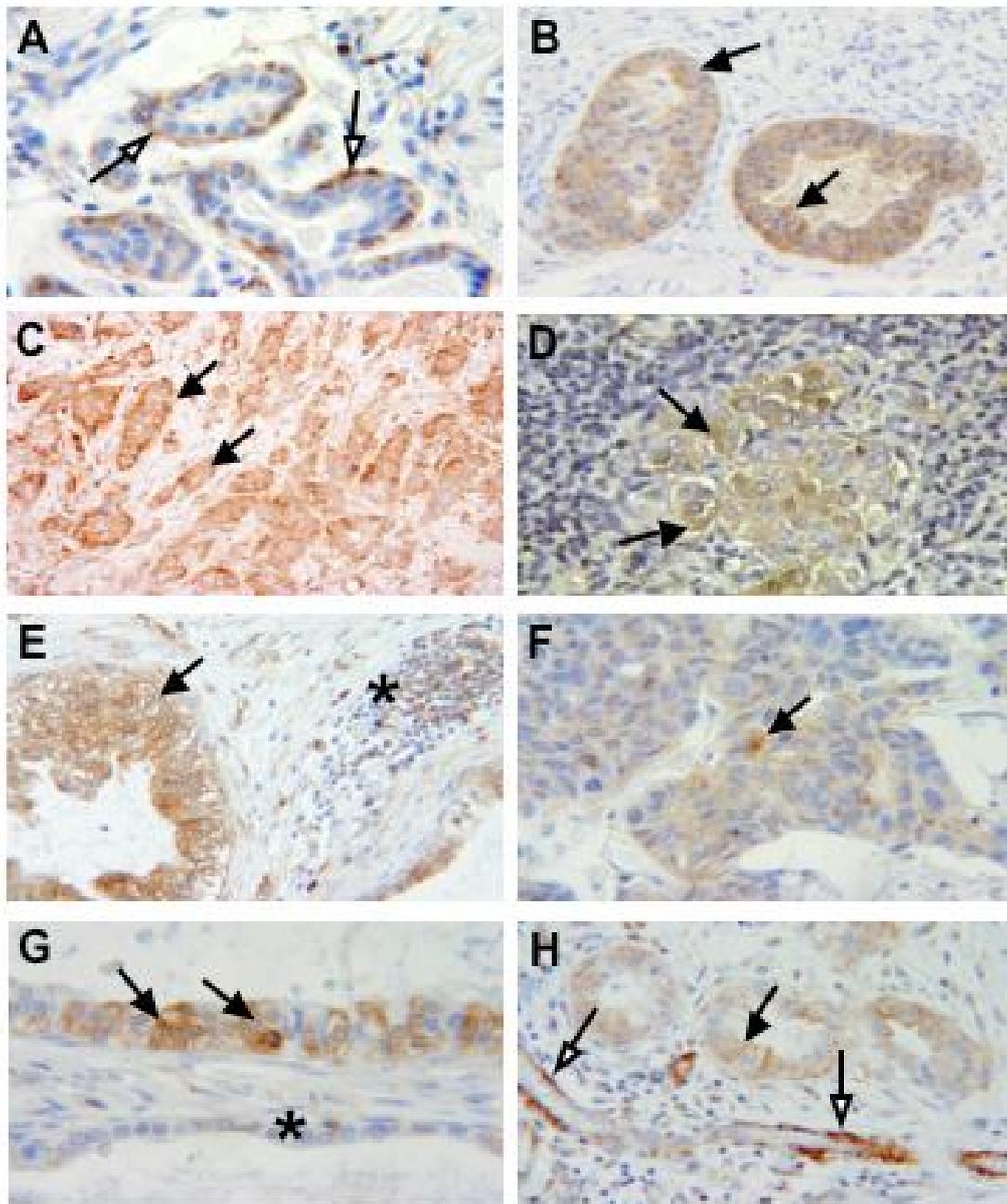


Abbildung 2: Immunhistochemie: LASP-1 (bräunlich). Kontrast: Hämatoxylin (blau). Karzinomzellen schwarzer Pfeil; glatte Muskelzellen weißer Pfeil; Vergrößerungen 250- und 400-fach. **A** benignes Mammagewebe; **B** DCIS; **C** invasives ductales Mammakarzinom; **D** Lymphknotenmetastase eines Mammakarzinoms; **E** Ovarkarzinom mit starker LASP-1-Expression neben lymphozytärem Infiltrat (Stern); **F** epitheliales Ovarkarzinom mit mittelgradiger LASP-1-Expression; **G** Ovarkarzinomzellen mit starker LASP-1-Expression neben benignem, LASP-1-negativem Ovar epithel (Stern); **H** Längsschnitt durch ein Gefäß neben Ovarkarzinomzellen.

3.2 Patientenstudie: LASP-1-Expression korreliert signifikant mit Staging von ductalen Mammakarzinomen

Wie unter 2.2.1 - 2.2.3 im Methodenteil beschrieben, wurden mit Zustimmung der Ethikkommission der Universität Würzburg 83 Gewebeproben von invasiven ductalen Mammakarzinomen (in-Ca), 25 DCIS sowie von 18 Fibroadenomen (Fibro) gesammelt. Die Stärke der LASP-1-Expression wurde dann anhand von immunhistochemisch gefärbten Schnitten der Tumorproben von drei Untersuchern unabhängig voneinander evaluiert und die entsprechenden LASP-1-IRS zugeordnet. Anschließend wurde die Höhe der LASP-1-Expression mit den Parametern, Alter zum OP-Zeitpunkt, Staging, Grading, Hormonrezeptorstatus und HER-2/neu-Status korreliert.

Zu diesem Zweck wurden die Gewebeproben in zwei Gruppen getrennt: „LASP-1-negativ“ mit niedriger LASP-1-Expression, also LASP-1-IRS kleiner 5; „LASP-1-positiv“ mit starker LASP-1-Expression, d. h. LASP-1-IRS größer 5. Beispiele unterschiedlicher Färbeintensitäten (LASP-1-Score null bis drei), die visuell differenzierbar sind, sind in Abbildung 1 im Methodenteil unter 2.2.3.2 dargestellt.

Zu beachten ist, dass im Gegensatz zu den invasiven Karzinomen weder unter den Fibroadenomen, noch unter den DCIS Präparate mit sehr hoher LASP-1-Expression (z. B. LASP-1-IRS 12) beobachtet wurden. Der höchste LASP-1-IRS war in beiden Populationen maximal 8, was durch die Einteilung der Tumore in LASP-1-positiv, bzw. -negativ, nicht mehr ersichtlich ist.

Im Folgenden sind tabellarisch die Ergebnisse, gerundet auf eine oder zwei Dezimalstellen hinter dem Komma, angegeben:

Tumor	LASP-1 +		LASP-1 –		IRS	IRS	IRS
	n	%	n	%	Mittelwert	STDEV	Median
Fibro n=18	4	22.2	14	77.8	3.11	2.22	3
DCIS n=25	8	32.0	17	68.0	3.48	2.80	3
in-Ca n=83	46	55.4	37	44.6	5.75	3.73	8

Verteilung der LASP-1-Positivität, arithmetisches Mittel des LASP-1-IRS mit Standardabweichung (STDEV) und Median in den entsprechenden Tumorentitäten.

Wie die voran gehende Tabelle zeigt, nimmt der Anteil an Tumoren, die LASP-1-positiv sind und damit LASP-1 stark exprimieren, mit zunehmender Malignität der Tumore von 22.2 (Fibro) auf 55.4 % (in-Ca) deutlich zu (siehe auch Abbildungen 3A und 3B).

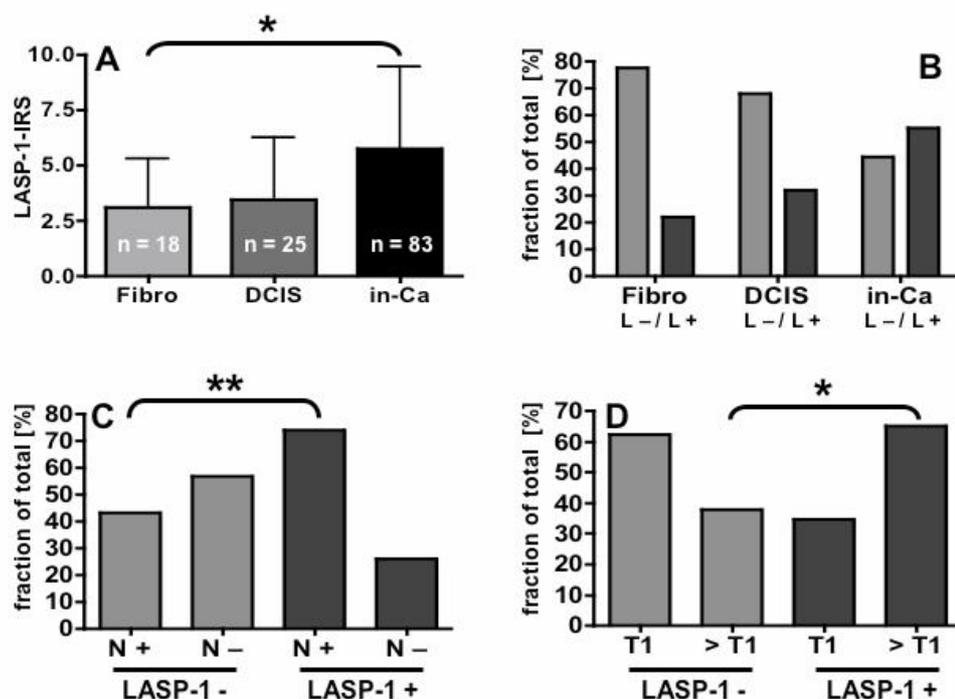


Abbildung 3: Verteilung der LASP-1-Expression und Korrelation mit Stagingparametern. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$ bzw. $p < 0.01$) sind durch Klammern und Sterne gekennzeichnet. **A** arithmetisches Mittel des LASP-1-IRS in den jeweiligen Tumorentitäten mit Standardabweichung (Fehlerbalken). **B** Anzahl der Patientinnen in Prozent (fraction of total) mit einem LASP-1-negativen (L-) bzw. LASP-1-positiven (L+) Tumor. **C** Anzahl der Patientinnen mit invasivem ductalem Mammakarzinom in Prozent, die zum OP-Zeitpunkt Nodal-positiv (N+) bzw. Nodal-negativ (N-) waren, aufgeteilt nach LASP-1-Positivität. **D** Anzahl der Patientinnen mit invasivem ductalem Mammakarzinom in Prozent, die zum OP-Zeitpunkt einen Tumor mit dem Staging T1 bzw. größer T1 hatten, aufgeteilt in LASP-1-negativ und LASP-1-positiv.

Ferner ist ersichtlich, dass innerhalb der invasiven Mammakarzinome circa je die Hälfte der Proben LASP-1-negativ (44.6 %) bzw. LASP-1-positiv (55.4 %) sind (Abbildung 3B). Eine statistische Analyse der Daten aus obenstehender Tabelle mittels eines Fisher's exact Tests ergab, dass invasive Mammakarzinome signifikant ($p < 0.05$) mehr LASP-1 exprimieren als Fibroadenome. DCIS exprimieren hingegen nicht signifikant mehr LASP-1 als

Fibroadenome, aber auch nicht signifikant weniger LASP-1 als invasive Mammakarzinome (siehe auch nachfolgende Tabelle und Abbildung 3A).

Variation des LASP-1-IRS	Signifikanzniveau ($p < 0.05$)	
Fibro versus in-Ca	0.0176	signifikant
DCIS versus Fibro	0.7315	nicht signifikant
DCIS versus in-Ca	0.0667	nicht signifikant

Korrelation verschiedener Parameter mit der LASP-1-Expression:

Durchschnittsalter

LASP-1 Status	Fibro DA	Fibro STDEV	DCIS DA	DCIS STDEV	in-Ca DA	in-Ca STDEV
negativ	40.0	16.1	54.5	13.7	55.1	11.9
positiv	40.8	8.9	54.1	11.6	61.1	13.7

Arithmetisch gemitteltetes Durchschnittsalter (DA) zum OP-Zeitpunkt in Jahren, angegeben mit Standardabweichung (STDEV) in Jahren im Vergleich zum LASP-1-Status in den jeweiligen Tumorentitäten.

Die obenstehende Tabelle verdeutlicht, dass es innerhalb der jeweiligen Tumorentität keine wesentlichen Unterschiede des Durchschnittsalters zum OP-Zeitpunkt in Abhängigkeit von der Höhe der LASP-1-Expression gibt.

Nodalstatus

LASP-1 Status	Nodal + absolut	Nodal + in %	Nodal – absolut	Nodal – in %
negativ	16	43.2	21	56.8
positiv	34	73.9	12	26.1

Stagingparameter Nodalstatus, unterteilt in Nodal-positiv, verbunden mit schlechterer Gesamtprognose, und Nodal-negativ, verglichen mit dem LASP-1-Status in invasiven ductalen Mammakarzinomen.

Unter Anwendung des Fisher's exact Tests ergibt sich folgende Irrtumswahrscheinlichkeit: $p = 0.0066$. Das bedeutet, dass die Nodalpositivität signifikant mit dem LASP-1-Status positiv korreliert ($p < 0.01$), was in Abbildung 3C graphisch dargestellt ist.

Aufgrund der signifikant erhöhten Anzahl an Nodal-positiven Tumoren bei vermehrter LASP-1-Expression ist eine prognostische Verwendbarkeit von LASP-1 als Marker für Nodalpositivität denkbar. Beispielsweise könnte die Höhe der LASP-1-Expression postoperativ am Primärtumor bestimmt werden, um anhand des LASP-1-IRS nach der Operation die Notwendigkeit einer (erweiterten) axillären Lymphadenektomie zu bestimmen. Um diese Hypothese der möglichen Verwendbarkeit des LASP-1-IRS als Marker für bzw. gegen axilläre Lymphadenektomie zu bewerten, wurden mittels einer Vier-Felder-Tafel Sensitivität, Spezifität sowie positiver und negativer Prädiktwert (PW) errechnet (siehe abgebildete Grafik).

	Nodal +	Nodal –	
LASP-1 positiv	34 (=A)	12 (=B)	46 (=A+B)
LASP-1 negativ	16 (=C)	21 (=D)	37 (=C+D)
	40 (=A+C)	33 (=B+D)	83 (=A+B+C+D)

Sensitivität = $A / (A+C) = 0.85$ entspricht 85.0 %

Spezifität = $B / (B+D) = 0.364$ entspricht 36.4 %

positiver PW = $A / (A+B) = 0.739$ entspricht 73.9 %

negativer PW = $D / (C+D) = 0.513$ entspricht 51.3 %

Die Sensitivität eines Markers oder Tests gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit der Test (hier auf LASP-1-Positivität) bei Vorliegen einer Krankheit (hier das Vorliegen von Nodalpositivität) auch wirklich anspricht. Sie entspricht dem Anteil der mittels LASP-1-IRS richtig erkannten Nodal-positiven Tumore (hier 85 %).

Die Spezifität ist ein Maß dafür, wie sicher der Test das tatsächliche Vorliegen der Nodalpositivität anzeigt und nicht etwa falsch positiv ist. Das Maß dafür ist gleich dem Anteil der richtig erkannten Nodal-negativen (hier 36.4 %).

Der positive Prädiktwert zeigt an, welcher Anteil der als LASP-1-positiv diagnostizierten Tumoren tatsächlich Nodal-positiv ist. Er entspricht der Wahrscheinlichkeit Nodal-positiv zu sein, bei Vorliegen einer starken LASP-1-Expression (LASP-1-IRS > 5) (hier 73.9 %, siehe oben).

Der negative Prädiktwert gibt an, welcher Anteil der als LASP-1-negativ bestimmten Tumore tatsächlich Nodal-negativ ist, also die Wahrscheinlichkeit Nodal-negativ zu sein, bei geringer LASP-1-Expression (LASP-1-IRS < 5) (hier 51.3 %).

Tumorgröße

LASP-1 Status	T1 absolut	T1 in %	> T1 absolut	> T1 in %
negativ	23	62.2	14	37.8
positiv	16	34.8	30	65.2

Stagingparameter Tumorgröße, unterteilt in T1, also maximaler Tumorquerschnitt 2 cm, und größer T1, verglichen mit dem LASP-1-Status in invasiven ductalen Mammakarzinomen (Abbildung 3D).

Unter Anwendung des Fisher's exact Tests ergibt sich die Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0.0159$. Daraus folgt, dass die Tumorgröße signifikant mit dem LASP-1-Status korreliert ($p < 0.05$), was Abbildung 3D illustriert. Auf eine Auswertung der Daten in einer Vier-Felder-Tafel wurde hier verzichtet, da es per se nicht sinnvoll erscheint, die Tumorgröße intra- oder postoperativ mit dem LASP-1-IRS zu bestimmen, zumal dazu andere Verfahren, wie präoperative Sonographie und Kernspintomographie oder eine postoperative metrische Auswertung mit einem Lineal bereits ausreichen.

Grading

Nachfolgende Tabelle zeigt, dass die Abnahme des Differenzierungsgrads nicht signifikant mit dem LASP-1-Status korreliert ($p = 0.9593$ Mann-Whitney Test).

LASP-1 Status	G1 absolut	G1 in %	G2 absolut	G2 in %	G3 absolut	G3 in %
negativ	3	8.1	15	40.5	19	51.4
positiv	0	0	24	52.2	22	47.8

Prognoseparameter Grading, unterteilt in G1, also hoher, G2, mäßiger und G3, niedriger Differenzierungsgrad, verglichen mit dem LASP-1-Status in invasiven ductalen Mammakarzinomen.

Hormonrezeptorstatus

Die Tumorproben wurden anhand des immunreaktiven Scores für Hormonrezeptoren (IRS, 0 bis maximal 12) in Hormonrezeptor-positiv und -negativ unterteilt. Leider gibt es für die Bestimmung der Hormonrezeptorpositivität keinen eindeutig festgelegten Grenzwert im IRS, so dass oft eine klinikinterne Regelung getroffen wird. Dieser Umstand konnte auch nicht durch das Expertengremium an der St. Gallen Konsensus-Konferenz 2005 behoben werden [49], so dass sich der Autor in Rücksprache mit Herrn Prof. Dr. med. Matthias Eck (Pathologisches Institut der Universität Würzburg) für den in Deutschland häufig gebrauchten Grenzwert von IRS 3 entschieden hat. Dieser „cut-off“ wurde bereits 1987 von Remmele und Stegner vorgeschlagen [50]. Als Hormonrezeptor-positiv (ÖR + bzw. PR +) gelten also in dieser Dissertation Proben mit einem IRS von 3 oder größer (siehe Anhang).

LASP-1 Status	ÖR + absolut	ÖR + in %	ÖR – absolut	ÖR – in %
negativ	27	73	10	27
positiv	33	71.7	13	28.3

LASP-1 Status	PR + absolut	PR + in %	PR – absolut	PR – in %
negativ	25	67.6	12	32.4
positiv	26	56.5	20	43.5

Verteilung des Hormonrezeptorstatus für Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ÖR / PR) in Abhängigkeit vom LASP-1-Status in invasiven Mammakarzinomen.

Wie aus obenstehenden Tabellen hervorgeht, nimmt der Anteil an Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Proben mit der LASP-1-Positivität leicht ab.

Diese Unterschiede sind aber in statistischen Analysen nicht signifikant ($p = 1.0$ bzw. 0.3673 ; Fisher's exact Test).

HER-2/neu-Status

LASP-1 Status	HER-2/neu + absolut	HER-2/neu + in %	HER-2/neu – absolut	HER-2/neu – in %
negativ	6	16.2	31	83.8
positiv	12	26.1	34	73.9

HER-2/neu-Status im Vergleich zum LASP-1-Status in invasiven Mammakarzinomen.

Die obenstehende Tabelle verdeutlicht, dass es keine signifikante Veränderung des HER-2/neu-Status bei Zunahme der LASP-1-Positivität gibt ($p = 0.3005$; Fisher's exact Test).

3.3 LASP-1-knock-down hemmt die Proliferation

Um den Einfluss von LASP-1 auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde ein knock-down von LASP-1 mittels RNA-Interferenz, wie unter 2.2.8 erklärt, durchgeführt. Die Effizienz des LASP-1-knock-downs wurde durch anschließende Western-blots zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert und die Zellzahl an denselben Zeitpunkten mit einem Coulter counter (Beckman, Fullerton, CA, USA), wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt.

44 - 48 h nach erfolgreicher Transfektion mit siRNA gegen LASP-1 war die gemessene LASP-1 Proteinmenge, verglichen mit der Menge der mit sNP1-Oligonukleotiden transfizierten Kontrollzellen, in den Brustkrebszelllinien BT20 und MCF7 um bis zu 50 % und im Falle der Ovarkarzinomzelllinie SKOV-3 um bis zu 58 % reduziert (Abbildung 4).

Dieses Ergebnis korreliert mit den Immunfluoreszenzaufnahmen, in denen etwa 50 - 60 % der Zellen als erfolgreich transfiziert erkennbar waren. Um grobe Ladungsunterschiede beim Auftragen der Proteinsuspension auf die Gele auszuschließen, wurden die Western-blots standardisiert zur Zellzahl mit einer β -Actin Ladungskontrolle angefertigt. Parallel zu dem 50 - 60 %igen LASP-1-

knock-down wurde im Vergleich mit der Kontrolle eine um ca. 30 - 50 % signifikant geringere Proliferationsrate der mit siRNA-LASP-1 transfizierten Brust- und Eierstockkrebszellen beobachtet (Abbildung 5).

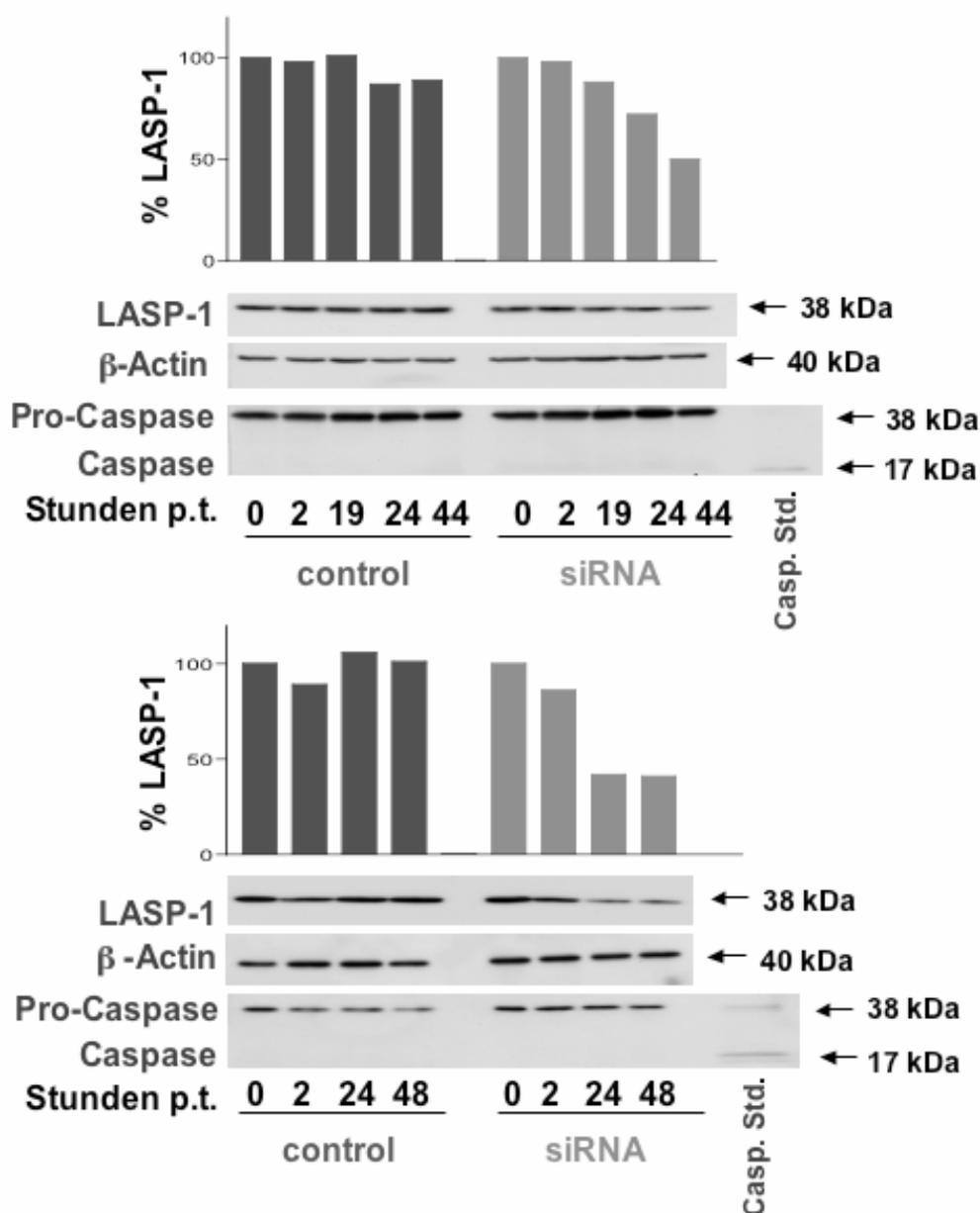


Abbildung 4: LASP-1-knock-down: die LASP-1 Gesamtproteinmenge in BT20-Zellen (oben) und SKOV-3-Zellen (unten) wurde mittels densitometrischer Analysen der Banden der Western-blots zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion (Stunden post transfectionem; p.t.) bestimmt. β -Actin diente dabei als Ladekontrolle. Zum Ausschluss von Apoptose, die eventuell durch Transfektion mit siRNAs ausgelöst werden kann, wurde ein Anti-Caspase-3-Antikörper verwendet, der sowohl die nicht aktive Pro-Caspase-3, als auch die aktive Caspase-3 erkennt (siehe Standard). Zu keinem Zeitpunkt wurde eine aktive Caspase-3 detektiert.

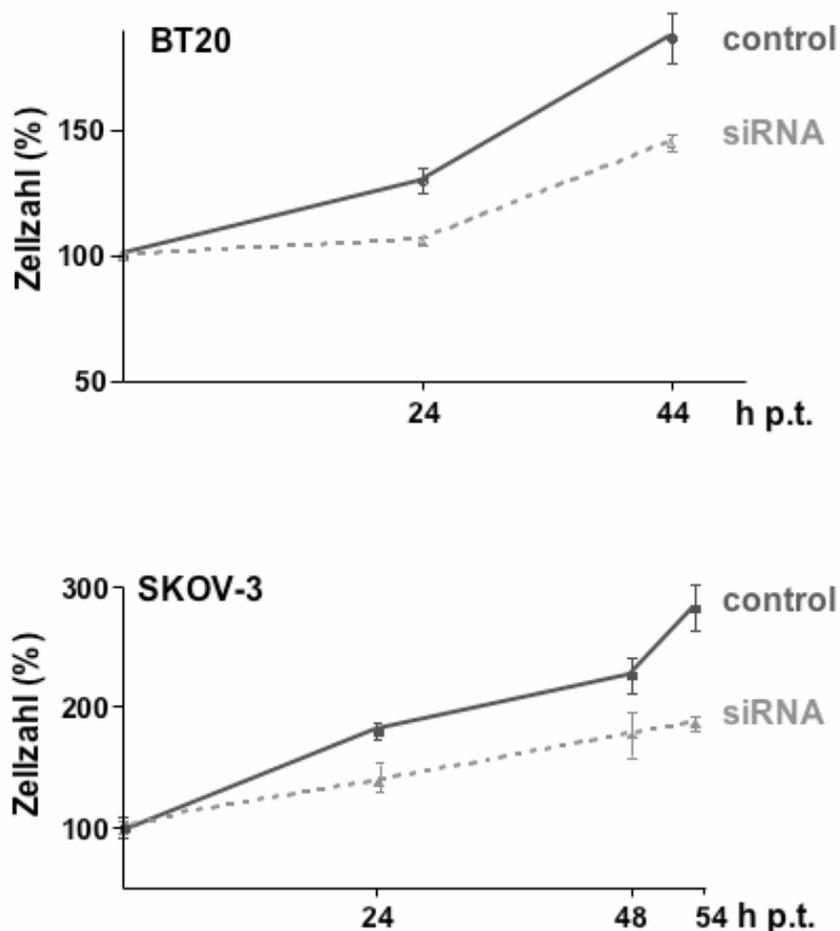


Abbildung 5: Relative Zellzahl in Prozent mit dazugehöriger Standardabweichung (Fehlerbalken) im Vergleich zur Ausgangszellzahl entweder nach Transfektion mit siRNA gegen LASP-1 (siRNA) oder nach Transfektion mit scrambled NP1 siRNA (control). Die Zellen wurden immer als Triplikat mit einem Coulter counter zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion (post transfectionem; p.t.) gezählt. Der LASP-1-knock-down bewirkt sowohl in den BT20-Zellen, als auch in den SKOV-3-Zellen eine deutliche Reduktion der Proliferation um ca. 30 bzw. 50 %.

Zum Ausschluss einer durch die Transfektion gesteigerten Nekroserate wurde stets die Viabilität mit Trypan-Blau-Färbungen überprüft. Die Auswertung zeigte, dass die Nekrosefraktionen der beiden Zellkulturen nicht signifikant divergierten, da nur 0 - 4.2 % aller Zellen, die mit siRNA gegen LASP-1 transfiziert wurden, nekrotisch waren, und sich die Nekroseraten der mit sNP1- oder MOCK-transfizierten (nur Metafectene, ohne siRNA) Kontrollzellen mit 4.5 - 9.8 % im Vergleich zu den mit LASP-1 siRNA transfizierten Zellen nicht signifikant unterscheidet. Somit ist nicht von einem gravierenden toxischen Effekt der Transfektion auszugehen, der für den deutlichen Unterschied in der

Proliferationsrate verantwortlich gemacht werden könnte (siehe auch untenstehende Tabelle).

Zelltyp	Nekroserate nach siRNA LASP-1	Nekroserate nach Kontrolltransfektion
BT20	4.2 % (4 von 96 Zellen)	9.8 % (8 von 81 Zellen)
SKOV-3	0.0 % (0 von 40 Zellen)	4.5 % (2 von 42 Zellen)

Um gleichzeitig apoptotische Veränderungen an den Proliferations-inhibierten Zellen auszuschließen, wurden Western-blots mit Anti-Caspase-3 Antikörpern angefertigt. Der Antikörper bindet sowohl an die nicht-aktive Vorstufe, die Pro-Caspase-3 mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, als auch an die durch limitierte Proteolyse aktivierte Caspase-3 mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, konnte nur die nicht aktive Pro-Caspase-3 über den gesamten Zeitverlauf in beiden Zellpopulationen detektiert werden. Lediglich eine Standardproteinsuspension mit aktiver Caspase-3 wurde bei 17 kDa von dem verwendeten Antikörper gebunden, so dass Apoptose nicht in kausalen Zusammenhang mit der Proliferationshemmung zu bringen ist. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Versuche mit MCF7-Zellen gewonnen (Ergebnisse nicht abgebildet).

3.4 ENAH-knock-down hemmt nicht die Proliferation

Um sicherzustellen, dass der beobachtete antiproliferative Effekt spezifisch für den LASP-1-knock-down ist und nicht auch durch Herunterregulation anderer Proteine in den fokalen Kontakten verursacht werden kann, wurden BT20-Zellen mit siRNA gegen human Drosophila enabled protein (ENAH) transfiziert. ENAH ist ein Protein, das ebenfalls in fokalen Kontakten mit dem wichtigen Bindungspartner von LASP-1, nämlich Zyxin, interagiert und in Zellmigrationsprozesse involviert ist [51]. ENAH ist deshalb ideal als Kontrollprotein geeignet.

Western-blot-Analysen 44 h nach Transfektion mit spezifischer siRNA gegen ENAH ergaben einen fast vollständigen Verlust des ENAH Proteins, jedoch ohne Auswirkung auf das Proliferationsverhalten der Zellen (Abbildung 6), während der parallel angefertigte LASP-1-knock-down in demselben Zelltypus bei gleicher Passage der Zellen zu einer deutlich verringerten Proliferation führte (Abbildungen 5 und 6).

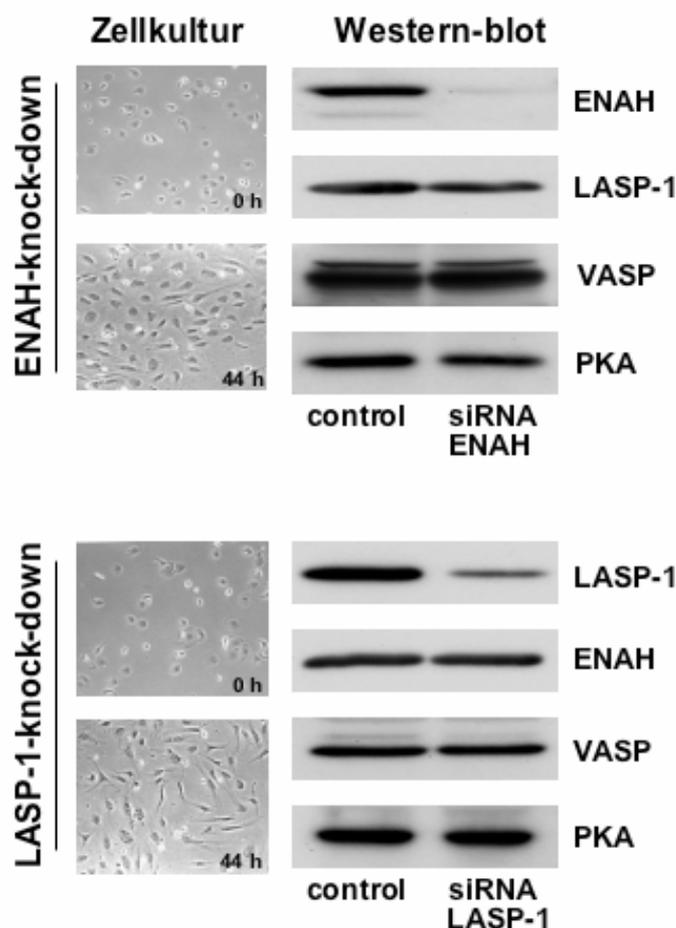


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen über die BT20-Zellkultur 0 - 44 h nach Transfektion mit spezifischen siRNAs. Oben: selektiver ENAH-knock-down beeinflusst weder die Proliferation der Zellen, noch die Expression anderer Proteine in fokalen Kontakten (LASP-1, VASP und PKA). Unten: selektiver LASP-1-knock-down, der die Proliferation der Zellen hemmt, aber ebenfalls nicht die Expression anderer Proteine der fokalen Kontakte beeinflusst (ENAH, VASP und PKA). Die Kontrollen (control) erfolgten durch Transfektion mit sNP1 siRNA.

Um den gemessenen Effekt des LASP-1-knock-downs weiter zu spezifizieren, wurden auch die Höhe der Proteinexpression der LASP-1 Interaktionspartner VASP, Zyxin und β -Actin, die alle an der Bildung der fokalen Kontakte beteiligt

sind, sowie der Proteinkinase A (PKA), welche LASP-1 und ENAH zu phosphorylieren vermag, in Western-blot-Analysen untersucht. Die Auswertungen ergaben keine Veränderungen der Proteinexpression der genannten Proteine durch das silencing von LASP-1 oder ENAH (Abbildungen 4 und 6), so dass auch eine Störung der Proteinexpression dieser Proteine nicht die Hemmung der Proliferation erklären kann.

3.5 LASP-1-knock-down induziert Akkumulation in der G2-Phase

Nach der Messung des Proliferationsverhaltens wurde die Zellzyklusverteilung der mit siRNA gegen LASP-1 behandelten BT20- und SKOV-3-Zellen mittels Durchflusszytometrie, wie im Methodenteil unter 2.2.16 beschrieben, quantifiziert. 44 h nach erfolgreicher Transfektion der BT20-Zellen befanden sich 33.6 % der Zellen mit LASP-1-knock-down in der G2-Phase, wohingegen der Anteil an Zellen in der G2-Phase in der mit sNP1-Oligonukleotiden transfizierten Kontrollpopulation nur 23.3 % betrug. Von den MOCK-transfizierten (nur Metafectene, ohne siRNA) Zellen waren 23.4 % in der G2-Phase, parallel zu den gänzlich unbehandelten Zellen, von denen sich 22.8 % in derselben Zellzyklusphase befanden. Das bedeutet, dass eine Herunterregulation von LASP-1 in den Zellen eine Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase bewirkt. Die Zellfraktionen in der S-Phase waren sowohl in den siRNA-LASP-1 behandelten als auch in den mit sNP1 transfizierten Zellen ähnlich hoch (38 % und 33.5 %) (Abbildung 7).

Eine vergleichbare Akkumulation der Zellen in der G2-Phase wurde auch in SKOV-3-Zellen beobachtet (Abbildung 7): 48 h nach Inkubation mit siRNA gegen LASP-1 erreichte die Zellfraktion der Ovarkarzinomzellen, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befanden 19.4 %, im Vergleich zu den MOCK-transfizierten Kontrollzellen mit 6.7 % in G2. Reziprokerweise sank die G1-Fraktion von 73.4 % auf 48 % in Zellen mit LASP-1-knock-down. Der Anteil der Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit siRNA gegen LASP-1 betrug 32.6

%, ohne Behandlung 19.9 %. Ähnliche Resultate wurden aus drei autonomen Experimenten gewonnen. Repräsentative Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

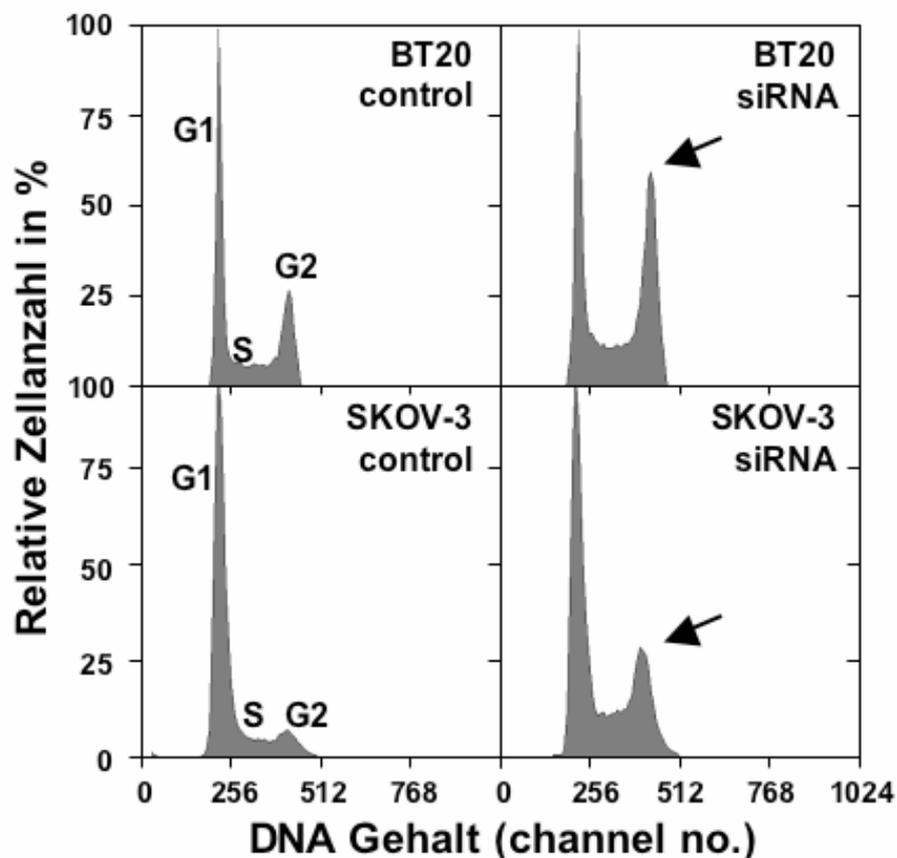


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen von BT20- und SKOV-3-Zellen 44 bzw. 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen LASP-1 (siRNA). Die Zellen zeigen, im Vergleich zu den Kontrollzellen (control), die entweder mit SNP1 siRNA (BT20) oder nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (MOCK-Transfektion; SKOV-3), bedingt durch den LASP-1-knock-down, eine Akkumulation in der G2-Phase des Zellzyklus.

3.6 LASP-1-knock-down reduziert Zyxin-Konzentration an fokalen Kontakten

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass LASP-1 vorwiegend an fokalen Kontakten lokalisiert ist und dort mit Zyxin und Actin interagiert [20, 28]. Um den Einfluss des LASP-1-knock-downs auf diese beiden Bindungspartner zu untersuchen, wurden mit siRNA-LASP-1 transfizierte BT20- und SKOV-3-Zellen mit Phalloidin

Green für Actin markiert bzw. mit murinem Zyxin-Hybridoma-Überstand und anschließend mit FITC-markierten Zweitantikörpern inkubiert.

Immunfluoreszenzaufnahmen von Zellen mit einem LASP-1-knock-down zeigten bei Abwesenheit von LASP-1 eine deutliche Verringerung des Zyxinsignals, bis hin zum vollständigen Verlust von Zyxin, an fokalen Kontakten. Dies war nicht auf eine Reduktion der Zyxinexpression zurückzuführen, wie Western-blots bestätigten, sondern auf eine Veränderung der Zyxinlokalisierung (Abbildung 8).

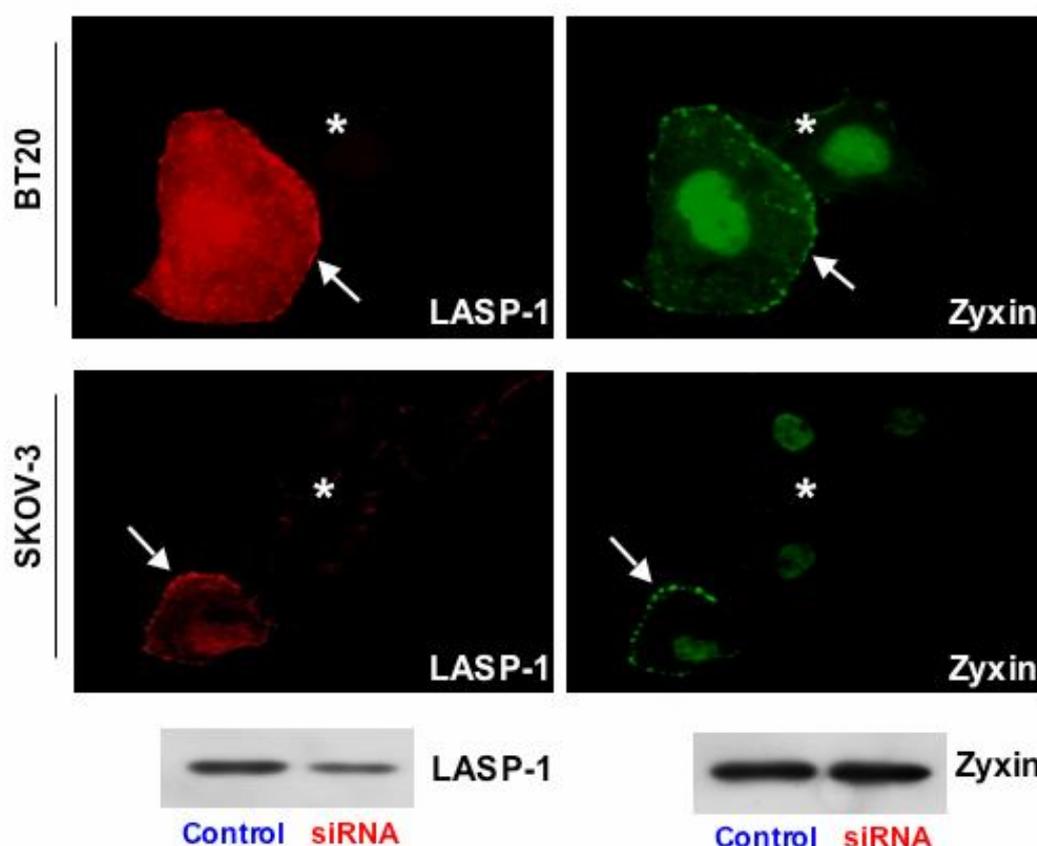


Abbildung 8: Immunfluoreszenzaufnahmen von BT20- und SKOV-3-Zellen 48 h nach Transfektion mit siRNA gegen LASP-1 (siRNA). LASP-1 (rot) und Zyxin (grün) kolokalisieren in den Zellen ohne LASP-1-knock-down an den fokalen Kontakten (Pfeile). Im Falle eines LASP-1-knock-downs sinkt die Zyxin-Konzentration an den fokalen Kontakten, teilweise bis hin zum vollständigen Verlust von Zyxin entlang der Zellmembran (Sterne). Dabei sinkt die Zyxin-Gesamtproteinmenge bei einem knock-down von LASP-1 nicht, was obenstehender Western-blot verdeutlicht. Zyxin wird also lediglich durch den LASP-1-knock-down umverteilt und liegt dann diffus verstreut im Zytoplasma vor. Kontrolltransfektion (control) mit sNP1-Oligonukleotiden.

Die Änderung der Zyxinlokalisierung hatte dabei keinen Einfluss auf die Morphologie der fokalen Zellkontakte, was durch Immunfluoreszenzfärbungen von Vinculin, einem Markerprotein für Zelladhäsionen und fokale Kontakte, gezeigt werden konnte (Abbildung 9).

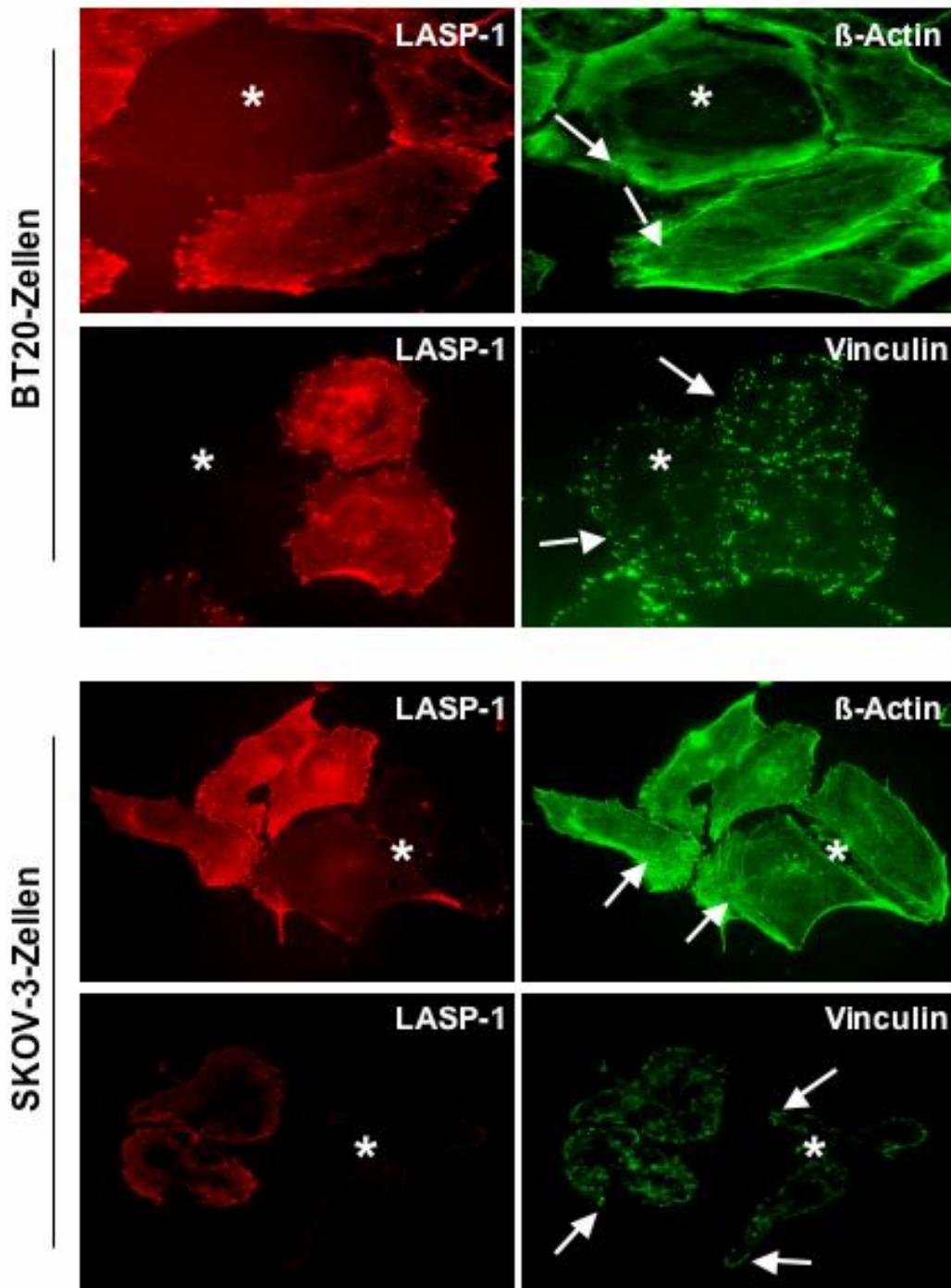


Abbildung 9: Immunfluoreszenzaufnahmen von BT20- und SKOV-3-Zellen nach LASP-1-knock-down (Stern). Das silencing von LASP-1 (rot) beeinflusst weder das Actin-Zytoskelett noch die Vinculin-Lokalisation (Pfeile; beide grün).

Ebenso wenig wurde die Organisation des Actin-Zytoskeletts durch das silencing von LASP-1 verändert (Abbildung 9), wenn man berücksichtigt, dass eine verringerte Actinfaseranzahl und einige F-Actinaggregate sowie schlecht abgrenzbare Actinnetzwerke für Krebszelllinien mit hoher metastatischer Aktivität typische Veränderungen sind [52].

3.7 LASP-1-Expression in nicht-neoplastischen Zellen steigert die Migration

Obwohl die exakte Funktion von LASP-1 bislang ungeklärt ist, weisen jüngere Ergebnisse auf eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und -adhäsion hin [18, 24]. Zur Untersuchung der Funktion von LASP-1 im Hinblick auf Migration wurde ein Migrationsassay, wie unter 2.2.18 beschrieben, durchgeführt. Verwendet wurden mit siRNA gegen LASP-1 transfizierte BT20- und SKOV-3-Zellen, also Krebszellen mit einem LASP-1-knock-down, und PTK2-Zellen. PTK2-Zellen sind nicht-neoplastische Mesangialzellen der australischen Beutelratte, deren Wildtyp kein endogenes LASP-1 exprimiert, die aber durch Transfektion mit Plasmiden mit humanem Wildtyp-Gen von LASP-1 zur Überexpression von LASP-1 stimuliert wurden. Als Kontrolle dienten Krebszellen, die mit scrambled NP1 transfiziert wurden.

Die Zellen wurden nach erfolgreicher Transfektion in die obere Kammer einer transwell-chamber der Firma corning star (Cambridge, MA, USA) auf eine poröse transwell Polycarbonat Membran ausplattiert. Nach 4 h wurde der Anteil der Zellen, der durch die Poren der Membran migriert war, photometrisch bestimmt.

Die LASP-1-Depletion in BT20- und SKOV-3-Zellen resultierte in einer starken Verlangsamung der Migration (ca. 35 - 50 %), wohingegen die PTK2-Zellen durch artifizielle Expression von exogen zugeführtem LASP-1-Gen eine signifikante Steigerung ihrer Motilität erfuhren (ca. 35 %) (Abbildung 10). Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle von LASP-1 in Bezug auf die Zellmigration.

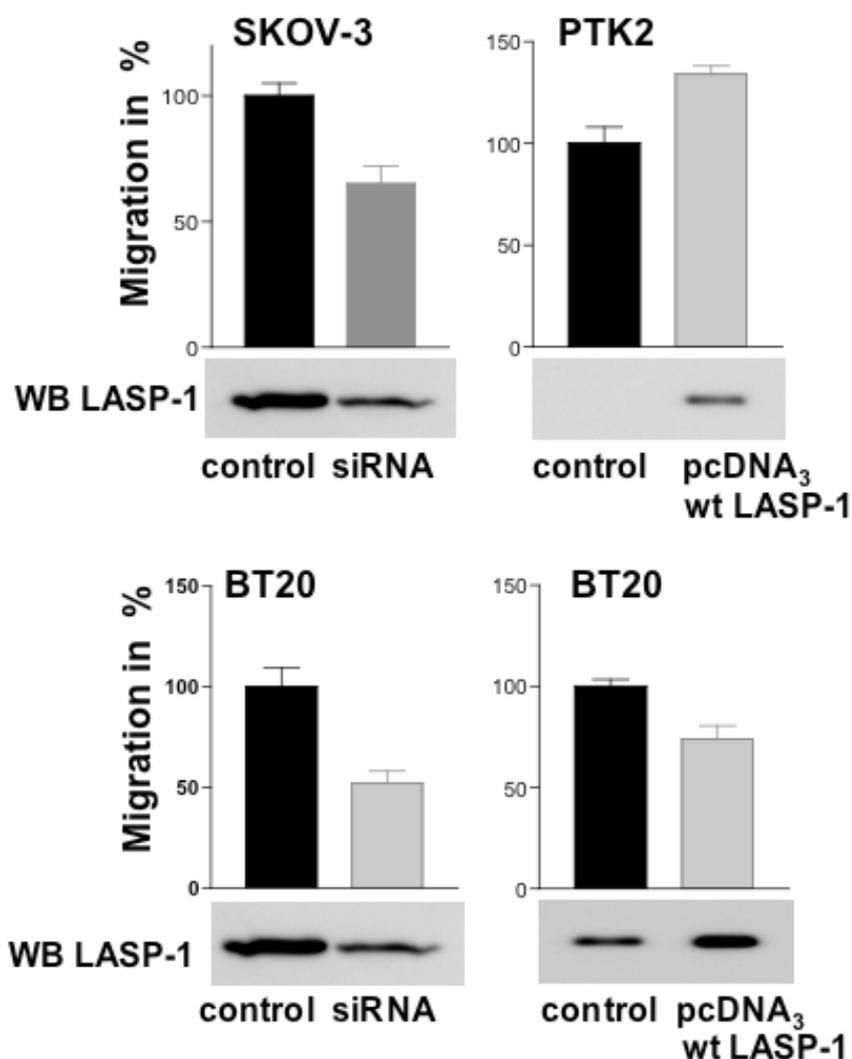


Abbildung 10: Anzahl an migrierten Zellen in Prozent, die innerhalb von 4 h durch die Membran der transwell-chamber gewandert sind. Die Krebszelllinien BT20 und SKOV-3 wurden 48 h vorher entweder mit siRNA gegen LASP-1 (knock-down im korrespondierenden Western-blot) oder zur Kontrolle mit sNP1-Oligonukleotiden transfiziert (control). Der LASP-1-knock-down führte zu einer verringerten Migration. Die Überexpression von LASP-1 in BT20-Zellen, die ohnehin schon stark LASP-1 exprimieren, bewirkt durch eine Transfektion mit dem Wildtyp LASP-1-Gen in pcDNA₃ ebenfalls eine Reduktion der Migration. Die PTK2-Zellen, die kein endogenes LASP-1 exprimieren (leerer Western-blot), begannen nach Transfektion mit dem Wildtyp LASP-1-Gen das Protein zu bilden (LASP-1 Bande im Western-blot) und daraufhin stärker zu migrieren.

Erstaunlicherweise führte die Überexpression von LASP-1 in BT20-Zellen ebenfalls zu einer Reduktion der Motilität (25 %). Wahrscheinlich bedingt die Amplifikation dieses Adapterproteins in Zellen, die ohnehin schon LASP-1 überexprimieren, eine Desorganisation von Signalwegen und Veränderungen in

der Zytoskelettarchitektur, was sich inhibierend auf die Zellmigration auswirkt. Ein ähnlicher Effekt wurde von Lin und Mitarbeitern in MCF7-Zellen beschrieben [24].

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Zellmigration sowie kontrollierter Auf- und Abbau von fokalen Kontakten sind komplexe, mehrstufige Prozesse und zentrale Bestandteile der molekularen Karzinogenese [53]. Bis jetzt sind mehr als 50 verschiedene Adhäsionsproteine identifiziert worden, die an der Organisation und Polymerisation des Actin-Zytoskeletts und der fokalen Kontakte während der Zellprotrusion beteiligt sind. LASP-1, als Protein fokaler Kontakte, interagiert dort sowohl mit dem Kelch-related-protein1 (Krp1) und lipoma preferred partner (LPP), als auch mit Zyxin – allesamt Proteine, welche die Actinfilamentdynamik beeinflussen.

Die Interaktion erfolgt im Falle von LPP und Zyxin durch die C-terminale SH3-Domäne von LASP-1, die an die aminoterminalen Prolin-reichen Sequenzen von Zyxin und LPP bindet [18, 28]. Im Falle von Krp1 tritt die Bindung zwischen den nebulin-like-repeats von LASP-1, die auch die Bindung an F-Actin vermitteln, und der N-terminalen BTB/POZ Domäne von Krp1 auf [32].

Der Kontakt von LASP-1 und Krp1, der sich in der Kolokalisation der beiden Proteine an den Spitzen der sich ausdehnenden Pseudopodien in der Nähe des Proteins Ezrin ausdrückt, ist dabei essentiell für pseudopodiale Elongation in Abwesenheit von Fibronectin [32]. Ezrin ist ein so genanntes „cross-linking“ Protein, das Integrine wie CD 44 an der Zellmembran mit Actinfasern vernetzt. Dabei fungiert es auch als Signaltransduktor: So wird Ezrin z. B. durch Stimulation der Zellen mit „Epithelial Growth Factor“ (EGF) phosphoryliert und transloziert. Unlängst veröffentlichte Daten zeigen, dass eine hohe Ezrin Expression mit dem metastatischen Verhalten von Ovarkarzinomen assoziiert ist [54, 55].

In zwei anderen Untersuchungen wurde sowohl die Überexpression von LASP-1-mRNA, als auch die Gen-Koamplifikation des LASP-1-Gens und des HER-2/neu-Gens (c-erbB2) in Brustkrebszellen aus Lymphknotenmetastasen beobachtet [9, 14], was auf eine mögliche Verknüpfung von LASP-1 mit EGF-abhängigen Signalwegen hinweist, da HER-2/neu ebenfalls ein Protein der

EGF-Rezeptor-Familie ist. Im Gegensatz zu dieser Hypothese steht allerdings die Tatsache, dass in der Patientenstudie dieser Dissertation, zumindest auf Proteinebene, keine Korrelation zwischen der LASP-1-Expression und der HER-2/neu-Expression nachweisbar war.

Durch die vorliegende Arbeit wurde gezeigt, dass sich das silencing von LASP-1 in BT20- und SKOV-3-Zellen stark inhibierend auf die Migration auswirkt, wohingegen die Überexpression in Mesangialzellen der australischen Beutelratte die Motilität deutlich steigerte. Diese Ergebnisse sind ein Indikator für die wichtige Rolle von LASP-1 im Hinblick auf Metastasierung und dafür, dass eine gewisse Menge an LASP-1 in fokalen Kontakten für ein normales Migrationsverhalten notwendig ist, zumal die artifizielle Überexpression von LASP-1 in Krebszellen, die ohnehin schon LASP-1 überexprimieren, ebenfalls zu einer Hemmung der Migration führte. Wahrscheinlich bedingt die zusätzliche Amplifikation dieses Adapterproteins in Krebszellen eine Desorganisation von Signalwegen und Veränderungen in der Zytoskelettarchitektur, was sich inhibierend auf die Zellmigration auswirkt.

Bemerkenswert ist allerdings, dass die Zelladhäsion und die Bildung von Zellfortsätzen durch den LASP-1-knock-down nicht beeinträchtigt werden, wie Lin und Mitarbeiter zeigen konnten [24], was im Einklang zu den Vinculin-Immunfluoreszenzaufnahmen dieser Dissertation steht, die keine Veränderungen der Morphologie der fokalen Kontakte zeigten. Somit besteht kein Anhalt für einen gestörten Auf- und Abbau von fokalen Kontakten, die für Adhäsion und Pseudopodienbildung bekanntlich unerlässlich sind.

Durch ebendiese Studie von Lin et al. wurde auch ein Zusammenhang von LASP-1 und Wachstumsfaktor-stimulierter Migration postuliert. In Fibroblasten, die mit Apoptose-induzierenden Faktoren behandelt wurden, erfolgte eine Phosphorylierung von LASP-1 an Tyr-171, was in einer Bewegung von LASP-1 aus den fokalen Kontakten heraus zur Zellperipherie hin resultierte und anschließend in den programmierten Zelltod mündete [24]. In diesem Kontext demonstrieren aber die Versuche der vorliegenden Arbeit, dass die

Herunterregulation von LASP-1 keinen Einfluss auf die Aktivierung von Apoptose, bzw. der Caspase-3 hat.

Tomasetto et al. haben 1995 die Überexpression von LASP-1-mRNA in humanen Mammakarzinomen anhand von Northern-blots nachgewiesen [14]. In Übereinstimmung mit diesen aus Northern-blots gewonnenen Daten ergänzen die immunhistochemischen Aufnahmen dieser Dissertation, dass LASP-1 von benignem, nicht-neoplastischem Drüsenepithel der Mamma und des Ovars nur in visuell nicht detektierbarem Maße exprimiert wird, und demonstrieren gleichsam, dass einige DCIS und invasive ductale Mammakarzinome, sowie Lymphknotenmetastasen und epitheliale Ovarkarzinome stark LASP-1-positiv sind. Die hohe Menge an LASP-1 in Myoepithelzellen der Brust sowie glatten Gefäßmuskelzellen impliziert zusätzlich die Bedeutung des Proteins für zelluläre Kontraktion und Bewegung (Abbildung 2).

In der Patientenstudie lag der Anteil an LASP-1-positiven und damit LASP-1 stark überexprimierenden ductalen Mammakarzinome bei 55.4 % (LASP-1-IRS > 5). Die statistische Analyse belegt dabei, dass LASP-1 signifikant stärker in invasiven Karzinomen als in benignen Fibroadenomen exprimiert wird. Die ebenfalls signifikant erhöhte LASP-1-Expression mit zunehmender Tumorgöße und mit dem signifikant erhöhten Anteil an zum OP-Zeitpunkt bereits Nodal-positiven Tumorstadien sind ein weiterer Hinweis für die wichtige Funktion von LASP-1 im Hinblick auf Proliferation und Migration.

Diese Fakten sind analog zu denen eines anderen Proteins fokaler Kontakte, nämlich ENAH. ENAH ist ein Protein aus der ENAH/VASP-Proteinfamilie, das an fokalen Kontakten die Zellmigration und die Actin-Zytoskelettorganisation steuert. ENAH ist, ähnlich wie LASP-1, in normalem Brustgewebe immunhistochemisch nicht detektierbar, wird dagegen in so genannten „low-risk benign diseases“, wie Fibroadenomen, schwach exprimiert und in invasiven Karzinomen stark exprimiert. Dabei besteht, ebenso wie bei LASP-1, eine signifikante Korrelation ($p < 0.05$) zwischen der ENAH-Expression und der Tumorgöße [56].

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen aber komplementärerweise, dass der ENAH-knock-down, im Gegensatz zum LASP-1-knock-down, nicht die

Proliferation von Brustkrebszellen bremst oder verändert (Abbildungen 5 und 6).

Zwei weitere Beobachtungen betonen die Bedeutung von LASP-1 für humane maligne Neoplasien: Erstens ist eine veränderte LASP-1-Expression in Zellen der akuten myeloischen Leukämie nachweisbar [57]. Zweitens zeigen andere Studien, dass die Transcription von LASP-1 als Antwort auf das Morphogen Sonic Hedgehog hoch reguliert wird. Eine Unterbrechung des Hedgehog-Signalweges führt zu einer Reihe embryologischer Entwicklungsstörungen, und ist bei der Karzinogenese einiger humaner Krebsarten nachzuweisen [58]. In diesem Kontext muss beachtet werden, dass durch Microarray-Technologie auch das Gen von Zyxin als ein differenziell transkribiertes Gen in unterschiedlichen Krebsentitäten identifiziert werden konnte [59].

Zyxin ist, wie LASP-1, überwiegend an fokalen Adhäsionsplaques lokalisiert und besitzt in Säugerzellen eine tragende Rolle in der Actinfilamentpolymerisation [60]. So bedingt zum Beispiel das silencing von Zyxin in HeLa-Zellen eine signifikant verringerte Anzahl an Actin-Stressfasern [61]. Dagegen bewirkt zyklische Dehnung lediglich eine Translokation von Zyxin aus den fokalen Kontakten heraus und eine Akkumulation im Zellkern, ohne dabei das Zytoskelett oder die Vinculin-Lokalisation zu beeinflussen [62]. Erst unlängst veröffentlichte Daten belegen, dass in den fokalen Kontakten von Zyxin-knock-out-Fibroblasten die Zytoskelettproteine ENAH und VASP fehlen, und dass solche Zellen, die kein Zyxin besitzen, prinzipiell ein defizitäres Actin-Zytoskelett-remodeling aufweisen [63].

Die Immunfluoreszenzaufnahmen der vorliegenden Arbeit beweisen, dass ein erfolgreicher LASP-1-knock-down zu einer diffusen zytoplasmatischen Verteilung von Zyxin führt, jedoch ohne Proteinverlust und Veränderungen im Actin-Zytoskelett oder der Vinculin-Lokalisation, was für eine Rekrutierungsfunktion von LASP-1 für Zyxin an die fokalen Adhäsionsplaques spricht.

Die verringerte Zellmotilität, die durch das silencing von LASP-1 bewirkt wurde, kann durch den funktionellen Verlust von Zyxin an den fokalen Kontakten erklärt

werden: Zyxin hat dort eine wichtige Aufgabe als Adapterprotein zur Bildung von Proteinkomplexen, z. B. mit ENAH und VASP [63], und ist dort auch zur seitenspezifischen Actinpolymerisation nötig - zwei Faktoren, die für Zellmigration unabdingbar sind. Diese Ergebnisse korrelieren mit vorhergehenden Studien, in welchen mittels inhibitorischer Peptidketten experimentell die N-terminale Bindungsstelle von Zyxin, die auch für die normale Zyxinlokalisierung mitverantwortlich ist, blockiert und dadurch eine verringerte Migrationsrate induziert wurde [64]. Diese Beobachtungen stehen wiederum in Kontrast zu der Tatsache, dass Zyxin-knock-out-Fibroblasten sogar schneller migrieren [63], was aber durch eine eventuell vorhandene Hochregulation anderer Zyxin-Proteinfamilienmitglieder, wie Ajuba, erklärt werden könnte, die womöglich den Zyxinmangel funktionell kompensieren [65].

Publikationen aus der jüngeren Vergangenheit haben gezeigt, dass Zyxin als so genanntes „Shuttle-Protein“, wahrscheinlich vereint mit anderen LIM-Proteinen, durch den Zellkern wandert und dort unter anderem die Gen-Transkription reguliert [66-68]. Während der Mitose assoziiert eine Zyxinfraktion mit dem Tumorsuppressor-protein h-warts am Mitoseapparat [69]. H-warts spielt eine zentrale Rolle in der Mitose von Säugerzellen, und sein Funktionsverlust führt zur Entkoppelung des normalen Zellzyklus, was wahrscheinlich die Entstehung von Tumoren beeinflusst. H-warts wird durch Bindung an Zyxin aktiviert und hemmt die cyclin-dependent-kinase-1 (cdk1), die normalerweise für eine Progression der Zellen von der G2- in die M-Phase sorgt [70, 71].

Durch die Experimente dieser Dissertation wurde demonstriert, dass Zyxin in Brust- und Eierstockkrebszellen nach erfolgreicher Transfektion mit siRNA gegen LASP-1 aus den fokalen Kontakten verschwindet und sich diffus im Zytoplasma verteilt. Es ist deshalb nicht unwahrscheinlich, dass ein Teil des Zyxins nun vermehrt in den Zellkern eindringt, dort an h-warts bindet und damit den Zellzyklus in der G2-Phase arretiert. Dieser Mechanismus ist eine mögliche Erklärung für die beobachtete Hemmung der Proliferation der Krebszellen und die Akkumulation der Zellen in der G2-Phase nach einem LASP-1-knock-down.

Interessanterweise wird Zyxin in stark proliferierenden Ewing-Sarkomen (EWS) nur sehr gering exprimiert und ist dort ebenfalls nur diffus im Zytoplasma verteilt, anstatt sich in Actin-reichen Zelladhäsionsplaques anzusammeln. Ein Zyxin-Gentransfer in EWS-FLI1-transformierte Fibroblasten führt dagegen nach Expression von Zyxin zu einer verringerten Proliferationsrate. Deshalb wird Zyxin in Ewing-Sarkomen bereits als ein Tumorsuppressorprotein betrachtet [72].

Die Immunfluoreszenzaufnahmen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Abwesenheit von LASP-1 die Zyxinlokalisierung dramatisch beeinflusst. Dies könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass Tumorzellen, die LASP-1 stark überexprimieren, vermehrt Zyxin an die fokalen Kontakte rekrutieren und dadurch Zyxin als Shuttle-Protein zwischen den fokalen Kontakten und dem Zellkern bei der normalen Tumorsuppressorfunktion stören könnten.

Zusammenfassend unterstreichen die Resultate dieser Doktorarbeit die wichtige Rolle von LASP-1 im Hinblick auf Tumorzellproliferation und -migration, was durch Abbildung 11 modellhaft illustriert wird.

Aus den Daten der Patientenstudie dieser Dissertation geht hervor, dass die LASP-1-Expression signifikant positiv mit dem Staging von humanen Mammakarzinomen korreliert. Da LASP-1 sowohl Proliferation als auch Migration beeinflusst, ist es nicht verwunderlich, dass Mammakarzinome mit hoher LASP-1-Expression (LASP-1-positiv, bzw. LASP-1-IRS > 5) häufig bereits zum OP-Zeitpunkt metastasiert sind und schon einen großen Tumorquerschnitt erreicht haben.

Die Sensitivität eines z. B. postoperativ durchgeführten LASP-1-IRS-Tests zur Vorhersage einer Nodalpositivität beträgt allerdings nur 85 %. Eine zuverlässige Aussage über einen Lymphknotenbefall ist damit nur in geringerem Maße gegeben, im Vergleich zu sensitiveren Verfahren wie der Sentinel-Lymphadenektomie (durchschnittliche Sensitivität 95 %) [73]. Dennoch könnte der nicht-invasive LASP-1-IRS-Test am bereits entfernten Primärtumor die Routinediagnostik ergänzen, vor allem wenn die Patientinnen die invasive Sentinel-Lymphadenektomie ablehnen.

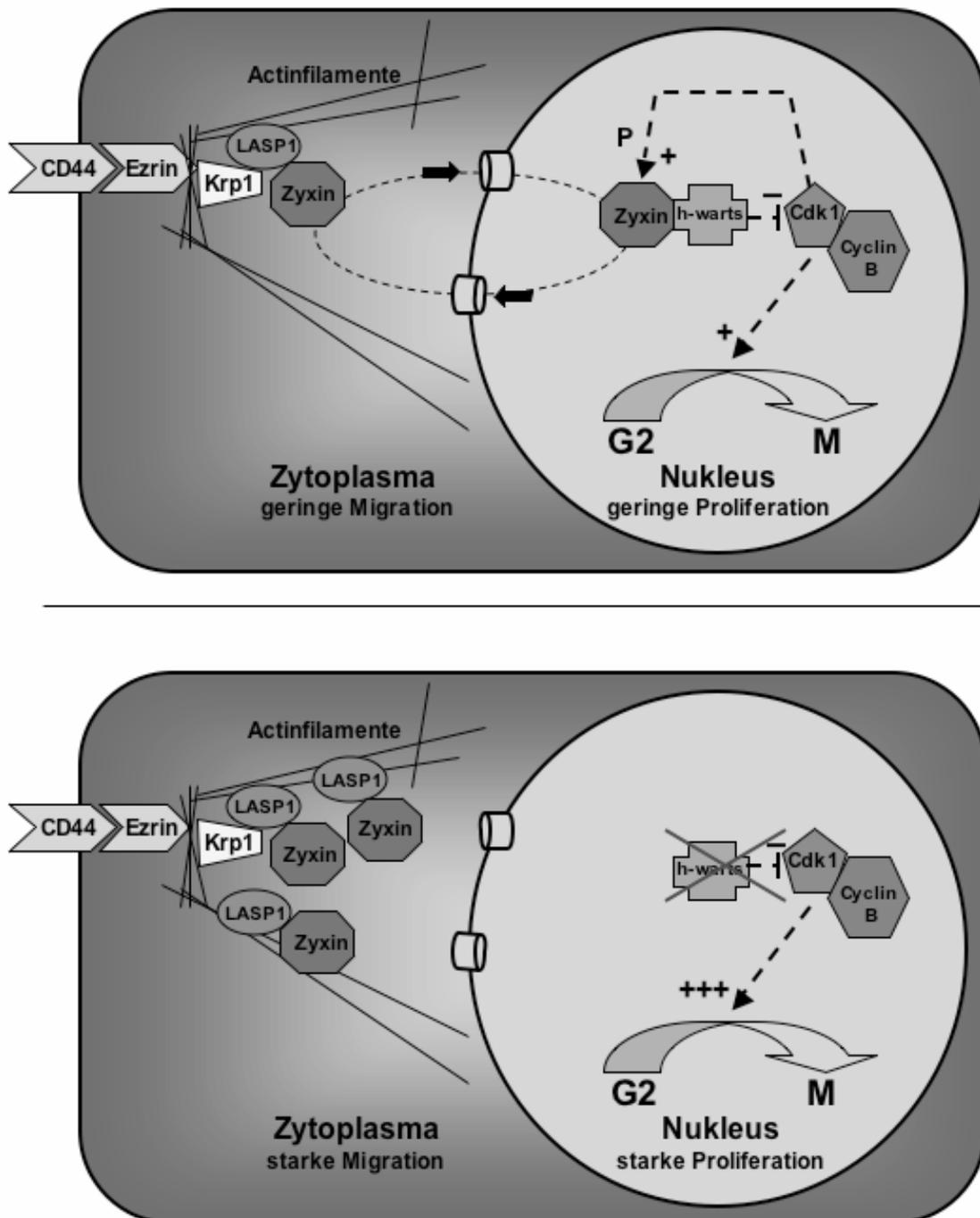


Abbildung 11: Hypothetische Darstellung der Interaktions- und Funktionsweise von LASP-1 und Zyxin in den Fällen einer normalen LASP-1-Expression (oben) und einer LASP-1-Überexpression (unten), mit konsekutiver Akkumulation von Zyxin an den fokalen Kontakten und dadurch verstärkter Migration und Proliferation. Die Proteine Ezrin und CD 44 sind wegen der bereits beschriebenen räumlichen Kollokalisation hier als potentielle vorgeschaltete Bindungspartner von Krp1 und LASP-1 dargestellt. Eine direkte oder indirekte Interaktion wurde allerdings bis dato noch nicht nachgewiesen.

4.1 Relevanz der Daten und Perspektive

Ziel meiner Promotionstätigkeit war es, mittels Experimenten auf zellulärer und histologischer Ebene die genaue Funktion von LASP-1 in Krebszellen zu untersuchen und mit einer Patientenstudie die klinische Relevanz der LASP-1-Überexpression in humanem Brustkrebsgewebe im Hinblick auf prognostische und therapeutische Möglichkeiten zu bestimmen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal auf Proteinebene beschrieben, dass LASP-1 hochgradig in Ovar- und Mammakarzinomen überexprimiert ist, und dass der LASP-1-knock-down mittels RNA-Interferenz *in vitro* zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation und Migration von Eierstock- und Brustkrebszellen führt, ohne dabei die Expression anderer mit LASP-1 assoziierter Proteine zu beeinflussen. Die Herunterregulation von LASP-1 hat einen starken Effekt auf die Lokalisation des LASP-1-Bindungspartners Zyxin, nicht aber auf das Actin-Zytoskelett oder die Morphologie der fokalen Kontakte. Die begleitende Patientenstudie belegt die Korrelation der LASP-1-Expression mit den Stagingparametern Tumorgroße und Nodalstatus in humanem Brustkrebs, sowie die signifikant unterschiedlichen Expressionshöhen von LASP-1 in invasiven ductalen Mammakarzinomen im Vergleich zu benignen Fibroadenomen.

Aus den erhobenen Daten geht hervor, dass LASP-1 tatsächlich ein wichtiger Faktor für das Tumorwachstum und die Metastasierung ist, der vermutlich im Zusammenspiel mit vielen anderen Interaktionspartnern, wie z. B. Zyxin, neben strukturellen Aufgaben auch eine Funktion als Adapterprotein in einem neuen Signalweg zwischen den fokalen Kontakten und dem Zellkern hat. Nachfolgende experimentelle Arbeiten müssen sich nun auf die weitere Charakterisierung dieses Signalweges konzentrieren, indem erstens die Funktion der Interaktion mit bekannten Bindungspartnern von LASP-1 genauer beschrieben wird und zweitens auch so genannte „upstream“ Interaktionspartner (womöglich Ezrin oder CD 44) identifiziert werden, insbesondere für die LIM-Domäne von LASP-1.

Welche Liganden können bei externer Applikation den LASP-1-Signalweg aktivieren? Welche Rezeptoren werden hierbei benötigt? Wie ändert sich dabei

das Proliferations- und Migrationsverhalten der Zellen? Welche modifizierende Rolle spielt hier die Phosphorylierung von LASP-1 an seinen bekannten Phosphorylierungsstellen?... lauten die weiterführenden Fragen für diesen Forschungsbereich.

Von besonderem Interesse ist auch eine klinisch-therapeutische Nutzbarkeit dieser neuen Signalfunktion von LASP-1: Falls die Funktion von LASP-1 wirklich durch membrangebundene Rezeptoren beeinflusst wird, wäre eine spezifische Inhibition der Rezeptoren mit neuen Arzneimitteln (beispielsweise Antikörpern), analog zu Herceptin[®]/Trastuzumab, zur gezielten Hemmung der Tumorzellproliferation und -migration denkbar.

Des Weiteren besteht die Chance einer klinischen Verwendbarkeit des nun etablierten immunhistochemischen LASP-1-IRS für humane Ovar- und Mammakarzinome im Sinne einer postoperativen Prognoseabschätzung.

Zukünftige Untersuchungen, wie z. B. „follow-up-Studien“, müssen deshalb anhand von Überlebenszeiten im Vergleich zur LASP-1-Expressionshöhe des Primärtumors das Potential von LASP-1 als unabhängigen Marker für die Prognose von Brust- und Eierstockkrebs beurteilen, wobei bereits wahrscheinlich für das Mammakarzinom, nicht aber für das Ovarkarzinom, bessere Prognosemarker, wie die Sentinel-Lymphadenektomie, zur Verfügung stehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind für diese in der Ferne liegenden Ziele als wichtiges Fundament eines noch weiten Weges zu betrachten. Die anfangs skizzierten Ziele dieser Doktorarbeit wurden insofern erreicht, als dass die nun bestehenden Daten auf eine relevante Funktion des Proteins LASP-1 in malignen Erkrankungen hinweisen, so dass es lohnenswert erscheint oben genannten Fragen intensiv nachzugehen.

5. Zusammenfassung

Brustkrebs ist, verbunden mit einem Lebenszeitrisiko von 12.5 % daran zu erkranken, die häufigste maligne Erkrankung der Frau in der westlichen Welt. Das LIM- und SH3-Domänen Protein LASP-1 wurde erstmalig 1995 als spezifisch in fokalen Kontakten akkumulierendes Protein in humanen Brustkrebszellen beschrieben. Eine eigene Patientenstudie (n = 83) ergab, dass LASP-1 in 55.4 % der untersuchten invasiven Mammakarzinome eindeutig überexprimiert wird und die LASP-1-Expressionshöhe signifikant positiv mit der Tumorgroße ($p < 0.05$) und der Wahrscheinlichkeit für Nodalpositivität ($p < 0.01$) korreliert.

Als Actin-bindendes Protein mit ubiquitärer Expression interagiert LASP-1 mittels seiner SH3-Domäne auch mit Zyxin. Zyxin ist ein Signalprotein, das zwischen fokalen Kontakten und dem Zellkern pendelt und an der Regulation von Transcription, Zellzyklus und Zellbewegung beteiligt ist. In dieser Doktorarbeit untersuchte ich die Funktion von LASP-1 in verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien und einer humanen Ovarkarzinomzelllinie unter Verwendung der RNA-Interferenz zum sequenzspezifischen knock-down von LASP-1.

Die Transfektion der Zellen mit LASP-1-spezifischer small-interfering-RNA (siRNA) senkte die Proteinexpression um ca. 50 - 58 %, was zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase führte und die Proliferation der Brust- und Eierstockkrebszellen um 30 - 50 % reduzierte. Apoptotische und nekrotische Prozesse wurden dabei durch Caspase-3 Western-blots und Trypan-Blau-Färbungen ausgeschlossen.

Außerdem verringerte der knock-down von LASP-1 die Migration der Krebszellen, wohingegen die Überexpression von LASP-1 in PTK2- (Potorous tridactylis kidney) Zellen, welche kein endogenes LASP-1 exprimieren, in einer signifikanten Steigerung der Migration resultierte.

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass der knock-down von LASP-1 von einer verringerten Konzentration seines Interaktionspartners Zyxin an fokalen Kontakten begleitet wird, ohne dabei das Actin-Zytoskelett oder die Morphologie

der fokalen Kontakte zu verändern. Die Transfektion der Brust- und Eierstockkrebszellen mit einer Kontroll-siRNA (scrambled Neuropilin1) beeinflusste hingegen keinen der genannten Parameter.

Diese Daten unterstreichen die wichtige Rolle von LASP-1 für die Tumorzellproliferation und -migration. LASP-1 könnte daher in Interaktion mit Zyxin an der molekularen Karzinogenese von Brust- und Eierstockkrebs beteiligt sein und in der Zukunft als viel versprechender Prognosemarker dienen. Diese und weitere Ergebnisse wurden von mir bereits in internationalen Journalen veröffentlicht [74-76].

6. Appendix: Rohdaten der Patientenstudie

6.1 Invasive ductale Mammakarzinome

Nr.	OP-Jahr	Alter in Jahren	Grading	Staging	ÖIRS	PIRS	HER-2/neu Score / Status	LASP-1 IRS
1	2005	44	3	pT1b N0 (sn) pMx	0	0	0 -	0
2	2005	52	2	pT1c pN1 pMx	9	12	0 -	0
3	2005	41	3	pT1c pN0 (sn) pMx	6	12	0 -	0
4	2005	54	3	pT2 pN0 (sn) pMx	2	0	0 -	0
5	2005	42	1	pT1b N0 (sn) pMx	9	12	1+ -	0
6	2005	46	3	pT1c pN0 (sn) pMx pL0 pV0	8	12	1+ -	0
7	2005	44	2	mpT1c pN0 (sn) pMx	8	8	0 -	0
8	2005	59	2	pT2 pN1 (sn) pMx	12	6	0 -	0
9	2005	40	3	pT2 pN0 (i+) (sn) pMx	9	6	0 -	1
10	2005	52	3	ypT4d pN1 pMx	9	6	1+ -	1
11	2005	60	2	pT1b N0 (sn) pMx	12	12	0 -	1
12	2005	58	3	pT2 pN0 (sn) pMx	0	0	0 -	1
13	2005	58	2	pT3 pN3a pMx L1 V0	8	0	0 -	1
14	2005	45	2	pT2a pN1a Mx	12	9	0 -	1
15	2005	66	2	pT1b pN1 Mx L1 V0	12	12	0 -	1
16	2005	61	1	pT1c pN0 (sn) pMx pL0 pV0	8	6	0 -	2
17	2005	74	1	pT1c pN0 (sn) pMx	9	9	0 -	2
18	2005	38	3	pT1c (m) pN2a pMx	12	4	0 -	2
19	2005	69	3	pT1c pN1 pMx pL1 PV0	12	9	0 -	2
20	2005	49	2	pT1c pN0 Mx	8	12	0 -	2
21	2005	71	3	pT2 pN1a pMx	0	0	3+ +	3
22	2005	75	3	pT4b pN2a pMx	8	3	3+ +	3
23	2005	53	3	pT2 pN2a pMx	0	0	3+ +	3
24	2006	53	2	pT1c pN0 Mx L0 V0	12	12	0 -	3
25	2006	48	3	pT2 pNo Mx Lo Vo	12	12	0 -	3
26	2005	36	2	pT1a pN1 Mx L1 V0	12	6	2+ +	3
27	2005	58	3	pT1c pN0 Mx	6	3	3+ +	3
28	2005	62	3	pT1c (m) pN1a pMx	0	0	0 -	4
29	2004	50	3	mpT4d pN3 pM1	9	6	1+ -	4
30	2005	73	3	pT4b pN1a pMx	0	0	2+ +	4
31	2004	53	2	pT1cm pN0 pMx	12	9	0 -	4
32	2006	51	3	pT1c pN0 Mx L0 V0	8	2	0 -	4
33	2005	74	2	pT1b pN0 Mx	9	9	0 -	4
34	2005	54	3	pT1b pN0 Mx	0	0	1+ -	4
35	2005	65	2	pT3 pN2a Mx	4	3	0 -	4
36	2005	37	2	pT1c pN0 Mx L1	0	0	0 -	4
37	2005	78	2	pT1b pN0 Mx	0	0	0 -	4
38	2005	61	3	pT1c pN1a pMx	0	0	3+ +	4

6. Appendix: Rohdaten der Patientenstudie

39	2005	67	2	pT1c pN1a pMx	2	0	0 -	6
40	2005	57	3	pT2 pNo Mx Lo Vo	0	0	0 -	6
41	2005	70	2	pT2 pN1 Mx L1 V0	12	12	0 -	6
42	2005	96	2	pT1c pN0 (sn) pMx	8	8	0 -	8
43	2005	59	3	pT2 pN1mi (sn) pMx	12	9	0 -	8
44	2005	63	3	pT2 pN1 pMx	12	9	0 -	8
45	2004	80	2	pT1c pN1a pM1	8	4	0 -	8
46	2004	51	2	pT2 pN0 pMx	12	4	0 -	8
47	2004	74	3	pT2 pN2a(sn) pMx	9	6	0 -	8
48	2001	32	3	pT1c pN1biii pM0	0	0	0 -	8
49	2001	41	3	pT3 pN1bi pM0	9	9	2+ +	8
50	2000	45	2	pT2 pN1biii pM0	6	4	0 -	8
51	2000	67	3	pT2 pN0 pM0	0	0	2+ +	8
52	2000	76	3	pT4d pN1biv pM1	3	0	0 -	8
53	2006	67	2	pT2 pN1c Mx	9	2	0 -	8
54	2000	49	2	pT2 pN1biii pM0	8	2	0 -	8
55	2006	58	2	pT2 pN3 pMx L1	6	9	0 -	8
56	2006	36	2	pT1c pN0i Mx L1 V0	8	8	0 -	8
57	2006	66	3	pT1c pN1 Mx	12	9	0 -	8
58	2006	49	3	pT2 pN1 Mx L0 V0	0	0	1+ -	8
59	2006	85	2	pT1c pN0 Mx L0 V0	12	6	0 -	8
60	2006	70	2	pT1c pN0 Mx	9	12	2+ +	8
61	2006	75	3	pT2 pN3a Mx	9	6	0 -	8
62	2006	59	3	pT1c pN2a Mx	9	2	1+ -	8
63	2005	62	2	pT1c pN1a Mx	12	12	1+ -	8
64	2005	62	2	pT2 pN0 Mx L1 V0	12	12	0 -	8
65	2005	64	2	pT1c pN0 Mx	12	12	1+ -	8
66	2005	55	3	pT2 pN2a Mx L1 V0	12	6	1+ -	8
67	2005	68	3	pT1c pN1 Mx	12	2	1+ -	8
68	2005	34	2	pT1c pN2 Mx	0	0	3+ +	8
69	2005	74	3	pT4 pN2aiii Mx L1 V1	12	6	1+ -	8
70	2005	55	3	pT2a pN1mi Mx	0	0	3+ +	8
71	2005	61	2	pT2 pN1 pM1	9	6	0 -	8
72	2005	80	2	pT3 pN3 pM0	6	6	3+ +	8
73	2004	53	2	pT1b pN0 pMx	12	2	0 -	9
74	2005	66	2	pT2 pN0 (sn) pMx	12	1	0 -	12
75	2005	51	2	pT2 pN3b pMx	0	0	3+ +	12
76	2004	65	2	pT1c pN0 pM0	12	0	0 -	12
77	2004	35	3	mpT2 pN1a pMx	4	6	0 -	12
78	2004	47	3	pT2(m) pN2a pMx	0	6	3+ +	12
79	2004	77	3	pT4b pN2a pMx	9	9	0 -	12
80	2000	69	2	pT2 pN1biii pM1	0	1	3+ +	12
81	2000	65	3	pT4b pN1biv pM0	12	12	0 -	12
82	2005	56	2	pT4b pN1a pMx L1 V1	9	0	2+ +	12
83	2005	71	3	pT2 pN2a Mx	0	0	3+ +	12

6.2 Ductale Carcinomata in situ (DCIS)

Nr.	OP-Jahr	Alter in Jahren	Grading	Staging	ÖIRS	PIRS	HeER-2/neu Score / Status	LASP-1 IRS
1	2005	62			12	6		0
2	2005	44			1	1		0
3	2005	36			0	2	3+ +	0
4	2005	69		pTis	6	4	3+ +	0
5	2005	61	3	pTis	12	12	0 -	0
6	2005	36			0	0		1
7	2005	61	3	pTis	4	4	3+ +	1
8	2005	61			12	12		2
9	2005	60		pTis	12	9	0 -	2
10	2005	47			9	12	1+ -	2
11	2005	51		pTis	12	9	1+ -	3
12	2005	58			12	2		3
13	2005	81			0	0	3+ +	3
14	2005	32	1	pT1b	8	2	0 -	3
15	2005	74			12	9	0 -	3
16	2005	47		pTis				4
17	2005	46			8	9	3+ +	4
18	2005	44						6
19	2005	60						6
20	2005	71						6
21	2003	56						6
22	2005	34		pTis				8
23	2005	54	1	pT1c	12	9	0 -	8
24	2005	50			9	4		8
25	2003	64						8

6.3 Fibroadenome

Nr.	OP-Jahr	Alter in Jahren	LASP-1 IRS
1	2005	57	0
2	2005	67	0
3	2005	29	1
4	2005	40	1
5	2005	19	2
6	2005	16	2
7	2005	52	2
8	2005	35	2
9	2005	66	3
10	2005	36	3
11	2005	38	3

6. Appendix: Rohdaten der Patientenstudie

12	2005	22	3
13	2003	39	4
14	2003	44	4
15	2005	38	6
16	2005	51	6
17	2003	30	6
18	2005	44	8

7. Literaturverzeichnis

1. Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, Flanders WD, Timmel MJ, Tong T: **The lifetime risk of developing breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 1993, **85**:892-897.
2. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ: **Cancer statistics, 2005.** *CA Cancer J Clin* 2005, **55**:10-30.
3. Parkin DM: **Global cancer statistics in the year 2000.** *Lancet Oncol* 2001, **2**:533-543.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.** *Int J Cancer* 2001, **94**:153-156.
5. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC: **Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology.** *Endocr Rev* 2001, **22**:255-288.
6. Quirk JT, Natarajan N: **Ovarian cancer incidence in the United States, 1992-1999.** *Gynecol Oncol* 2005, **97**:519-523.
7. Osborne CK: **Tamoxifen in the treatment of breast cancer.** *N Engl J Med* 1998, **339**:1609-1618.
8. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU: **Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 1996, **14**:2197-2205.
9. Legge F, Ferrandina G, Salutari V, Scambia G: **Biological characterization of ovarian cancer: prognostic and therapeutic implications.** *Ann Oncol* 2005, **16 Suppl 4**:iv95-iv101.
10. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ: **The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy.** *Oncologist* 2003, **8**:307-325.
11. Mauriac L, Debled M, MacGrogan G: **When will more useful predictive factors be ready for use?** *Breast* 2005, **14**:617-623.
12. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, et al: **Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**:1117-1130.
13. Tomasetto C, Moog-Lutz C, Regnier CH, Schreiber V, Basset P, Rio MC: **Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains.** *FEBS Lett* 1995, **373**:245-249.
14. Tomasetto C, Regnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, Lidereau R, Basset P, Rio MC: **Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17.** *Genomics* 1995, **28**:367-376.

15. Suchyta SP, Sipkovsky S, Halgren RG, Kruska R, Elftman M, Weber-Nielsen M, Vandehaar MJ, Xiao L, Tempelman RJ, Coussens PM: **Bovine mammary gene expression profiling using a cDNA microarray enhanced for mammary-specific transcripts.** *Physiol Genomics* 2003, **16**:8-18.
16. Schreiber V, Masson R, Linares JL, Mattei MG, Tomasetto C, Rio MC: **Chromosomal assignment and expression pattern of the murine *Lasp-1* gene.** *Gene* 1998, **207**:171-175.
17. Terasaki AG, Hiruta J, Suzuki J, Sakamoto S, Nishioka T, Suzuki H, Ohashi K, Azumi K, Ogasawara M: **A *lasp* family protein of *Ciona intestinalis*.** *Biochim Biophys Acta* 2007.
18. Butt E, Gambaryan S, Gottfert N, Galler A, Marcus K, Meyer HE: **Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146.** *J Biol Chem* 2003, **278**:15601-15607.
19. Chew CS, Chen X, Parente JA, Jr., Tarrer S, Okamoto C, Qin HY: ***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* 2002, **115**:4787-4799.
20. Keicher C, Gambaryan S, Schulze E, Marcus K, Meyer HE, Butt E: **Phosphorylation of mouse *LASP-1* on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **324**:308-316.
21. Schreiber V, Moog-Lutz C, Regnier CH, Chenard MP, Boeuf H, Vonesch JL, Tomasetto C, Rio MC: ***Lasp-1*, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions.** *Mol Med* 1998, **4**:675-687.
22. Chew CS, Parente JA, Jr., Chen X, Chaponnier C, Cameron RS: **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* 2000, **113 (Pt 11)**:2035-2045.
23. Chew CS, Parente JA, Jr., Zhou C, Baranco E, Chen X: ***Lasp-1* is a regulated phosphoprotein within the cAMP signaling pathway in the gastric parietal cell.** *Am J Physiol* 1998, **275**:C56-67.
24. Lin YH, Park ZY, Lin D, Brahmabhatt AA, Rio MC, Yates JR, 3rd, Klemke RL: **Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of *Lasp-1*.** *J Cell Biol* 2004, **165**:421-432.
25. Li K, Hornshaw MP, van Minnen J, Smalla KH, Gundelfinger ED, Smit AB: **Organelle proteomics of rat synaptic proteins: correlation-profiling by isotope-coded affinity tagging in conjunction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to reveal post-synaptic density specific proteins.** *J Proteome Res* 2005, **4**:725-733.
26. Phillips GR, Anderson TR, Florens L, Gudas C, Magda G, Yates JR, 3rd, Colman DR: **Actin-binding proteins in a postsynaptic preparation: *Lasp-1* is a component of central nervous system synapses and dendritic spines.** *J Neurosci Res* 2004, **78**:38-48.

27. Nakagawa H, Terasaki AG, Suzuki H, Ohashi K, Miyamoto S: **Short-term retention of actin filament binding proteins on lamellipodial actin bundles.** *FEBS Lett* 2006, **580**:3223-3228.
28. Li B, Zhuang L, Trueb B: **Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1.** *J Biol Chem* 2004, **279**:20401-20410.
29. Rachlin AS, Otey CA: **Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin.** *J Cell Sci* 2006, **119**:995-1004.
30. Haag M: **Interaktionspartner von Pro-Interleukin-16.** PhD-Thesis, FU-Berlin, Faculty of Biology; 2007.
31. Okamoto CT, Li R, Zhang Z, Jeng YY, Chew CS: **Regulation of protein and vesicle trafficking at the apical membrane of epithelial cells.** *J Control Release* 2002, **78**:35-41.
32. Spence HJ, McGarry L, Chew CS, Carragher NO, Scott-Carragher LA, Yuan Z, Croft DR, Olson MF, Frame M, Ozanne BW: **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* 2006, **26**:1480-1495.
33. Hammarstrom A, Berndt KD, Sillard R, Adermann K, Otting G: **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* 1996, **35**:12723-12732.
34. Bach I: **The LIM domain: regulation by association.** *Mech Dev* 2000, **91**:5-17.
35. Dawid IB, Breen JJ, Toyama R: **LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions.** *Trends Genet* 1998, **14**:156-162.
36. Jumaa H, Hendriks RW, Reth M: **B cell signaling and tumorigenesis.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:415-445.
37. Wilson KC, Center DM, Cruikshank WW: **The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth.** *Growth Factors* 2004, **22**:97-104.
38. Dalton LW, Pinder SE, Elston CE, Ellis IO, Page DL, Dupont WD, Blamey RW: **Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement.** *Mod Pathol* 2000, **13**:730-735.
39. Singletary SE, Connolly JL: **Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual.** *CA Cancer J Clin* 2006, **56**:37-47; quiz 50-31.
40. Baddoura FK, Cohen C, Unger ER, DeRose PB, Chenggis M: **Image analysis for quantitation of estrogen receptor in formalin-fixed paraffin-embedded sections of breast carcinoma.** *Mod Pathol* 1991, **4**:91-95.
41. Novina CD, Sharp PA: **The RNAi revolution.** *Nature* 2004, **430**:161-164.

42. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
43. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**:4350-4354.
44. Green DR: **Apoptotic pathways: ten minutes to dead.** *Cell* 2005, **121**:671-674.
45. Shi Y: **Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis.** *Mol Cell* 2002, **9**:459-470.
46. Bechtold A, Friedl R, Kalb R, Gottwald B, Neveling K, Gavvovidis I, Herterich S, Schindler D, Hoehn H: **Prenatal exclusion/confirmation of Fanconi anemia via flow cytometry: a pilot study.** *Fetal Diagn Ther* 2006, **21**:118-124.
47. Rottner K, Krause M, Gimona M, Small JV, Wehland J: **Zyxin is not colocalized with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) at lamellipodial tips and exhibits different dynamics to vinculin, paxillin, and VASP in focal adhesions.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:3103-3113.
48. Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW: **An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2007.
49. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ: **Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005.** *Ann Oncol* 2005, **16**:1569-1583.
50. Remmele W, Stegner HE: **[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue].** *Pathologe* 1987, **8**:138-140.
51. Reinhard M, Jarchau T, Walter U: **Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**:243-249.
52. Liu CR, Ma CS, Ning JY, You JF, Liao SL, Zheng J: **Differential thymosin beta 10 expression levels and actin filament organization in tumor cell lines with different metastatic potential.** *Chin Med J (Engl)* 2004, **117**:213-218.
53. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR: **Cell migration: integrating signals from front to back.** *Science* 2003, **302**:1704-1709.
54. Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S: **A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites.** *J Cell Sci* 1992, **103 (Pt 1)**:131-143.
55. Chen Z, Fadiel A, Feng Y, Ohtani K, Rutherford T, Naftolin F: **Ovarian epithelial carcinoma tyrosine phosphorylation, cell proliferation, and ezrin translocation are stimulated by interleukin 1alpha and epidermal growth factor.** *Cancer* 2001, **92**:3068-3075.
56. Di Modugno F, Mottolese M, Di Benedetto A, Conidi A, Novelli F, Perracchio L, Venturo I, Botti C, Jager E, Santoni A, et al: **The cytoskeleton regulatory protein hMena (ENAH) is overexpressed in**

- human benign breast lesions with high risk of transformation and human epidermal growth factor receptor-2-positive/hormonal receptor-negative tumors. *Clin Cancer Res* 2006, **12**:1470-1478.
57. Strehl S, Konig M, Meyer C, Schneider B, Harbott J, Jager U, von Bergh AR, Loncarevic IF, Jarosova M, Schmidt HH, et al: **Molecular dissection of t(11;17) in acute myeloid leukemia reveals a variety of gene fusions with heterogeneous fusion transcripts and multiple splice variants.** *Genes Chromosomes Cancer* 2006, **45**:1041-1049.
58. Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ: **Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells.** *Oncogene* 2002, **21**:8196-8205.
59. Wang Y, Tetko IV, Hall MA, Frank E, Facius A, Mayer KF, Mewes HW: **Gene selection from microarray data for cancer classification--a machine learning approach.** *Comput Biol Chem* 2005, **29**:37-46.
60. Beckerle MC: **Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion.** *Bioessays* 1997, **19**:949-957.
61. Griffith E, Coutts AS, Black DM: **RNAi knockdown of the focal adhesion protein TES reveals its role in actin stress fibre organisation.** *Cell Motil Cytoskeleton* 2005, **60**:140-152.
62. Cattaruzza M, Lattrich C, Hecker M: **Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells.** *Hypertension* 2004, **43**:726-730.
63. Hoffman LM, Jensen CC, Kloeker S, Wang CL, Yoshigi M, Beckerle MC: **Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling.** *J Cell Biol* 2006, **172**:771-782.
64. Drees BE, Andrews KM, Beckerle MC: **Molecular dissection of zyxin function reveals its involvement in cell motility.** *J Cell Biol* 1999, **147**:1549-1560.
65. Kanungo J, Pratt SJ, Marie H, Longmore GD: **Ajuba, a cytosolic LIM protein, shuttles into the nucleus and affects embryonal cell proliferation and fate decisions.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:3299-3313.
66. Kadrmaz JL, Beckerle MC: **The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:920-931.
67. Nix DA, Fradelizi J, Bockholt S, Menichi B, Louvard D, Friederich E, Beckerle MC: **Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus.** *J Biol Chem* 2001, **276**:34759-34767.
68. Wang Y, Gilmore TD: **Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1593**:115-120.
69. Hirota T, Morisaki T, Nishiyama Y, Marumoto T, Tada K, Hara T, Masuko N, Inagaki M, Hatakeyama K, Saya H: **Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor.** *J Cell Biol* 2000, **149**:1073-1086.
70. Iida S, Hirota T, Morisaki T, Marumoto T, Hara T, Kuninaka S, Honda S, Kosai K, Kawasuji M, Pallas DC, Saya H: **Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression**

- and G1 tetraploidy checkpoint function.** *Oncogene* 2004, **23**:5266-5274.
71. Murray AW: **Recycling the cell cycle: cyclins revisited.** *Cell* 2004, **116**:221-234.
72. Amsellem V, Kryszke MH, Hervy M, Subra F, Athman R, Leh H, Brachet-Ducos C, Auclair C: **The actin cytoskeleton-associated protein zyxin acts as a tumor suppressor in Ewing tumor cells.** *Exp Cell Res* 2005, **304**:443-456.
73. Cserni G: **Evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer.** *Histopathology* 2005, **46**:697-702.
74. Grunewald TG, Kammerer U, Schulze E, Schindler D, Honig A, Zimmer M, Butt E: **Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells.** *Exp Cell Res* 2006, **312**:974-982.
75. Grunewald TG, Kammerer U, Winkler C, Schindler D, Sickmann A, Honig A, Butt E: **Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation.** *Br J Cancer* 2007, **96**:296-305.
76. Grunewald TG, Kammerer U, Kapp M, Eck M, Dietl J, Butt E, Honig A: **Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma.** *BMC Cancer* 2007, **7**:198.

Danksagung

Für ihre sehr hilfreiche und sachkundige Beratung bei meiner Labortätigkeit im experimentellen Teil dieser Arbeit möchte ich an dieser Stelle meiner Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Elke Butt-Dörje (akademische Oberrätin im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg) ganz herzlich danken. Für die große Unterstützung meiner Patientenstudie und die statistische Validierung der erhobenen Daten danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. hum. biol. Ulrike Kämmerer (Leiterin des Forschungslabors der Universitäts-Frauenklinik Würzburg).

Herrn Prof. Dr. med. Detlev Schindler (Institut für Humangenetik der Universität Würzburg) danke ich für seine Hilfe bei den durchflusszytometrischen Analysen und die Bereitstellung der entsprechenden Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Eck (Institut für Pathologie der Universität Würzburg) möchte ich für seine intensive Beratung bei der Entwicklung des LASP-1-IRS und seiner Unterstützung bei histopathologischen Fragestellungen danken.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Walter (Direktor des Instituts für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg) danke ich sehr für die freundliche Überlassung dieser Doktorarbeit, seine großzügige finanzielle Förderung meiner Promotionstätigkeit und für seine gutachterliche Stellungnahme. Herrn Prof. Dr. med. Johannes Dietl (Direktor der Universitäts-Frauenklinik und Hebammenschule Würzburg) möchte ich ebenfalls für seine gutachterliche Stellungnahme danken.

Besonderer Dank gilt Frau cand. med. Barbara Lechner, Herrn cand. med. Veit Buchholz und meiner Schwester, Frau stud. biol. Martina Grünewald, für die Korrektur dieser Dissertation und für ihre wertvollen Hinweise. Ich danke auch den technischen Assistentinnen Frau Elfriede Schulze und Frau Michaela Kapp für ihre zuverlässige Unterstützung.

Curriculum vitae

Thomas Georg Philipp Grünewald, geb. am 27.04.1980 in Starnberg

Schule

- 09/1986 – 07/1990 **Grundschule Peiting in Oberbayern**
09/1990 – 07/1999 **Welfen-Gymnasium Schongau in Obb.** Latinum und Abitur 1999

Zivildienst

- 09/1999 – 07/2000 **AWO Senioren- und Pflegeheim, Peiting in Oberbayern**

Studium

- 11/2000 – 11/2007 **Studium der Humanmedizin und Philosophie**
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 03/2003 **Physikum (ärztliche Vorprüfung)** Note: sehr gut
- 08/2003 – 10/2006 **Famulaturen und klinische Praktika**
The Nippon Dental University of Niigata/Japan
Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin
The Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania/USA
Royal Hallamshire Hospital, University of Sheffield/England
Praxis für Pädiatrie Drs. Sack, Glotzbach, Kozuschek, Würzburg
Praxis für Kinderchirurgie Dr. H. Hesse, Hamburg
- 04/2006 **akademische Zwischenprüfung (Philosophie)** Note: sehr gut
- 08/2006 – 07/2007 **Praktisches Jahr mit Wahlfach Pädiatrie**
Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires/Argentinien
Universitäts-Kinderklinik Würzburg
Freeman Hospital, University of Newcastle upon Tyne/England
- 11/2007 **Staatsexamen Humanmedizin** Note: sehr gut

Förderung

- 08/2002 – 11/2007 **Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes e.V.**
- 08/2003 – 09/2003 **Sommerakademie der Studienstiftung in Salem**
Thema: „Vom Genom über die Sequenz zur Struktur“
- 07/2004 – 12/2004 **Stipendium zur Förderung der wissenschaftlichen Ausbildung**
Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie, Univ. Würzburg
- 09/2004 **Sommerakademie der Studienstiftung in Görlitz**
Thema: „Das Groteske/Die Groteske in Kunst und Literatur“
- 03/2006 – 04/2006 **Sprachstipendium der Studienstiftung in Málaga/Spanien**

Publikationsliste

Originalarbeiten

1. **Grunewald TG**, Kammerer U, Schulze E, Schindler D, Honig A, Zimmer M, Butt E „Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells“
Experimental Cell Research 2006 312; 974 - 982
2. **Grunewald TG**, Kammerer U, Winkler C, Schindler D, Sickmann A, Honig A, Butt E „Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation“
British Journal of Cancer 2007 96(2); 296 - 305
3. **Grunewald TG**, Kammerer U, Kapp M, Eck M, Dietl J, Butt E, Honig A „Nuclear and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates in vivo with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma“
BMC Cancer 2007 7:198
4. Engel JB, Honig A, Schonhals T, Weidler C, Hausler S, Krockenberger M, **Grunewald TG**, Rieger L, Dietl L, Wischhusen J
„Perifosine inhibits experimental human endometrial cancers by inhibition of AKT“
European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2008 Aug 5

Übersichtsarbeiten

1. **Grunewald TG**, Butt E
„The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both?“
Molecular Cancer 2008, 7:31.

Kongressbeiträge

1. Honig A, **Grunewald TG**, Butt E, Dietl J, Kammerer U
Poster: „Herunterregulation von LASP-1 beeinflusst die Zyxin Lokalisation, hemmt die Proliferation und reduziert die Migration von Brustkrebszellen“
19. Akademische Tagung deutschsprachender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Basel/Schweiz 10/2005
2. **Grunewald TG**, Kammerer U, Schulze E, Schindler D, Honig A, Zimmer M, Butt E
Poster: „silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells“
13th European Cancer Conference (ECCO 13), Paris/Frankreich 11/2005
3. **Grunewald TG**
Präsentation (1. Preis): „LASP-1 ist in humanen Mammakarzinomzellen überexprimiert und moduliert deren Proliferation und Migration“
7. Promomed-Kongress der Universität Würzburg 11/2005
4. Engel JB, Rieger L, Weidler C, Hausler S, Krockenberger M, **Grunewald TG**, Wischhusen J, Dietl J, Honig A
Poster: „Das Alkylphospholipidanalogon Perifosin in Kombination mit Cisplatin und Paclitaxel in humanen Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen“
123. Tagung Norddeutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG), Göttingen 09/2007

5. Honig A, **Grunewald TG**, Kammerer U, Kapp M, Eck M, Butt E, Dietl J
Poster: „Die nukleäre Lokalisation und zytosolische Überexpression von LASP-1 korreliert in vivo mit Tumorgröße und Nodalpositivität in humanen Mammakarzinomen“
20. Akademische Tagung deutschsprachender Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Lübeck 09/2007

6. **Grunewald TG**, Mayr J, Rolinski B, Sperl W, Wössner R, Pasedag SM, Freisinger P
Poster: „Therapie eines weiblichen Neugeborenen mittels ketogener Diät bei heterozygotem Pyruvatdehydrogenasedefekt, verursacht durch eine bis dato unbekannte Punktmutation - ein Fallbericht“
104. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin, 09/2008 München