# IDENTIFIKATION VON ZONULA OCCLUDENS 2 (ZO-2) ALS NEUEN LASP-1 INTERAKTIONSPARTNER UND AUFKLÄRUNG DER LASP-1/ZO-2 KERN-ZYTOSOL TRANSLOKATION

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Julius-Maximilians Universität Würzburg

Vorgelegt von

Sabrina Mihlan geb. Jasper Geboren am 09.11.1983 in Magdeburg

Würzburg 2012

Eingereicht a	am	 	 	
Lingereient	um	 	 	

Mitglieder der Promotionskommission Vorsitzender: Gutachter: Prof. Dr. Elke Butt-Dörje Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar Tag des Promotionskolloquiums:.....

## INHALT

1	Zus	samı	menfassung	4
	1.1	Deu	utsch	4
	1.2	Eng	glish	6
2	Ein	leitu	ng	7
	2.1	Stru	uktur und Bedeutung von LASP-1	7
	2.2	Fur	ktion und Lokalisation von LASP-1	9
	2.3	LAS	SP-1 Lokalisation im Zellkern	12
	2.4	LAS	SP-1 Bindungspartner	14
	2.5	Ziel	setzung	16
3	Ma	teria	I und Methoden	17
	3.1	Mat	terial	17
	3.1	.1	Kulturzellen	17
	3.1	.2	Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur	17
	3.1	.3	Primer	17
	3.1	.4	Antikörper für die Western Blot Analyse	18
	3.1	.5	Antikörper für die Immunfluoreszenz und Duolink	19
	3.1	.6	Antikörper für Immunpräzipitationen	20
	3.1	.7	Reaktionskits	21
	3.1	.8	Chemikalien und Reagenzien	21
	3.1	.9	Puffer und Lösungen	23
	3.1	.10	Verbrauchsmaterialien	26
	3.1	.11	Geräte und Software	27
	3.2	Met	hoden	30
	3.2	.1	Zellkulturbedingungen	30
	3.2	.2	Zellkern und Zytoplasmaauftrennung	30
	3.2	.3	Zell- Transfektion	30
	3.2	.4	Stimulation von Zellen mit Forskolin und Leptomycin B	31
	3.2	.5	Expression und Aufreinigung von GST Fusionsproteinen	31
	3.2	.6	Pulldown Experimente	32

	3.2.7	Ko-Immunpräzipitation	33
	3.2.8	Denaturierende Gelelektrophorese	. 34
	3.2.9	Western Blot	. 34
	3.2.10	Immunfluoreszenz	. 34
	3.2.11	Duolink® und Konfokale Mikroskopie	35
	3.2.12	Plasmid Präparation	36
	3.2.13	Agarose-Gelelektrophorese	37
	3.2.14	Transformation von kompetenten <i>E-coli</i> Stämmen	37
	3.2.15	Sequenzierung	. 37
	3.2.16	Einfügen einer Punktmutation mit dem QuickChange Site-direc	ted
	Mutage	enese Kit	. 38
	3.2.17	Generierung von stabil-transfizierten und induzierbaren Zo	0-2
	Knock	down Zellen	. 39
	3.2.18	Proliferationsassay	. 41
4	Ergebr	nisse	42
	4.1 Ph	osphorylierungs-abhängiger Zellkernimport von LASP-1	42
	4.2 LA	SP-1 enthält ein NES Signal	43
	4.3 Ide	ntifizierung von neuen LASP-1 Bindungspartnern	46
	4.4 Ve	rifizierung des neu identifizierten möglichen LASP-1 Bindungspartn	ers
	ZO-2 und	der LASP-1 Interaktionsdomäne	47
	4.5 Ide	ntifizierung der LASP-1 Interaktionsstelle in der ZO-2 Sequenz	50
	4.6 Ein	fluss der Ser-146 Phosphorylierung auf die Bindung von LPP, Zyxin u	und
	ZO-2		52
	4.7 Lol	calisation von ZO-2 in LASP-1 Knockout Zellen	53
	4.8 Lol	alisation von LASP-1 in MDA-MB231 Zellen mit stabilem Zo	O-2
	Knockdo	wn	54
	4.9 Pro	oliferationsverhalten von MDA-MB231 Zellen mit stabilem Ze	0-2
	Knockdo	wn	56
	4.10 N	Jachweis der direkten Bindung von ZO-2 und LASP-1 im Zellkern	57
5	Diskus	sion	61
	5.1 LA	SP-1 enthält ein NES Signal	61
	5.2 De	r LASP-1 Zellkernimport ist Phosphorylierungs-abhängig	61

5	5.3	Der neue LASP-1 Bindungspartner ZO-2 62				
5	5.4	Identifikation der Bindungsstellen zwischen LASP-1 und ZO-2 64				
5	5.5	Lokalisation von LASP-1 und ZO-2 in Knockout Zellen	. 65			
5	5.6	Einfluss der Ser-146 Phosphorylierung auf das Bindungsverhalten	von			
L	AS	P-1	. 67			
5	5.7	ZO-2 und LASP-1 interagieren im Zellkern	. 68			
5	5.8	Ausblick	. 70			
6	Lit	eraturverzeichnis	. 74			
7	Ab	okürzungsverzeichnis	. 80			
8	Ρι	ıblikationen	. 82			
ε	3.1	Präsentationen	. 82			
ε	8.2	Publikationen	. 82			
9	Da	anksagung	. 83			
10	E	Erklärung	. 85			

### 1 ZUSAMMENFASSUNG

#### 1.1 Deutsch

LASP-1 (LIM und SH3 Domänen Protein) ist ein in Zellen ubiquitär vorkommendes Protein, welches in verschiedenen Tumorgeweben eine pathophysiologische Überexpression aufweist.

Das Protein besitzt eine LIM Domäne, zwei Aktinbindungsregionen sowie eine SH3 Domäne und bindet einerseits an dynamischen Aktinstrukturen wie den fokalen Kontakten, Lamellopodien und Membranfortsätzen, kann andererseits aber auch in den Zellkern translokalisieren. Für Aktinstrukturen wirkt LASP-1 als Gerüstprotein und ist wichtig für die Migration und Proliferation der Zellen. Die Funktion von LASP-1 im Zellkern ist noch nicht bekannt, da aber in Tumorzellen eine erhöhte nukleare Akkumulation von LASP-1 beobachtet werden konnte, deren Intensität mit der Tumorgröße sowie dem Langzeitüberleben der Patientinnen korreliert, ist LASP-1, zusätzlich zu Funktion als Strukturprotein, vermutlich seiner auch ein Transkriptionsfaktor oder ein transkriptioneller Kofaktor. Eine Herunterregulation von LASP-1 in verschiedenen Tumorentitäten führt zur Inhibition der Proliferation und Migration.

In dieser Arbeit konnte der bisher unbekannte Zellkernimport und -export von LASP-1 aufgeklärt werden. Maßgeblich daran beteiligt ist ein durch Pulldown Experimente neu identifizierter LASP-1 Bindungspartner: das Zonula Occludens 2 Protein (ZO-2). Mittels Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenzen wurde diese Interaktion bestätigt.

Nach Phosphorylierung von LASP-1 an Ser-146 durch Aktivierung der cAMPabhängigen Proteinkinase (PKA) kommt es zu einer partiellen Ablösung des LASP-1/ZO-2 Komplexes aus den fokalen Kontakten hin zu einer vermehrten Kernlokalisation beider Proteine. Dies lässt sich durch Kern/Zytosol Trennungen belegen. Dabei ist die Bindung von LASP-1 an ZO-2 essentiell für die Translokation in den Zellkern, da bei einem ZO-2 Knockdown auch nach PKA Aktivierung LASP-1 zytosolisch lokalisiert bleibt. Wie Mutationsanalysen zeigen, findet die Interaktion zwischen der C-terminalen SH3 Domäne im LASP-1 und der Prolin-reichen SH3-Bindungssequenz im Bereich der Aminosäuren 1103-1121 am C-Terminus im ZO-2 statt. Die Translokation des Komplexes in den Kern erfolgt dabei über das Kernlokalisationssignal im ZO-2, da die LASP-1 Sequenz selbst keine nukleare Importsequenz aufweist. Im Zellkern konnte die direkte Interaktion von LASP-1 und ZO-2 mittels Duolink® Proximity Ligation Assay sichtbar gemacht werden. Der Export der Proteine erfolgt über das Protein CRM1. Eine Inhibition der Kernexportmaschinerie mit Leptomycin B erhöht die Konzentration beider Proteine im Zellkern. Das nukleare Exportsignal (NES) im LASP-1 konnte durch Punktmutationen N-terminal der Leucin-reichen Aminosäuresequenz 70-77 zugeordnet werden (NLRLKQQS). Im letzten Schritt dieses Zyklus erfolgt die Relokalisation von LASP-1 zurück an die Zellmembranstrukturen.

Der neu gefundene Signalweg dient wahrscheinlich zur Weiterleitung von externen Stimuli in den Kern und zur Genregulation - mit LASP-1 als Transkriptionsfaktor oder transkriptionellen Kofaktor.

### 1.2 English

cytoplasmic shuttling was established.

LASP-1 (LIM and SH3 protein) is ubiquitously expressed at basal levels, but was found to be pathophysiologically overexpressed in several cancer entities.

LASP-1 exhibits one LIM domain, two actin binding domains and one SH3 domain. On the one hand, LASP-1 is predominantly localized at focal contacts, lamellopodia and membrane ruffles, on the other hand a nuclear localization is observed. LASP-1 works as actin-binding scaffolding protein and is essential for migration and proliferation. Silencing of LASP-1 by RNA- interference in various cancer cell lines results in a strong inhibition of proliferation and migration. However, in tumor cells, an additional striking nuclear localization of the protein was observed, which significantly correlates with tumor size and a poor long term survival of the patients. Therefore, LASP-1 might act additionally as transcription factor or transcriptional co-factor In this work, a novel LASP-1 binding partner, zonula occludens protein 2 (ZO-2), was identified and its role in the signal transduction pathway of LASP-1 nucleo-

Upon LASP-1 phosphorylation at Ser-146 by activated cAMP-dependent protein kinase A (PKA), LASP-1 binding to Zyxin and F-actin decreases and the protein detaches, in complex with ZO-2, from the plasma membrane and translocates into the nucleus. These results were confirmed by nuclear and cytosolic separation assays. Pull-down assays with mutants revealed that ZO-2 binds with its proline-rich sequence (amino acids 1103-1121) to the SH3 domain in LASP-1. LASP-1 exhibits no nuclear localization signal and requires ZO-2 to shuttle into the nucleus. In situ proximity ligation assay confirmed the direct binding between LASP-1 and ZO-2 and visualized the shuttling. Inhibition of the nuclear export system by Leptomycin B results in an accumulation of both proteins in nuclei. Nuclear export is regulated by the newly identified nuclear export signal in LASP-1 (amino acids 70-77) and mediated by CRM1. Finally LASP-1 relocalizes to focal contacts.

This new identified pathway serves presumably as a signal transductor from the focal contacts to the nucleus for gene regulation.

### 2 EINLEITUNG

### 2.1 Struktur und Bedeutung von LASP-1

Brustkrebs ist in Deutschland die häufigste bösartige Erkrankung bei Frauen und führt die weibliche Krebstodesstatistik an, auch wenn die Überlebensrate seit den 1990er Jahren kontinuierlich ansteigt. Gegenwärtig können vor allem die Metastasen, die schon von kleinen und gut abgetrennten Primärtumoren gebildet werden, durch Operationen und Bestrahlung nicht immer abgetötet werden. Daher ist es nötig, interdisziplinäre Behandlungsweisen und neue Ansätze für diese vielschichtige Krebsart zu finden, um die Heilungsraten noch weiter zu verbessern (Esteva and Hortobagyi 2009). Ein vielversprechender Kandidat, der als neuer Angriffspunkt für Behandlungen dienen könnte, ist das Protein LASP-1.

Das LIM und SH3 Domänen Protein LASP-1 (früher MLN50) wurde 1995 in einer cDNA Bibliothek für Brustkrebsmetastasen identifiziert. Das zugehörige Gen wurde auf Chromosom 17g21 lokalisiert, eine Region, die bei 20 - 30 % der Brustkrebspatienten mutiert ist und in der sich unter anderem auch das BRCA1 Onkogen befindet (Tomasetto, Moog-Lutz et al. 1995; Tomasetto, Regnier et al. 1995). LASP-1 ist ubiquitär in geringen Konzentrationen in menschlichen Geweben verbreitet (Grunewald and Butt 2008), zeigt jedoch in einigen verschiedenen Tumorgeweben eine hohe Überexpression. So ist LASP-1 in metastasierendem Brustkrebs (Grunewald, Kammerer et al. 2006), Ovarialkarzinomen (Grunewald, Kammerer et al. 2007), Dickdarmkrebs (Zhao, Wang et al. 2010), in verschiedenen Formen von Leukämien (Suzuki, Tazoe et al. 2006), im Wilms Tumor in der Niere (Viney, Morrison et al. 2007), in Prostatakrebs (Li, Szabolcs et al. 2006), in Blasenkrebs (Chiyomaru, Enokida et al. 2010), im Urothelkarzinom und in Medulloblastomen (Traenka, Remke et al. 2010; Ardelt, Gruenemay et al. 2012) überexprimiert. Auch in schnell proliferierenden Zellen wie in Lymphozyten und Leukozyten sowie während der frühen Embryogenese und im zentralen Nervensystem ist LASP-1 hoch exprimiert (Phillips, Anderson et al. 2004; Grunewald and Butt 2008). Die pathophysiologische Wirkung der LASP-1 Überexpression konnte in einer Brustkrebs-Studie belegt werden. Dabei wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der LASP-1 Expression und der Tumorgröße sowie dem Nodalstatus der Patientinnen festgestellt (Grunewald, Kammerer et al. 2007).

LASP-1 besteht aus vier verschiedenen Domänen mit unterschiedlichen Funktionen (Abbildung 2.1). Am Aminoterminus befindet sich eine LIM Domäne, bestehend aus 8 Histidin- und 2 Cysteinresten. Für diese Protein-Protein- Interaktionsdomäne konnte bislang eine Bindung an den Chemokinrezeptor CXCR2 nachgewiesen werden. Dabei bindet LASP-1 an die C- terminale Domäne (CTD) von CXCR2 und erwies sich als Schlüsselkomponente der CXCR2 Chemosynapse. Die Bindung von LASP-1 an CXCR2 beeinflusst entscheidend die Zellbeweglichkeit und den Aufbau der fokalen Kontakte (Raman, Sai et al. 2010). Aufgrund der LIM Domäne gehört LASP-1 zur Familie der LIM-Domänen-Proteine. Mitglieder dieser Familie sind an der Zytoskelettorganisation, der Regulation der Genexpression sowie an der Signaltransduktion beteiligt (Zheng and Zhao 2007). LIM Proteine mit mehreren LIM Domänen pendeln zwischen dem Zytosol und dem Nukleus oder sind nur nuklear lokalisiert. Auch LASP-1 lässt sich im Zellkern nachweisen. Da LASP-1 nur über eine LIM Domäne verfügt und auch nicht intramolekular dimerisiert, muss es über einen anderen Weg in den Zellkern gelangen (Keicher, Gambaryan et al. 2004). Obwohl LIM-Domänen mit ihrer Zinkfingerstruktur als DNA-Bindedomänen bekannt sind, gibt es bisher keinen Nachweis eines LIM-Proteins, das direkt an die DNA bindet. Anscheinend regulieren LIM-Proteine Transkriptionsfaktoren durch Bindung an diese (Bach 2000; Kadrmas and Beckerle 2004). Ganz ausschließen lässt sich die Bindung von LASP-1 an die DNA jedoch nicht, da in vitro Studien nachgewiesen haben, dass es eine unspezifische Bindung von LIM-Domänen an die DNA geben kann (Hammarstrom, Berndt et al. 1996; Nishiya, Sabe et al. 1998).

Mit seinen zwei Nebulin Wiederholungen, R1 und R2, bindet LASP-1 an F-Aktin und am Kelch related protein 1 (Krp 1) (Schreiber, Moog-Lutz et al. 1998; Butt, Gambaryan et al. 2003). Krp 1 wiederum bindet an die fokalen Kontakte von Zellen und ist an der Zellmigration sowie am Pseudopodienwachstum beteiligt (Spence, McGarry et al. 2006).

Den Nebulin Wiederholungen folgt eine Linker Region, in der zwei spezifische Phosphorylierungsstellen liegen, Serin 146 und Tyrosin 171. Phosphorylierungen an diesen Stellen können die Funktion und Lokalisation von LASP-1 regulieren. So wird Serin 146 von der cAMP- und cGMP– abhängigen Proteinkinase (PKA und PKG) phosphoryliert, was in einer reduzierten Bindung von LASP-1 an F-Aktin, einer erhöhten Translokation des Proteins ins Zytosol sowie einer verringerten

Zellmigration resultiert (Chew, Chen et al. 2002; Butt, Gambaryan et al. 2003). Die zweite Phosphorylierungsstelle am Tyrosin 171 wird von der Abelson Tyrosinkinase (Abl-Kinase) (Lin, Park et al. 2004) und der Src Kinase (Traenka, Hauck et al. 2009) phosphoryliert. Eine Aktivierung der Abl Kinase durch Apoptose-induzierende Reagenzien und die daraus resultierende Phosphorylierung von LASP-1 ist mit einem Verlust von LASP-1 an den fokalen Kontakten assoziiert (Lin, Park et al. 2004), während eine Phosphorylierung durch die Src Kinase bei der Aktivierung von Thrombozyten mit einer Translokation von LASP-1 an die fokalen Kontakte und einer Umorganisation des Zytoskeletts einhergeht (Traenka, Hauck et al. 2009).

Die am C-Terminus lokalisierte SH3 Domäne besteht aus einer konservierten Sequenz von 60 Aminosäuren. Es handelt sich um eine Protein-Protein Interaktionsdomäne, mit der LASP-1 an prolinreiche Sequenzen andere Proteine, wie zum Beispiel Palladin, LIM-containig lipoma preferred partner (LPP), vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) und Zyxin bindet (Keicher, Gambaryan et al. 2004; Li, Zhuang et al. 2004; Rachlin and Otey 2006).



**Abbildung 2-1 Domänenstruktur und Bindungspartner von LASP-1.** Schematisch dargestellt sind die LASP-1 Domänen mit den von den Domänen erkannten Bindungspartnern (Krp1- kelch related protein, VASP- vasodilator stimulated phosphoprotein, LPP- lipoma preferred partner, Pro-II-16- Prointerleukin 16). Die Phosphorylierungsstellen sind durch pinke Boxen markiert.

## 2.2 Funktion und Lokalisation von LASP-1

LASP-1 ist hauptsächlich zytosolisch an Aktin-Strukturen wie den fokalen Kontakten, Lamellopodien und den Membranfortsätzen lokalisiert (Nakagawa, Terasaki et al. 2006), Bereiche die für die gerichtete Migration und Invasion in umliegende Gewebe zuständig sind. Durch die Bindung an seine Interaktionspartner wirkt LASP-1 als Gerüstprotein für Aktinstrukturen und vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkungen. Ein Ausschalten der pathophysiologischen LASP-1 Überexpression in verschiedenen Krebszelllinien durch RNA-Interferenz resultiert in einer starken Inhibition der Proliferation und Migration sowie einem Zellzyklus Arrest in der G<sub>2</sub>M Phase. In LASP-1 siRNA behandelten Brustkrebszellen ist eine signifikant erhöhte Akkumulation in der G<sub>2</sub>M Phase von LASP-1 im Zellkern zu beobachten, was auf eine Funktion von LASP-1 im Zellzyklus hinweist (Grunewald, Kammerer et al. 2007; Frietsch, Grunewald et al. 2010). Im Gegensatz dazu kommt es nach einer herbeigeführten Überexpression von LASP-1 in nicht-malignen Zellen zu einer erhöhten Proliferation, Zellmotilität und der Fähigkeit, Kolonien zu formen (Grunewald, Kammerer et al. 2007; Zhang, Chen et al. 2009).

Hudson et al. zeigen in einer Prostatakrebsstudie, dass LASP-1 von der MicroRNA miR-1 reguliert wird. miR-1 ist ein Tumorsupressor, welcher die Zellproliferation, Invasion, Fillopodienfomation und die Zytoskelettorganisation steuert. In gesunden Prostatazellen unterdrückt miR-1 die Transkription von LASP-1, indem es an dessen 3' UTR bindet. Hingegen ist in Prostatakrebszellen miR-1 stark unterexprimiert, was unter anderem zu einer deutlich erhöhten Transkription von LASP-1 führt und mit Fehlorganisation des Wachstums der Krebszellen einer einhergeht. Prostatakrebszellen, die mit miR-1 transfiziert wurden, zeigen eine deutliche Runterregulation von LASP-1, zusammen mit einer Reorganisation des Aktinfilamentnetzwerks, einer verringerten Zellmotilität und einer Relokalisation von LASP-1 aus dem Nukleus ins Zytosol. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von LASP-1 als mögliches Onkogen (Hudson, Yi et al. 2011).

Eine erhöhte LASP-1 Expression konnte auch mit einem Defekt des Tumorsupressors p53 in Zusammenhang gebracht werden. So wird die LASP-1 Expression in Leberkrebszellen durch Bindung von p53 im Promotorbereich des LASP-1 Gens unterdrückt. Häufig ist jedoch p53 in humanen Krebsarten mutiert, was zu einer Hochregulation von LASP-1 führt- zusammen mit einer erhöhten Zellmigration und Proliferation (Wang, Feng et al. 2009). Dies konnte für andere Krebszelllinien jedoch nicht bestätig werden (Frietsch, Grunewald et al. 2010).

Die Generierung einer LASP-1 negativen *Drosophila* Mutante zeigt, dass die Spermienentwicklung gestört und die Fliegen daher steril sind. Der Grund ist offenbar, dass LASP-1 negative Zellen nicht an der Membran der Hodenspitze binden können und dadurch das Proliferationszentrum in der apikalen Spitze der

10

Hoden fehllokalisiert ist. Außerdem ist die Bindung der Zystenzellen an den Spermatiden während der Spermiogenese gestört (Lee, Zhou et al. 2008). Auch in der Embryogenese von Drosophila wirkt LASP-1 mit. LASP-1 bindet an das für die Achsenbildung unerlässliche Protein Oskar und hilft, Oskar mit dem Aktin des posterioren Pols des Embryos zu verankern (Suyama, Jenny et al. 2009). Diese Beobachtungen unterstreichen die wichtige Rolle von LASP-1 bei der Aktinzytoskelettorganisation.

Eine physiologisch hohe LASP-1 Expression ist in HCl produzierenden Belegzellen der Magenschleimhaut zu beobachten. In den ruhenden Zellen liegt LASP-1 Aktingebunden in subzellularen Bereichen vor. Eine Histamin-induzierte Aktivierung der Zellen führt über die Aktivierung der PKA zur Phosphorylierung von LASP-1 an Serin 146. Dadurch verlagert sich LASP-1 an die Bereiche der aktiven HCl Sekretion. Es konnte beobachtet werden, dass die LASP-1 Phosphorylierung mit der HCl Sekretion korreliert und LASP-1 an der Regulation der HCl Sekretion beteiligt ist (Chew, Parente et al. 1998; Chew, Chen et al. 2008). In diesem Zusammenhang konnte auch eine Interaktion von LASP-1 mit der GTPase Dynamin nachgewiesen werden. Dynamin reguliert den Prozess der Fusion von HCl Vesikeln mit der Plasmamembran. LASP-1 gilt daher als Vermittler zwischen dem Aktinzytoskelett und dem Vesikeltransport (Okamoto, Li et al. 2002).

Um die Funktion von LASP-1 zu verstehen, wurden LASP-1 Knockout Mäuse generiert. Die Wundheilung und die Tumorbildung in den LASP-1<sup>-/-</sup> Mäusen erfolgen schneller als in den Kontrollgruppen. Interessanterweise zeigen aus den Knockout (KO) Mäusen isolierte MEFs (mouse embryonic fibroblasts) eine schnellere Migration und Proliferation als MEFs aus Wildtyp Mäusen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei siRNA Knockdowns von LASP-1 beobachtet wurden. Dort führt der Knockdown zu einer verminderten Migration und Proliferation der betroffenen Zellen. Möglicherweise kompensieren die Knockout Mäuse den kompletten LASP-1 Verlust und andere Proteine übernehmen die LASP-1 Aufgabe.

Es konnten in den KO-Zellen keine Unterschiede in dem Aufbau der fokalen Adhäsionen oder des F-Aktins gefunden werden. Auch die Lokalisation von Zyxin und LPP änderte sich nicht. Allerdings war die Expression von LPP zweifach erhöht, was auf einen regulatorischen Effekt von LASP-1 auf LPP hinweist (Zhang, Chen et al. 2009) Neben LASP-1 existiert auch das LASP-2 Protein, welches primär in Zellen des Zentralen Nervensystems exprimiert wird. Die beiden Proteine weisen eine hohe Homologie auf, nur in der Linker Region finden sich größere Unterschiede. Bei LASP-2 handelt es sich um eine Splice Variante des Nebulin Gens. LASP-2 hat eine LIM und SH3 Domäne sowie drei Nebulin Wiederholungen (Katoh 2003). Mit Hilfe der LIM Domäne und der ersten Nebulin Wiederholung bindet LASP-2 an Aktin (Nakagawa, Suzuki et al. 2009). Wie LASP-1 ist auch LASP-2 ubiquitär verbreitet und hauptsächlich an den fokalen Kontakten gebunden. Mit seiner SH3 Domäne bindet LASP-2 an Zyxin (Li, Zhuang et al. 2004). Auch eine Bindung an α-Aktinin konnte LASP-2 nachgewiesen werden (Zieseniss, Terasaki et al. 2008). Die Funktion von LASP-2 ist noch nicht bekannt, vermutlich spielt es auch eine Rolle in der Organisation des Aktinzytoskeletts und der fokalen Kontakte (Li, Zhuang et al. 2004). Weiterhin ist LASP-2 wichtig für die Zelladhäsion und das Spreading von Fibroblasten auf Fibronektin beschichteten Platten. Ob LASP-2 im Zellkern vorkommt, ist bisher nicht bekannt. Obwohl LASP-1 und LASP-2 eine ähnliche Struktur und damit auch eine ähnliche Verteilung in Zellen aufweisen, deuten die strukturellen Unterschiede darauf hin. dass auch unterschiedliche es Interaktionspartner und abweichende Funktionen geben kann (Deng, Norris et al.

2008).

Immunhistologische Schnitte und Western Blots von Kern- und Zytosolfraktionen verschiedener Zellen zeigten neben der zytoplasmatischen auch eine nukleäre Lokalisation von LASP-1. Vor allem in Tumorzellen konnte eine erhöhte nukleare Akkumulation von LASP-1 beobachtet werden, deren Intensität signifikant mit der Tumorgröße, den Nodal-Positivwerten sowie dem Langzeitüberleben der Patienten korreliert (Grunewald, Kammerer et al. 2007; Frietsch, Grunewald et al. 2010; Traenka, Remke et al. 2010; Zhao, Wang et al. 2010).

### 2.3 LASP-1 Lokalisation im Zellkern

LASP-1 ist im gesunden Gewebe vorwiegend an fokalen Kontakten und dynamischen Strukturen gebunden, während es in Tumoren vermehrt im Zellkern detektiert wird. Der Zellkernexport und Import von LASP-1 ist, genau wie die Aufgabe im Zellkern, bisher noch unbekannt. Der klassische Weg für den Zellkernimport wird über Importine vermittelt, die an den nuklearen Lokalisationssignalen (nuclear localisation signal, NLS), spezielle Bereiche innerhalb eines Proteins, binden. Per Datenbankabgleich lässt sich feststellen, dass LASP-1 keine dieser klassischen NLS Sequenzen aufweist. Bis zu einer Größe von 40 kDa können Proteine passiv durch die Kernporenkomplexe ins Innere des Zellkerns gelangen. Da LASP-1 nur 29 kDa groß ist, könnte dies für das Protein zutreffen. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden in der kooperierenden Arbeitsgruppe von Joachim Kremerskothen in Münster in Vorversuchen Podozyten mit einem Plasmid transfiziert, der LASP-1 gekoppelt an EGFP kodiert (Daten nicht veröffentlicht). Das EGFP-LASP-1 Fusionsprotein sollte aufgrund seiner Größe von 56 kDa nicht mehr in der Lage sein, passiv in den Zellkern zu gelangen. In Abbildung 2-2 sind Immunfluoreszenzen der mit EGFP-LASP-1 transfizierten Podozyten zu sehen. In den Zellen konnte LASP-1 an den fokalen Kontakten und entlang des Aktin-Zytoskeletts detektiert werden, während nach einer Behandlung durch den Exportinhibitor Leptomycin B (Lep B) eine starke Anreicherung im Zellkern zu beobachten war. Dieses Ergebnis zeigt, dass LASP-1-EGFP trotz seiner Größe in den Zellkern gelangen kann und damit der Transport aktiv sein muss, wahrscheinlich über einen Bindungspartner, der ein NLS aufweist.



Abbildung 2-2 Immunfluoreszenz von Podozyten, transfiziert mit EGFP-LASP. Die Zellen wurden fixiert und unter einem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Im linken Bild ist das grün leuchtende EGFP-LASP-1 entlang der Aktinstressfasern und an den fokalen Kontakten lokalisiert. Nach einer Zweistündigen Inkubation mit dem Exportinhibitor Leptomycin B (rechtes Bild) ist, trotz der Größe des Komplexes, eine deutliche Kernakkumulation von EGFP-LASP-1 zu sehen. Demnach wird LASP-1 aktiv in den Zellkern transportiert

Interessanterweise wurde in Immunfluoreszenzen und im Western Blot von Zytosolund Zellkernfraktionen vor allem die an Serin 146 phosphorylierte Form von LASP-1 (pLASP) im Zellkern gefunden (Abb. 2-3). Dies lässt vermuten, dass die Phosphorylierung einen entscheidenden Regulationsmechanismus für den LASP-1 Transport in den Zellkern darstellt.

Desweiteren ist auch der Kernexportmechanismus von LASP-1 ungeklärt. In der Regel werden Proteine für den Export GTP abhängig an CRM1/Exportin gebunden. CRM1 bindet an bestimmte Zielsequenzen innerhalb eines Proteins, den Kernexportsignalen (nuclear export signal, NES). Bisher ist noch nicht bekannt ob die Sequenz von LASP-1 ein solches NES enthält.



Abbildung 2-3 Immunfluoreszenzen und Western Blot von BT-20 Brustkrebszellen auf LASP-1 und pLASP. A Im linken Bild ist eine LASP-1 Färbung zu sehen. Der LASP-1 Antikörper erkennt sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Form. LASP-1 ist entlang der fokalen Kontakte und im Zellkern detektierbar. Im rechten Bild ist pLASP angefärbt. Wie deutlich zu erkennen ist, befindet sich pLASP nicht an den fokalen Kontakten, sondern ist im Zellkern und Zytosol verteilt. B Western Blot von Kern (K) und Zytosolfraktionen (Z) von BT-20 Zellen. LASP und pLASP sind im Kern und Zytosol zu finden. Lamin (nur nuklear) und GAPDH (nur zytosolisch) dienen als Reinheitskontrolle der Fraktionen.

### 2.4 LASP-1 Bindungspartner

Der LASP-1 Interaktionspartner Palladin ist ein Phosphoprotein, welches genau wie LASP-1 an Aktinstrukturen und fokalen Kontakten bindet. Ein Verlust von Palladin führt zu fehlerhaften Aktinstrukturen und zu einer veränderten Zellmorphologie (Parast and Otey 2000). Palladin Knockout Mäuse sind während der embryonalen Entwicklung letal (Luo, Liu et al. 2005). Palladin vermittelt die Bindung von LASP-1 an die Aktinstressfasern. Generell überschneiden sich die zellulären Funktionen von Zyxin und Palladin zu vielen Teilen (Rachlin and Otey 2006).

Die beiden LASP-1 Bindungspartner LPP und Zyxin sind prominente Vertreter von signalübertragenden Proteinen, die eine duale Funktion in den Zellen übernehmen. So sind sie sowohl an Zytoskelett Strukturen wie den fokalen Kontakten gebunden, können aber auch Signale in den Zellkern übertragen und dort als Transkriptionsfaktoren wirken. Beide gehören zur Familie der LIM Domänen Proteine (Hervy, Hoffman et al. 2006).

LPP interagiert an den Zell-Zell-Kontakten mit Palladin, VASP, Zyxin und α-Aktinin und unterstützt die Zellmotilität sowie die Dynamik des Aktinzytoskeletts (Petit, Mols et al. 1996; Petit, Meulemans et al. 2003; Jin, Kern et al. 2007; Hansen and Beckerle 2008). LPP<sup>-/-</sup> Mäuse sind lebensfähig und weisen keine makroskopischen Defekte auf, jedoch zeigen aus den LPP Knockout Mäusen isolierte MEFs eine verringerte Migrationsfähigkeit sowie eine verkürzte Vitalität (Vervenne, Crombez et al. 2009). Im Zellkern bindet LPP an die Transkriptionsfaktoren PEA3 und ER81, deren transkriptionelle Aktivitäten durch die LPP Regulation erhöht werden (Guo, Sallis et al. 2006). LPP wirkt auch ohne Bindung an andere Transkriptionsfaktoren als unabhängiger Transkriptionsfaktor und gilt als Protoonkogen, da es in verschiedener Form an der Tumorgenese beteiligt ist (Grunewald, Pasedag et al. 2009).

Der LASP-1 Bindungspartner Zyxin ist entscheidend für die Aktinfilament-Polymerisation, Organisation sowie für die Zellmotilität. Zyxin ist vor allem an den fokalen Kontakten gebunden, assoziiert mit VASP, α-Aktinin, Paxillin und LASP-1. Zyxin hat am C-Terminus drei LIM Domänen, mit denen es unter anderem an den Tumorsupressor H-warts/LATS1 bindet. Am N-Terminus von Zyxin befindet sich eine ausgedehnte prolinreiche Domäne mit einem NES. Mit diesen Prolinclustern bindet Zyxin an Proteine der ENA/VASP Familie. Ebenfalls am N-Terminus findet sich eine Bindestelle für α-Aktinin (Macalma, Otte et al. 1996; Reinhard, Zumbrunn et al. 1999). Bei einem LASP-1 Knockdown ist das Proteinlevel von Zyxin zwar unverändert, aber Zyxin kann weder an den fokalen Kontakten noch an den Aktinstressfasern detektiert werden und findet sich diffus im Zytoplasma verteilt. Demnach ist LASP-1 ein wichtiger Bindungspartner von Zyxin an den dynamischen Strukturen einer Zelle (Grunewald, Kammerer et al. 2006; Grunewald, Kammerer et al. 2007). In HUVEC Zellen (human umbilical vein endothelia cells) konnte Zyxin jedoch auch nach LASP-1 Knockdown an den Aktinstressfasern detektiert werden, nicht aber an den fokalen Adhäsionen. Daher scheint LASP-1 besonders wichtig für die Integrität der fokalen Kontakte, während die Zyxin Bindung an den Stressfasern über andere Mechanismen vermittelt wird (Butt, Gambaryan et al. 2003; Grunewald, Kammerer et al. 2006). Zyxin Knockout Fibroblasten migrieren schneller und zeigen Defizite im Aktin-Stressfaseraufbau sowie in der molekularen Zusammensetzung der fokalen Adhäsionen (Hoffman, Jensen et al. 2006). Zyxin übernimmt aber nicht nur wichtige Aufgaben an den dynamischen Strukturen einer Zelle, sondern auch im

Zellkern. Dort reguliert Zyxin die Transkription und bindet mit dem Tumorsupressor hwarts an den Mitoseapparat. h-warts spielt eine Schlüsselrolle in der Mitose von Säugetierzellen (Hirota, Morisaki et al. 2000). Aufgrund dieser Eigenschaften ist Zyxin ein wesentlicher Bindungspartner für LASP-1, der auch für den LASP-1 Zellkerntransport eine wichtige Rolle spielen könnte.

### 2.5 Zielsetzung

LASP-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Migration und Aktinzytoskelett-Organisation von Zellen. Welche Aufgaben LASP-1 im Zellkern übernimmt, ist allerdings ebenso unbekannt wie der Transport des Proteins in und aus dem Zellkern (Grunewald, Kammerer et al. 2007). Ziel der Arbeit war es, den Zellkernimport und LASP-1 aufzuklären und Erkenntnisse Export von neue über die Kerntransportregulierung zu erhalten. Der Transport in den Zellkern muss aktiv erfolgen, da, trotz der Größe des Komplexes, das LASP-1-GFP Fusionsprotein im Zellkern detektierbar ist. Da LASP-1 aber nicht über ein NLS verfügt, ist es wahrscheinlich, dass LASP-1 gebunden an einen Partner in den Zellkern gelangt. In dieser Arbeit sollte daher mittels GST-Pulldown Experimenten nach neuen Bindungspartnern von LASP-1 gesucht und der Transportpartner von LASP-1 identifiziert werden. Dabei sollte die Bindung an mögliche neue Interaktionspartner verschiedene genau charakterisiert und über Wege, zum Beispiel Immunfluoreszenzen und Immunpräzipitationen, verifiziert werden. Auch die Rolle der schon bekannten LASP-1 Bindungspartner LPP und Zyxin sollte untersucht werden. Beide Proteine gehören zu den LIM Domänen Proteinen, die sowohl an den fokalen Adhäsionen als auch im Zellkern zu finden sind (Hervy, Hoffman et al. 2006). Sie wirken als Signalüberträger und sind deshalb vielversprechende Kandidaten als LASP-1 Import Partner. Neben dem Import war die Fragestellung zum Export von LASP-1 ebenfalls Thema dieser Arbeit. Weiterhin sollte die Bedeutung der Serin 146 Phosphorylierung durch die PKA auf die LASP-1 Lokalisation und auf das Bindungsverhalten an seine Interaktionspartner untersucht werden. Nach Stimulation durch die PKA steigt der pLASP Anteil im Zellkern stark an, daher könnte die Phosphorylierung Einfluss auf den Zellkernimport haben.

Alle Experimente wurden in Blutplättchen als benignes Zellmodell und in malignen MDA-MB231 Zellen durchgeführt.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

### 3.1.1 Kulturzellen

Die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB321, die PtK2 Zellen (Nierenzellen der Beutelratte) und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurden bei der American Typ Culture Collection (ATCC) in Manassas, USA, erworben.

Die MEF (mouse embryonic fibroblasts) Zellen wurden aus LASP-1 defizienten Mäusen von Dr. Cora Reiß gewonnen. Die Mäuse waren in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Name	Hersteller
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur

### 3.1.3 Primer

Die Primer wurden von der Firma imaGenes, Berlin, Deutschland, hergestellt. Die Primer, die zur Herstellung von LASP-1 bzw. ZO-2 Mutanten benutzt wurden, basieren auf der publizierten humanen LASP-1 cDNA Sequenz (GeneBank<sup>TM</sup> Access. No. X82456) bzw. der humanen ZO-2 cDNA Sequenz (GeneBank<sup>TM</sup> Access. No. BC027592). Die Mutanten LASP-1  $\Delta$ SH3 und LASP-1  $\Delta$ LIM wurden freundlicherweise von Dr. Joachim Kremerskothen aus der Universitätsklinik Münster zur Verfügung gestellt. LASP S146D war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden (Butt, Gambaryan et al. 2003).

Gen	Primer	Sequenz
LASP L74A	forward	5'-cggaaaaccttcgcctcgcgcaacagagtgagctcc-3'
	reverse	5'-ggagctcactctgttgcgcgaggcgaaggttttccg-3'

ZO-2 878 wt	forward	5`-cgcggatccatgtcctacttaaccgccatg-3`	
	reverse	5`-cgcgaattcctataattctgtgtcccggtatcgggcag-3`	
ZO-2 878 P1106A	forward	5`-cacaagccagacgctggcacgcccc-3`	
	reverse	5`-ggggcgtgccagcgtctggcttgtg-3`	
ZO-2 878 P1116A	forward	5`-agcacacgagttccagagcccctgagc-3`	
	reverse	5`-gctcaggggctctggaactcgtgtgct-3`	
ZO-2 N-term	forward	5'-cgcggatccatggaagagctgatatgggaacagtac-3'	
	reverse	5`-cgcgaattctcagcggtcttcggggtcatc-3`	
pTRIPZ	forward	5'-ggaaacaatcaaggagg-3'	
Sequenzierungsprimer			

# 3.1.4 Antikörper für die Western Blot Analyse

3.1.4.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Тур	Verdünnung	Hersteller
Aktin	polyklonal,	1:2000	Santa Cruz, Santa Cruz
	Kaninchen		CA; USA
LASP-1	polyklonal,	1:6000	ImmunoGlobe,
	Kaninchen		Himmelstadt,
			Deutschland
LASP-1 Klon B8	monoklonal, Maus	1:1000	Nanotools, Teningen,
			Deutschland
LASP anti- pospho	polyklonal,	1:5000	ImmunoGlobe,
Ser 148 IG566	Kaninchen		Himmelstadt,
			Deutschland

ZO-2	polyklonal,	1:1000	Cell Signaling, Beverly
	Kaninchen		MA, USA
LPP	polyklonal,	1:2000	ImmunoGlobe,
	Kaninchen		Himmelstadt,
			Deutschland
Zyxin	monoklonal, Maus	1:2000	Synaptic Systems,
			Göttingen, Deutschland
CRM1	monoklonal, Maus	1:1000	Santa Cruz, Santa Cruz
			CA, USA

## 3.1.4.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Goat-anti rabbit	Meerrettich-	1:5000	Bio-Rad, München,
lgG	Peroxidase		Deutschland
Goat-anti mouse	Meerrettich-	1:5000	Bio-Rad, München,
IgA	Peroxidase		Deutschland

# 3.1.5 Antikörper für die Immunfluoreszenz und Duolink

# 3.1.5.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Тур	Verdünnung	Hersteller
LASP-1	polyklonal,	1:1000	ImmunoGlobe,
	Kaninchen		Himmelstadt,
			Deutschland
LASP-1 Klon B8	monoklonal, Maus	1:10	Nanotools, Teningen,
			Deutschland
LASP anti- pospho	polyklonal,	1:500	ImmunoGlobe,
Ser 148 IG566	Kaninchen		Himmelstadt,
			Deutschland
depLASP, Klon	polyklonal,	1:300	ImmunoGlobe,
1087	Kaninchen		Himmelstadt,

	Deutschland

ZO-2	monoklonal, Maus	1:100	Invitrogen, Karlsruhe,
			Deutschland
LPP	monoklonal, Maus	1:500	Abcam, Cambridge, UK
Zyxin	monoklonal, Maus	1:200	Synaptic Systems,
			Göttingen, Deutschland
ΙΚΒα	monoklonal, Maus	1:250	BD Bioscience, San
			Jose CA, USA

# 3.1.5.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Oregon green	FITC	1:50	Invitrogen,
Phalloidin			Karlsruhe,
			Deutschland
Anti rabbit Cy3	Indocarbocyanin	1:500	Dianova, Hamburg,
			Deutschland
Anti mouse Cy 2	Carbocyanin	1:500	Dianova, Hamburg,
			Deutschland

# 3.1.6 Antikörper für Immunpräzipitationen

Bezeichnung	Тур	Eingesetzte Menge	Hersteller
ZO-2	monoklonal, Maus	2,5 µg	Invitrogen,
			Karlsruhe,
			Deutschland
LASP-1	polyklonal,	2 µg	ImmunoGlobe,
	Kaninchen		Himmelstadt,
			Deutschland
LASP-1 Klon B8	monoklonal, Maus	2 µg	Nanotools,
			Teningen,
			Deutschland

## 3.1.7 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Big Dye Terminator v 2.1 Cycle	Applied Biosystems, Foster City CA,
Sequencing Kit	USA
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic	Pierce, Bonn, Deutschland
Extraction Reagents	
Duolink II proximity ligation assay (PLA)	Olink Bioscience, Uppsala; Schweden
Kit (PLA Probe anti-rabbit plus, PLA	
probe anti mouse minus; Detection Kit	
orange, Mounting Medium mit DAPI,	
Puffer A und B)	
Plasmid Mini Präparationskit	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Qiagen Plasmid Midi und Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuickChange Site-directed Mutagenese	Stratagene, Santa Clara CA, USA
Kit	
CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive	Promega, Madison, WI, USA
Cell Proliferation Assay	
ProteoJET <sup>TM</sup> Membrane Protein	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Extraction Kit	

# 3.1.8 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller	
1 kB Marker	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland	
Acrylamidlösung (Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Pfullingen, Deutschland	
β- Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	
Calyculin A	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland	
Cocktail		

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Doxycyclin hyclate ≥ 98 %	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ECL und ECL plus	Amersham, München, Deutschland
Entwicklerlösung (Diamino-Benzidin)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fibrinogen	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
GelRed®	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ladepuffer Agarosegel 6x	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Metafectene	Biontex, Martinsried, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad, München, Deutschland
Mowiol 4-88	Hoechst, Höchst, Deutschland
NaOH 2N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na- Orthovanadrat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Pefabloc	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Katalytische Untereinheit der PKA	In der Arbeitsgruppe vorhanden (Walter,
	Miller et al. 1980)
Phosphorsäure (85 %)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz, Santa Cruz CA, USA
Protein Größenstandard PageRuler <sup>™</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Temed	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween	Serva, Heidelberg, Deutschland

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

Agarplatten	15 g Agar
	1 I LB Medium
	1 ml Ampicillin- Lösung
Ampicillin	50 mg/ml in 50 % Ethanol
	Lagern bei – 20 °C
10 % APS	10 % Ammoniumpersulfat in H <sub>2</sub> O
CCD Puffer	100 mM Natriumcitrat
	7 mM Zitronensäure
	140 mM Glucose
	15 mM EGTA
	pH 6,5
CGS Puffer	120 mM NaCl
	12,9 mM Natriumcitrat
	30 mM D-Glucose
	pH 6,5
Commassie –Blau	0,04 % Commassie brilliant blue
	10 % Isopropanol, absolut
	10 % Essigsäure
	Filtrieren
Coomassie Entfärberlösung	10 % Essigsäure
	10 % Ethanol
Kolloidale Coomassie Färbung	34 % (v/v) Methanol
	2 % (v/v) Phosphorsäure (89 %ig)
	17 % (w/v) Ammoniumsulfat
	0,066 % (w/v) Coomassie G-250
ECL	Reagenz A: 200 ml 0,1 M Tris/HCL
	рН 8,6
	+ 50 mg Luminol
	Reagenz B: 11 mg Coumarinsäure in 10

### 3.1.9 Puffer und Lösungen

	ml DMSO
	Reagenz C: 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Ansatz: 3 ml Reagenz A
	300 µl Reagenz B
	A + B mischen
	0,9 μl Reagenz C
	3 ml Ansatz ausreichend für eine
	Membran 10 x 10 cm
Elektrophoresepuffer	Tris pH 8.9
	30,5% (w/v) SDS
	192 mM Glycin
5 % Goat-Serum	1 ml Goat-Serum
	20 ml 0,1 % Triton/PBS
2 x HBS Puffer	50 mM Hepes
	280 mM NaCl
	1,5 mM Na₂HPO₄
	pH 7,1
Hepes Puffer	10 mM Hepes pH 7,4
	10 mM Glucose
	145 mM NaCl
	5 mM KCl
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
Hypotoner Puffer	10 mM Hepes
	1 mM KCl
	1,5 mM EDTA
	200 mM Sucrose
	pH 8,1
	Kurz vor Gebrauch 1 Tablette Complete
	Mini/ 10 ml
100 mM IPTG	0,24 g in 10 ml H <sub>2</sub> O
LB- Medium	1 % Bacto Trypton
	0,5 % Bacto Yeast Extract
	1 % NaCl

	pH 7, autoklavieren
3 x Lysepuffer für die Blutplättchenlyse	50 mM Tris-HCl pH 7,4
	150 mM NaCl
	3 mM EGTA
	3 % Triton X-100
	Kurz vor Gebrauch 1 Tablette Complete
	Mini/ 10 ml
Lysepuffer für die Proteinaufreinigung	50 mM Tris
aus <i>E.coli</i>	1 mM EDTA
	100 mM NaCl
	рН 8,0
	0,1 % Triton X 100
	Kurz vor Gebrauch 1 Tablette Complete
	Mini/ 10 ml
2 x MIPP Immunpräzipitationspuffer	40 mM Tris pH 7,4
	300 mM NaCl
	2 % Na-Deoxycholat
	2 % Triton X-100
	0,2 % SDS
	20 mM EDTA
	Kurz vor Gebrauch 1 Tablette Complete
	Mini/ 10 ml
Mowiol	Mowiol 4-88
	50 % Glycerol
	0,2 M Tris, pH 8,5
	2,5 % DABCO
PFA Lösung	4 % Paraformaldehyd in PBS
PBS	137 mM NaCl
	10,14 mM Na₂HPO₄
	1,76 mM KH₂PO₄
	2,68 mM KCI
	pH 7,2, autoklavieren
10 x Phosphorylierungspuffer	100 mM Hepes, pH 7,4

	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM DTE
	2 mM EDTA
Ponceau S	0,5 % Ponceau S in 10 %ige Essigsäure
Sammelgelpuffer (Puffer A)	0.5 M Tris/HCl pH 6.7
SDS Stopp 3 x	200 mM Tris/HCl pH 6.7
	6 % (w/v) SDS
	15 % (w/v) Glycerin
	30 $\mu$ g/ml Bromphenolblau; ad dH <sub>2</sub> O
10 x TBE	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	20 mM EDTA
10 x TBS Puffer	100 mM Tris
	1,5 mM NaCl
	рН 7,5
0,1 %iges TBS-T	1 ml Tween
	1 I 1 x TBS
0,1 % Triton/PBS	100 μl Triton X-100
	100 ml PBS
3 % TBS-T Milch	3 g (3 % w/v) Milchpulver
	100 ml TBS-T
Transferpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% Methanol
	рН 10,0
Trenngelpuffer (Puffer B)	3 M Tris/HCl pH 8.9

### 3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24 mm Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
6 und 48 Well Platten	Cellstar, Greiner, Frickenhausen,
	Deutschland

Desinfektionsmittel	Teralind liquid, Schülke&Mayr,	
	Norderstedt, Deutschland	
Einfrierröhrchen (2 ml)	Nunc, Waltham MA, USA	
Filme für Chemilumineszenz	X-RAY Film Super RX; FUJI medical	
	GmbH, Düsseldorf, Deutschland	
Insulinspritzen Omnican 40	Braun, Melsungen, Deutschland	
Nitrocellulosemembran	PROTRAN <sup>®</sup> ,Schleicher&Schuell	
	Bioscience GmbH, Dassel, Deutschland	
Objektträger	Hartenstein, Würzburg, Deutschland	
	Menzel Gläser GmbH, Braunschweig,	
	Deutschland	
Parafilm M	American National Can, Greenwich CT,	
	USA	
Pippettenaufsätze	2, 10, 25 ml costar stripette, Corning,	
	New York, USA	
Pipettenspitzen	Biosphere Filter-Tips, Sarstedt	
Reaktionsgefäße	(15 ml; 50 ml) Greiner, Frickenhausen,	
	Deutschland	
	(1,5 ml; 2 ml) Eppendorf, Hamburg,	
	Deutschland	
Sicherheitshandschuhe	SafeSKIN PFE, Kimberly-Clark,	
	Zavantem, Belgien	
Zellkulturflaschen	T25 und T75 Cellstar, Greiner,	
	Frickenhausen, Deutschland	
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg, Deutschland	

## 3.1.11 Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	Model 3336, Labotect, Göttingen,
	Deutschland
Elektrophoresekammer	Noras, Würzburg, Deutschland
Feinwaagen	Universal und Type 1801, Sartorius,

	Göttingen, Deutschland
Filmentwickler	X-OMAT M 35, Kodak-Industrie, Cedex,
	Frankreich
	OPTIMAX ,PROTEC, Oberstenfeld,
	Deutschland
Western Blot-Kammer	TRANS-BLOT <sup>™</sup> , Bio-Rad, München,
	Deutschland
Hood, sterilGard	The Baker Company, Stanford Maine,
	USA
Konfokales Mikroskop	LSM710, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland
Magnetrührer	Ika, Janke&Kunkel, Staufen,
	Deutschland
Heizplatte	Stirrer/Hotplate, Corning, New York, USA
Nanodrop	2000c, Thermo Scientific, Waltham MA,
	USA
Mikroinjektionsspritzen	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz,
	Schweiz
Mikroskop	Lichtmikroskop: Axiovert 25, ZEISS,
	Jena, Deutschland
PCR Cycler	PCR System 9700 "Gene Amp" Applied
	Biosystems, Foster City CA, USA
pH-Meter	PHM 82 Standard pH-Meter,
	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Pipette (elektrisch)	accu-jet pro, Brand, Wertheim,
	Deutschland
Pipetten (manual)	10, 20, 200, 1000 µl Rainin, Mettler
	Toledo, Greifensee, Schweiz
Reaktionsgefäßständer	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Sequenziergerät	ABI PRISM 3130 Genetic Analyser,
	Applied Biosystems, Foster City CA,
	USA
Spannungsgeräte	POWER PAC 200 und MODEL 200/2.0

	POWER SUPPLY, Bio-Rad, München,
	Deutschland
Software	EndNote X 4, Thomson
	Adobe Photoshop CS2
	Microsoft Office 2010 Exel, Power Point,
	Word
Auswertung von Sequenzen	ChromasPro
	(www.technelysium.com.au)
Analyse Duolink Bilder	ZEN 2010, Zeiss
Statistische Auswertung	PASW statistics
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf,
	Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Julabo MB, Seelbach, Deutschland
UV Tisch	TFX-35, Live Technologies, New York,
	USA
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	
Tischzentrifugen	5415 C, Eppendorf, Hamburg,
	Deutschland
	Picofuge, Stratgene, Santa Clara CA,
	USA
Zellkultur	ROTANTA/S und ROTIXA/K, Hettich,
	Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge	5417 R, Eppendorf, Hamburg,
	Deutschland
Bakterienzentrifuge	RC5B, GSA Rotor, Sorvall, Waltham MA,
	USA
DNA Zentrifugation	RC5B, SS 34 Rotor, Sorvall, Waltham
	MA, USA

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden bis zu einer Zelldichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml bei 37 °C unter einer 5 %igen Atmosphäre kultiviert. Die PtK2 und MDA-MB231 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium der Firma Invitrogen kultiviert, angereichert mit 10 % hitzeinaktiviertem Kälberserum (FCS) und einer 1 %igen Streptomycin/Penicillin-Mischung. Die Zellen wurden maximal bis zu Passage 5 für Experimente verwendet, da sich herausgestellt hat, dass LASP-1 zu einer Gruppe von Proteinen gehört, die ab späteren Passagen hochreguliert werden (Sun, Bahk et al. 2006). Für die HEK293T Zellen diente DMEM Medium, ebenfalls mit 10 % FCS und 1 % Streptomycin/Penicillin versetzt, als Kulturmedium. Zur Vorbereitung eines Experiments wurden die Zellen mit 3 ml (T75 Flasche) bzw. 1 ml (T25 Flasche) Trypsin vom Flaschenboden gelöst, in 7 ml (T75) bzw. 3 ml (T25) Medium aufgenommen und 3 min bei 100 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 1 ml Medium aufgenommen, davon wurde eine 1:10 Verdünnung auf eine Neubauerkammer gegeben, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in der gewünschten Konzentration ausgesät.

#### 3.2.2 Zellkern und Zytoplasmaauftrennung

Die humanen Brustkrebszelllinien wurden bei einer Konfluenz von 80 % mithilfe von Trypsin geerntet und abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde noch einmal mit PBS gewaschen bevor es in den Reagenzien des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Pierce) nach dem Benutzerprotokoll aufgenommen und weiterverarbeitet wurde. Um einen Proteinabbau und Dephosphorylierungen zu verhindern, wurden zu den Reagenzien CER1 und NER Proteaseinhibitoren (1 mM Na- Orthovanadrat, 1 mM Pefabloc, 1  $\mu$ g/ml Pepstatin, 1  $\mu$ g/ml Leupeptin) und 10  $\mu$ M Calyculin A hinzugegeben.

#### 3.2.3 Zell- Transfektion

Für Transfektionen wurden MDA-MB231 Zellen in 6-Well Platten oder T25 Flaschen ausgebracht und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Transfektionslösung angesetzt: dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA (pCDNA3 Vektor) mit 50 µl Opti-MEM Medium vermischt. In ein zweites Reaktionsgefäß wurden 15 µl (für eine T25 Flasche) bzw. 5 µl (für eine 6-Well Kammer) Metafectene mit ebenfalls 50 µI Opti-MEM versetzt. Die Metafectene-Opti-MEM Mischung wurde tröpfchenweise zu der Plasmid-Opti-MEM Lösung gegeben und gut durchmischt. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde das Zellmedium abgesaugt und durch Opti-MEM ersetzt. Dann konnte die Transfektionslösung zu den Zellen gegeben werden und für 6 h bei 37 °C im Brutschrank einwirken. Anschließend wurde das Medium durch frisches Vollmedium RPMI 1640 mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ersetzt. Nach 48 h konnten die Zellen geerntet und verwendet werden, zum Beispiel für eine Zellkern/Zytosolauftrennung oder einen GST-Pulldown. Als Kontrolle blieb immer eine Flasche/ein Well völlig unbehandelt, während eine Flasche/ein Well nur mit Metafectene, ohne DNA, behandelt wurde.

#### 3.2.4 Stimulation von Zellen mit Forskolin und Leptomycin B

Forskolin ist ein membrangängiger, direkter Aktivator der Adenylylcyklase. Diese erhöht den cAMP Spiegel in der Zelle, was wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert und damit zu einer Phosphorylierung von LASP-1 führt. Bei MDA-MB231 und BT-20 Zellen wurde bei einer Konfluenz von 60-80 % das Medium abgesaugt und durch frisches, mit 10 µM Forskolin versetztes, Medium ersetzt. Für 2 min bis 4 h wurde Forskolin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weiterführende Experimente geerntet und verwendet.

Bei Leptomycin B (LepB) handelt es sich um einen spezifischen und effizienten Inhibitor der Zellkernexportmaschinerie. LepB bindet und alkyliert dafür CRM1/Exportin1, ein Protein was den Kernexport von Proteinen mit einer NES (Nuclear Export Sequence) Sequenz vermittelt. Um den Export zu blockieren, wurden bei MDA-MB231 oder BT-20 Zellen bei einer Konfluenz von 60-80 % 20 nM LepB für 30 min ins Medium gegeben. Danach wurden die Zellen entweder für eine Immunfluoreszenz fixiert oder es erfolgte eine Zellkern/Zytosol-Auftrennung.

### 3.2.5 Expression und Aufreinigung von GST Fusionsproteinen

Die Wildtyp und Mutanten Formen von LASP-1 und ZO-2 wurden im Vektor pGEX in *Escherichia Coli* XL1 Blue Zellen exprimiert. Dazu wurden eine Vorkultur von 5 ml LB-Ampicillin Medium angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur in einen Erlenmeyer-Kolben mit 50 ml LB-Amp Medium überführt und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,7 wachsen gelassen. Dann wurde durch Zugabe von 100 mM IPTG die Expression der

GST- Fusionsproteinen gestartet und für weitere 3 h geschüttelt. Die Bakterien wurden anschließend bei 3000 x g sedimentiert und bei – 20 °C eingefroren. Zum Aufschluss wurde das Bakterien-Sediment abgewogen und in einer entsprechenden Menge Lysepuffer aufgenommen (0,55 g Sediment  $\triangleq$  1,5 ml Lysepuffer). Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate sonifiziert, um die Zellen besser aufzuschließen. Nach dem Abtrennen der Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 20 000 x g) wurde der klare Überstand mit GSH Sepharose 4B für eine Stunde bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach konnten die Sepharose Beads mit den gebundenen Fusionsproteinen sedimentiert (2 min, 100 x g) und gewaschen werden. Die aufgereinigte Proteinmenge wurde mittels einer Gelelektrophorese und anschließender Coomassie-Färbung bestimmt. Bei 4 °C wurden die Beads maximal 3 Wochen gelagert.

#### 3.2.6 Pulldown Experimente

Pulldown Versuche wurden mit humanen Thrombozyten oder in MDA-MB231 Zellen durchgeführt. Die Isolation von Thrombozyten ist im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie eine Standardmethode. Blutplättchen bieten den Vorteil, dass sie kernlos sind und damit auch keine DNA enthalten, die die Versuche beeinträchtigen könnte. MDA-MB231 Zellen zeigen eine Überexpression von LASP-1. Diese Zellen wurden gewählt, um das Verhalten von LASP-1 in bösartigen Zellen zu untersuchen.

<u>Thrombozyten</u>: 40 ml humanes venöses Blut wurden abgenommen und mit 10 ml CCD + EGTA Puffer vermischt. Um das Blutplasma von den Erythrozyten zu befreien folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 300 x g. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 380 x g konnte das entstandene Blutplättchen-Sediment in CGS Puffer gewaschen und nochmal bei 380 x g für 10 min zentrifugiert werden. Anschließend wurden die Thrombozyten in Hepes Puffer aufgenommen und am Zellzähler gezählt. Mit einer eingestellten Zellzahl von 4.5 x  $10^8$  wurde weiter gearbeitet. Die Plättchensuspension wurde 1:3 mit 3 x Lysepuffer gemischt und für 30 min bei 4 °C rotiert. Nach einem Spritzenaufschluss durch eine Insulin-Spritze wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min, 20 000 x g) entfernt. Der Überstand wurde 2 h mit den entsprechenden GST-Beads unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden GST-Beads ohne Fusionsprotein verwendet. Die Beads konnten anschließend 3-mal mit PBS gewaschen werden um nicht

gebundene Proteine zu entfernen und wurden in 3 x SDS-Stopp Lösung für die nachfolgende Western Blot Analyse aufgenommen.

<u>MDA-MB231 Zellen</u>: Bei einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> wurden die Zellen geerntet und in hypotonen Puffer aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation im Überkopfschüttler bei 4 °C wurden die Proben für 1 min in flüssigen Stickstoff geworfen und konnten danach auf Eis auftauen. Eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 20 000 x g trennte unlösliche Zellbestandteile ab. Der Überstand wurde für 2 h mit den gewünschten GST-Fusionsprotein-Beads rotiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie zuvor beschrieben.

<u>In-vitro Phosphorylierung</u>: GST-LASP wt Beads konnten vor dem Pulldown auch an Serin 146 in vitro phosphoryliert werden. Dazu wurden die Beads mit 1 mM ATP, 10 x Phosphorylierungspuffer und 0,5 µg von der C- Untereinheit der Proteinkinase A für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Lysepuffer konnten die Beads in die Zellhomogenate gegeben werden. Zu den Homogenaten wurde, um eine Dephosphorylierung zu blockieren, 10 µM Calyculin A zugesetzt.

### 3.2.7 Ko-Immunpräzipitation

Thrombozyten: Die Blutplättchen wurden, wie im Abschnitt "Pulldown Experimente" beschrieben, gereinigt. Schon während die Plättchen in CGS gelöst waren wurde die Zellzahl bestimmt. So konnten die Thrombozyten nach dem Zentrifugieren direkt in 1 x MIPP mit der gewünschten Konzentration von 4,5 x 10<sup>8</sup> aufgenommen werden. Die Proben wurden dann für 30 min bei 4 °C im Überkopfschüttler gedreht um danach mit einer Insulinspritze durch mehrmaliges aufziehen aufgeschlossen zu werden. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (10 min, 20 000 x g) wurde der Überstand zunächst mit zuvor in MIPP Puffer äquilibrierten Protein A/G Sepharose inkubiert. Dieser Schritt diente zu Vorreinigung des Überstandes, da alle unspezifisch an die Beads bindenden Proteine entfernt wurden. Anschließend konnte der Überstand mit dem gewünschten Antikörper versetzt werden. Als Kontrolle diente ein typgleiches Antikörpergemisch um auszuschließen, dass die Antigene unspezifisch am Antikörper binden. Die Antikörperinkubation hat mindestens 1,5 h betragen und maximal eine Nacht, immer rotierend bei 4 °C. Es folgte die Zugabe von Protein A/G Sepharose Beads für 1,5 h. Die Immunpräzipitate wurden danach 3 mal mit PBS gewaschen und in SDS- Stopp Puffer bei – 20 °C für die anschließende Western Blot Analyse gelagert.
<u>MD-MAB231 Zellen</u>: Die Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll wie im Abschnitt "Pulldown-Experimente" vorbereitet. Das Zellsediment wurde in 1x MIPP Puffer aufgenommen und identisch wie die Thrombozyten behandelt.

#### 3.2.8 Denaturierende Gelelektrophorese

Alle Proben, die mit einer Gelelektrophorese analysiert werden sollten, wurden in SDS-Stopp Puffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C gekocht. Anschließend konnten die Proben bei – 20 °C gelagert werden.

Für die SDS- Polyacrylamid- Elektrophorese wurden Gele aus einem 6-15 %igen Acrylamid-Trenngel und einem darüber liegenden Sammelgel hergestellt. Nachdem die Proben auf das Gel geladen wurden, wurde eine Spannung von 70 V angelegt bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Für die folgende Stunde wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Im Anschluss wurde das Gel entweder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert oder für 1 h in (Kolloidal-) Coomassie Lösung gefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel für 1 h in Entfärberlösung oder Wasser (bei Kolloidaler Färbung) geschwenkt.

#### 3.2.9 Western Blot

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden vom Gel auf die Nitrocellulosemembran mittels Wet-Western Blot für 1 h bei 2 A übertragen. Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurde die Membran nach dem Blot mit Ponceau-S einige Minuten gefärbt. Dann konnte die Membran mit Wasser und TBS-T gewaschen und für eine Stunde bei RT in Blockmedium (3 % TBS-T milk) geschwenkt werden, um alle unspezifischen Bindungen abzusättigen. Danach inkubierte der Primärantikörper, verdünnt im Blockmedium, über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran für insgesamt 30 min gewaschen, wobei das TBS-T dreimal gewechselt wurde. Der Nachweis des primären Antikörper, der verdünnt in Blockmedium 1 h bei RT auf die Membran gegeben wurde. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Membran mit ECL-Lösung bedeckt und wenige Sekunden bis Minuten auf einem Film exponiert.

#### 3.2.10 Immunfluoreszenz

<u>Zellen:</u> Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Glas-Deckgläschen ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 70 % wachsen gelassen. Die Zellen

wurden in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert, in 0,1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und mit 3 % goat serum in 0,1 % Triton X-100/PBS blockiert. Der erste Antikörper, verdünnt in 3 % goat serum in 0,1 % Triton X-100/PBS wurde für 2 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen mit einem Gemisch aus sekundärem Antikörper (Cy 2 oder Cy3) und Oregon green Phalloidin Antikörper für eine Stunde bei RT bedeckt. Im letzten Schritt wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträger fixiert und konnten am nächsten Tag unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet werden.

<u>Thrombozyten:</u> Die Plättchen wurden, wie im Abschnitt 2.2.6 "Pulldown Experimente" beschrieben, gewonnen. Damit die Thrombozyten besser haften und aktiviert werden, wurden die Deckgläschen mit 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen für 30 min bei RT beschichtet. Danach wurden die Deckgläschen 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 x 10<sup>4</sup> Plättchen, gelöst in Hepes Puffer, für 30 min bei RT überschichtet. Das weitere Vorgehen erfolgte wie im Protokoll Immunfluoreszenz bei Zellen.

#### 3.2.11 Duolink® und Konfokale Mikroskopie

Protein-Protein Interaktionen konnten mit dem Duolink® proximity ligation assay (PLA) Kit der Firma O-Link Bioscience unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Die MDA-MB231 Zellen wurden auf zuvor mit 100 µg/ml Fibrinogen in PBS beschichteten Deckgläschen ausgesät. Dazu wurden die Deckgläschen 30 min mit Fibrinogen überschichtet, 2-mal mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet. So blieben die Zellen während des Essays fest haften. Anschließend wurden die Zellen wie im Abschnitt Immunfluoreszenz beschrieben fixiert und permeabilisiert (Abb.3-1 a). Nach dem Blockieren von 30 min bei 37 °C mit "Antibody diluent" wurden die Erstantikörper für 2 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert (Abb.3-1 b). Nach dreimaligem Waschen mit Puffer A wurden die Deckgläschen für eine Stunde mit den sekundären Antikörpern PLA anti-rabbit plus und PLA anti-mouse minus überschichtet (Abb.3-1 c). Die sekundären Antikörper sind mit Oligonukleotiden konjugiert, die im nächsten Schritt durch eine Ligase hybridisiert und zu einem Kreis geschlossen wurden. Dieser Schritt funktioniert nur wenn sich die beiden Antikörper in enger räumlicher Nähe befinden, also bloß wenn die Zielproteine direkt interagieren (Abb.3-1 d). Anschließend wurde die Amplifizierungs-Lösung auf die Deckgläschen gegeben. Diese besteht aus Nukleotiden und fluoreszierenden Oligonukleotiden. Durch Zugabe von Polymerase wurde die "Rolling circle" Amplifikation (RCA) gestartet, bei der der zuvor ligierte Nukleotidkreis vervielfältigt wird (Abb.3-1 e). Die fluoreszierenden Oligonukleotide konnten nun an den RCA binden und waren als rote Punkte unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Abb.3-1 f). Die Amplifizierungs-Lösung wurde durch 4 mal 5 min Waschen mit Puffer B entfernt. Dann wurde 1 min mit 0,1 % Puffer B gewaschen, bevor der Phalloidin Antikörper verdünnt in "Antibody diluent" für 15 min im Dunkeln inkubiert wurde. Es folgte eine Waschung von 10 min in PBS, nach der die Deckgläschen mit der Oberseite auf Objektträger, die zuvor mit einem Tropfen "Mounting Medium plus DAPI" beschichtet wurden, aufgelegt wurden. Die konfokale Mikroskopie erfolgte mit einem Zeiss LSM710 Mikroskop des Universitätsklinikums Göttingen unter Verwendung eines Plan Apochromat x63/1.40 Öl-Immersions Objektiv. Die Bilder wurden mit der Software ZEN 2010 analysiert. Das Mikroskop wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Viacheslav Nikolaev verwendet.



Abbildung 3-1 Schema einer Duolink® PLA Reaktion. a Fixierung der Zellen auf dem Objektträger b Erstantikörper binden an Proteinen c Zweitantikörper, gekoppelt mit Oligonukleotiden, binden an Erstantikörpern d Ligation zum Kreis e RCA f Rote Fluoreszenzpunkte unter dem Mikroskop. Die genauen Erläuterungen zu den einzelnen Reaktionsschritten finden sich im Text. Quelle: www.olink.com

### 3.2.12 Plasmid Präparation

Plasmid Präparationen wurden mit dem Mini-Kit von peqlab oder den Midi/Maxi Kits von Qiagen nach den beiliegenden Protokollen durchgeführt. Für die Mini Präparationen wurden die gewünschten *E.coli* Klone über Nacht in 5 ml LB Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin bei 37 °C sanft geschüttelt. Bei einer Midi Präparation wurde ein Ansatz von 25 ml E-coli Kultur amplifiziert, für die Maxi-Präparation 50 ml. Die gewonnenen Plasmid-DNA wurde in reinem Wasser aufgenommen und am Nanodrop die Konzentration und Reinheit gemessen.

#### 3.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

1 g Agarose wurde in 100 ml TBE Puffer aufgekocht. Bei ca. 70 °C konnten 2 µl GelRed zum Anfärben der DNA zum Gel gegeben werden. Zum Auftragen der Proben wurde diese 1:10 in Probenpuffer verdünnt. Das Gel lief 30 min bei 120 V, danach konnte es auf dem UV-Tisch fotografiert und bei Bedarf Banden ausgeschnitten werden.

#### 3.2.14 Transformation von kompetenten E-coli Stämmen

Zum Transformieren wurden *One Shot Top10 E.coli* kompetente Zellen der Firma Invitrogen benutzt. Diese wurden nach dem Auftauen mit dem gewünschten Plasmid-Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden machte kurz die Bakterienmembran porös, so dass die Plasmide von den Bakterien aufgenommen werden konnten. Anschließend wurde S.O.C. Medium zu den *E.colis* gegeben, für 4 Stunden bei 37 °C leicht geschüttelt und auf Agarplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag konnten Kolonien gepickt und für die weitere Analyse, zum Beispiel Mini-Präparationen mit anschließender Sequenzierung, verwendet werden. Um Stocks der Kolonien zu erhalten, wurden diese über Nacht schüttelnd in flüssigem LB-Medium bei 37 °C vermehrt. Am nächsten Tag wurde 1 ml Flüssigkultur mit 0,5 ml 86% Glycerin vermischt, in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren.

#### 3.2.15 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde eine spezielle PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) benutzt, die mit di-deoxy-Nukleotiden arbeitet. Diese Nukleotide sind Fluoreszenz markiert und führen beim Einbau zum Kettenabbruch, so dass DNA Stränge mit unterschiedlichen Längen entstehen. Diese können vom Sequenzierungsgerät analysiert werden. Es wird lediglich der forward Primer benötigt, da eine lineare Amplifizierung erfolgt.

Ansatz für eine BigDye Sequenzierungsreaktion:

0,2 μg Minipräp-DNA 3,75 μl BigDye Puffer 0,5 μl BigDye 5 pm Primer Ad 20 μl ddH<sub>2</sub>O

BigDye PCR- Programm:

```
96 °C 30 sek (Initiale Denaturierung)
96 °C 10 sek (zyklische Denaturierung)
52 °C 10 sek (Annealing)
60 °C 3 min (Elongation)
4 °C ∞
```

Der Reaktionsmix wurde über Nacht bei 4 °C gelagert, um am nächsten Tag die DNA zu fällen. Dafür wurden zunächst 2 µl Natriumacetat (3 M, pH 6,4), gefolgt von eiskaltem Ethanol-absolut zu den Proben gegeben. Die Probe wurde bei 4 °C für 30 min zentrifugiert (20 000 g) um dann 1 ml 70 % Ethanol dazuzugeben. Wieder wurde bei maximaler Geschwindigkeit 10 min zentrifugiert, wonach der Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml 70 % Ethanol gelöst wurde. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 20 000 x g wurde das Sediment trocken abgesaugt und unter Vakuum für 15 min getrocknet. Nun konnte die DNA in Formamid aufgenommen werden und im Sequenzer ABI PRISM® *3130 Genetic Analyser* analysiert werden. Mit dem Programm Chromas Pro wurden die Sequenzen ausgewertet.

# 3.2.16 Einfügen einer Punktmutation mit dem *QuickChange Site-directed Mutagenese* Kit

Um einzelne Aminosäuren einer Proteinsequenz zu tauschen, wurden in der Basensequenz entsprechende Punktmutationen eingefügt. Dazu wurden einzelne Mutationen in das Codon, das die zu verändernde Aminosäure kodiert, mit dem *QuickChange Site-directed Mutagenese* Kit eingebaut. Nachdem die entsprechenden Primer auf www.stratagene.com designt wurden, wurde mit diesen und dem pcDNA3 bzw. pGEX Vektor mit der Wildtyp Sequenz des gewünschten Gens eine Mutagenese PCR durchgeführt:

Ansatz für die Mutagenese PCP:	PCR Programm:	
5 µl 10 x Puffer	95 °C 30 sek (Initiale Denaturierung)	-
125 ng forward Primer	95 °C 30 sek (zyklische Denaturierung)	
125 ng reverse Primer	55 °C 1 min (Annealing)	12x
1 µl dNTPs	68 °C 6 min (Elongation)	
10 ng DNA	4 °C ∞	1
1 µl Pfu Turbo Polymerase		
Ad 50 μl dd H₂O		

Mit dem PCR Produkt wurde anschließend ein DpN1 Verdau für 1 h bei 37 °C durchgeführt, an den sich eine Transformation in *E.coli* anschloss. Ein Teil des transformierten *E-coli* Stamms wurde als Glycerin Stock bei – 80 °C weggefroren, ein Teil wurde vermehrt und für eine Maxi Präparation verwendet, mit der schließlich die Plasmide für spätere Transfektionen gewonnen wurden. Die gewonnene DNA Menge wurde mit dem Nanodrop ermittelt.

# 3.2.17 Generierung von stabil-transfizierten und induzierbaren ZO-2 Knockdown Zellen

Mit einem shRNAmir Konstrukt wurde ein induzierbares ZO-2 Knockdown-System stabil in MDA-MB231 transfiziert. Diese Zelllinie weist eine LASP-1 Überexprimierung auf und schien daher besonders geeignet die LASP-1 Lokalisation zwischen Wildtyp und ZO-2 Knockdown Zellen zu untersuchen.

Mit Hilfe eines lentiviralen Transduktionssystems wurden zuerst Viruspartikel in HEK293T Zellen produziert. Als Vektor für die Lentivirusproduktion diente der pTRIPZ Vektor der Firma OPEN BIOSYSTEMS (Abb. 3-2), der eine ZO-2 spezifische Knockdown-Sequenz enthielt. Anschließend konnten die Viren die MDA-MB231 Zellen transduzieren.

Bevor die HEK293T Zellen transfiziert wurden, wurden die pTRIPZ Vektoren per Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.



**Abbildung 3-2. pTRIPZ Lentiviraler Vektor.** Anstelle des shRNAmir Konstrukts war eine ZO-2 spezifische shRNAmir eingebaut. Die Expression des shRNAmir sowie von TurboRFP (tRFP) steht unter Kontrolle des Tetracyclin empfindlichen RNA Polymerase II Promoters (TRE, Tet responsive element). Unter Doxycyclin Einfluss interagiert TRE mit dem reversen Tetracyclin Transaktivator (rtTA3), der wiederum vom Ubiquitin Ligase C Promoter (UBC) reguliert wird. Weiterhin finden sich Resistenzen gegen die Antibiotika Zeocin (Zeo), Puromycin (IRES-Puro') und Ampicillin (Amp') sowie ein Transkript-stabilisierendes Element (WRE) und ein HIV Packsignal ( $\psi$ ). cPPT (central Polypurine tract) hilft bei der Kern-Translokation der Zellen. Flankiert wird das Konstrukt von Wiederholungselementen (5'LTR) und dem selbstinaktivierenden LTR Element (sinLTR). Der Origin (sv40 Ori) und der pUC Origin befinden sich außerhalb der LTrs. Quelle: http://www.openbiosystems.com/RNAi/shRNAmirLibraries/TRIPZlentiviralinducibleshR/

3.2.17.1 Virus Produktion und Infektion von MDA-MB231 Zellen

Die Virus Produktion wurde in HEK293T Zellen durchgeführt. Diese wurden zunächst in Passage 3 gebracht und dann in einer Konzentration von 5.5 x 10<sup>6</sup> Zellen in einer 100 mm Zellkulturschale ausgesät. Damit die Zellen besser am Schalenboden haften wurde dieser vorher mit Polylysin für 30 min beschichtet und 3 x mit PBS gewaschen. Am nächsten Tag konnte die Transfektion der Zellen mit CaCl<sub>2</sub> stattfinden. Dazu wurde 9 µg Plasmid DNA und 30 µl Packaging Mix mit ddH<sub>2</sub>O auf 450 µl Volumen aufgefüllt, gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Dann konnten 48 µl CaCl<sub>2</sub> zum Reaktionsansatz gegeben werden. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde 500 µl 2 x HBS Puffer vorgelegt. Der Reaktionsmix konnte nun tropfenweise zu dem HBS Puffer gegeben werden. Zum Durchmischen wurde die "Air Stream" Methode verwendet, bei der eine Pasteurpipette auf eine motorisierte Pipettierhilfe gesteckt und vorsichtig Luft in den Ansatz geblasen wird. Während der Ansatz noch 30 min bei RT inkubierte, wurde das Medium der HEK293T Zellen von Vollmedium (DMEM mit Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) auf nur DMEM Medium gewechselt. Nach Zugabe des Transfektionsgemischs konnten die Zellen 4 h im Wärmeschrank ruhen bevor wieder ein Mediumwechsel auf Vollmedium erfolgte.

Am nächsten Tag wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Am Tag drei der Transfektion wurde das Zellmedium geerntet, da die Viren von den Zellen ins Medium entlassen werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, steril filtriert und mit 10 µg/ml Polybrene versetzt. Anschließend konnte das Medium auf MDA-MB231 Zellen gegeben wurden, die zuvor in einer Konzentration von 6,5 x  $10^4$  in einer 24-Well Platte herangezogen wurden. Der gleiche Vorgang wurde an Tag vier wiederholt. Die restlichen Viren-haltigen Überstände wurden bei – 80 °C weggefroren.

Die infizierten MDA-MB231 Zellen wurden nach 2 Tagen mit Medium, inklusive 2 µg/ml Puromycin, versetzt. Über 10 Tage wurde das Medium alle zwei Tage durch frisches ersetzt. Zwischenzeitlich wurden die Zellen täglich unter dem Mikroskop kontrolliert. Nachdem alle Zellen, die nicht infiziert waren, abgestorben waren, wurden die verbliebenen Zellen über weitere 1,5 Wochen mit Vollmedium ohne Puromycin vermehrt. Die Zellen wurden erst auf 6-Well Platten und dann auf T25 Flaschen hochgesetzt bis schließlich genug Zellen zum Einfrieren vorhanden waren.

## 3.2.17.2 TurboRFP Induktion

Um den Transfektionserfolg der MDA-MB231 Zellen zu überprüfen, wurden diese in Medium mit 1 µg/ml Doxycyclin über 4 Tage kultiviert. Dabei wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt. Unter dem Mikroskop wurde die rote Fluoreszenz der transfizierten Zellen beobachtet. Der Knockdown von ZO-2 konnte mittels Western Blot bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen in 6-Well Platten vermehrt und in 3 x SDS-Stopp Puffer aufgenommen.

#### 3.2.18 Proliferationsassay

Um das Proliferationsverhalten zwischen MDA-MB231 Zellen mit und ohne ZO-2 Knockdown zu vergleichen, wurden die mit der shRNA transfizierten Zellen entweder mit oder ohne Doxycyclin kultiviert. Die Zellen wurden dazu in je 8 Vertiefungen einer 48 Well Platte ausgesät und für 3 Tage mit oder Doxycyclin im Medium wachsen gelassen. Danach wurde entsprechend des Protokolls des *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* von Promega die Lösungen MTS und PMS im Verhältnis 1:20 angesetzt und 40 µl des Gemischs pro Well zu den Zellen pipettiert. Nach weiteren 4 h im Brutschrank wurden die Platten bei 595 nm am ELISA Reader gemessen. Mit den gemessenen Werten wurde ein vergleichender t-Test mit dem Programm PASW statistics durchgeführt.

### 4 ERGEBNISSE

## 4.1 Phosphorylierungs-abhängiger Zellkernimport von LASP-1

Bereits bekannt ist, dass die Phosphorylierung von LASP-1 durch die PKA an Ser-146 den dynamischen Prozess der LASP-1 Lokalisation zwischen Zellkern und Zytosol reguliert. Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen von Forskolin stimulierten Brustkrebszelllinien (MDA-MB231 und BT-20) durchgeführt. Forskolin erhöht über die Adenylylcyklase den cAMP Spiegel und aktiviert dadurch die PKA, so dass durch Inkubation mit dieser Chemikalie der Anteil an phophorylierten LASP (pLASP) in der Zelle erhöht wird.

Nach Stimulation mit Forskolin wurde eine Zellkern/Zytosol-Auftrennung mit dem *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* Kit von Pierce durchgeführt und die so gewonnenen Fraktionen im Western Blot untersucht. Zur Überprüfung auf Verunreinigung der einen Fraktion mit der anderen erfolgte eine Kontrolle mit einem Antikörper gegen das kernspezifische Protein Lamin A und C und einem Antikörper gegen die nur im Zytosol vorkommende Glycerinaldehyd-3-Phosphatase (GAPDH). Wie in Abbildung 4-1 zu erkennen ist, war die Aufreinigung frei von Kreuzkontamination. Bei den Kontrollzellen ist LASP-1 so gut wie nicht im Kern erkennbar, jedoch erhöht sich der nukleare LASP-1 Anteil schon nach einer 5-minütigen Forskolin Stimulation deutlich. Auch mit dem pLASP Antikörper, der spezifisch gegen das phosphorylierte Ser-146 gerichtet ist, ist eine starke Zunahme im Zytosol und im Kern zu beobachten, die nach 60-minütiger Forskolin-Stimulation ihren Höhepunkt erreicht.



Abbildung 4-1 Nukleare LASP-1 Menge steigt nach Phosphorylierung. Western Blot des LASP-1/pLASP Proteinlevels in Kern (K)- und Zytosol (Z)-Fraktionen von MDA-MB231 Zellen nach verschiedenen Forskolin Inkubationszeiten. Die Reinheit der Kern- und Zytosolfraktionen wurden mit GAPDH und Lamin überprüft

Weiterhin wurden mit dem ProteoJET<sup>™</sup> Membrane Protein Extraction Kit Membran-Zytosol- Auftrennungen von MDA-MB231 Zellen durchgeführt. Verglichen wurden die Fraktionen von Zellen mit und ohne Forskolin Inkubation. Allerdings blieb die LASP-1 Lokalisation davon unbeeindruckt. LASP-1 konnte in allen Proben hauptsächlich im Zytosol nachgewiesen werden und nur zu einem geringen Teil in der membranären Fraktion (Ergebnisse nicht gezeigt).

# 4.2 LASP-1 enthält ein NES Signal

LASP-1 ist hauptsächlich an den fokalen Kontakten einer Zelle nachweisbar, kann aber auch im Zellkern detektiert werden. Unklar war bisher jedoch, wie LASP-1 in den Zellkern gelangt und wieder hinaus transportiert wird. Um den Export genauer zu untersuchen, wurden MDA-MB231 Zellen zunächst mit dem spezifischen CRM-1 Inhibitor Leptomycin B (LepB) behandelt. Das Protein CRM-1 bindet an nukleare Exportsequenzen (NES) eines Proteins und transportiert es dadurch aus dem Kern ins Zytosol. Nach der LepB Behandlung wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Wie erwartet, zeigte sich LASP-1 in unbehandelten Zellen vor allem an den fokalen Kontakten. Bei Zellen, die mit LepB behandelt wurden, konnte jedoch eine deutliche Akkumulation von LASP-1 im Zellkern beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass LASP-1 eine nukleare Exportsequenz enthält (Abb. 4-2 A). NES Sequenzen sind konservierte, Leucin-reiche Sequenzen mit dem allgemeinen Schema X-RRKKK-X (X= beliebiges Protein). Daher wurde mit einem Programm, dass NES Sequenzen in Proteinen vorhersagen kann, die Proteinsequenz von LASP-1 untersucht (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES-1.1). Tatsächlich hat das Programm eine mögliche Stelle um die Aminosäure Leucin-74 (NLRL<sup>74</sup>KQQ) identifiziert (Abb. 4-2 B).



**Abbildung 4-2 LASP-1 hat eine NES. A** MDA-MB231 Zellen wurden für 3 h mit 20 nM LepB behandelt, fixiert und dann für LASP-1 gefärbt. Deutlich lässt sich die Zunahme von LASP-1 im Kern von LepB behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen erkennen. **B** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von LASP-1 mit den Phosphorylierungsstellen Serin 146 und Tyrosin 171 und dem NES. Größenbalken 20 µm.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Stelle wirklich um eine NES Sequenz handelt, wurde mittels des *QuickChange Site-directed Mutagenese* Kit von Stratagene die mutmaßlich wichtige Aminosäure Leucin 74 durch ein Alanin ersetzt (LASP-L74A). Durch diese Mutation sollte das NES nicht mehr von CRM-1 erkannt und so der nukleare Export verhindert werden. Wildtyp LASP (wt LASP) und LASP-L74A wurden beide in pcDNA3 Expressionsvektoren einkloniert und in Ptk2 Zellen exprimiert, um die Zelllokalisation der Proteine zu analysieren. Ptk2 Zellen enthalten von Natur aus wenig LASP-1 und waren deswegen gut geeignet um eventuelle Unterschiede der Lokalisationen der LASP-1 Varianten ausfindig zu machen. Die transfizierten Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz und Western Blot Analysen untersucht.

Die Immunfluoreszenz der mit wt LASP transfizierten Zellen in Abbildung 4-3 zeigt eine zytosolische LASP-1 Verteilung (Abb. 4-3 A). Nachdem diese Zellen mit LASP L74A transfiziert wurden, zeigte sich eine deutliche Akkumulation von LASP-1 im Zellkern (Abb. 4-3 B). Das gleiche Bild ergibt sich bei den Zellen, die zur Kontrolle mit LepB inkubiert wurden (Abb. 4-3 C). Um das Ergebnis zu stützen, wurden Zellkern/Zytosol- Auftrennungen der jeweilig behandelten Zellen durchgeführt (Abb. 4-3 D). Auch hier zeichnet sich das gleiche Bild ab: bei den untransfizierten Ptk2 Zellen ist nur wenig zytosolisches LASP-1 vorhanden, während die Zellen, die mit dem Wildtyp transfiziert wurden, viel LASP-1 im Zytosol und sehr wenig im Zellkern aufweisen. Nachdem diese Zellen mit Leptomycin B behandelt wurden, stieg der nukleare Anteil von LASP-1 signifikant an. Am größten war der nukleare LASP-1 Anteil bei Zellen, die mit der Mutante L74A transfiziert wurden. Als Ladungskontrolle diente ein Aktin Blot.



Abbildung 4-3 Leucin 74 gehört zum NES von LASP-1. A-C Ptk2 Zellen wurden mit LASP-1 Wildtyp oder der LASP-1 Mutante L74A transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die wt-LASP exprimierenden Zellen für 30 min mit LepB behandelt. Danach wurden Immunfluoreszenzen der Zellen angefertigt. Bei den LepB behandelten und den LASP L74A exprimierenden Zellen ist eine signifikante nukleare Akkumulation von LASP-1 gegenüber den unbehandelten Zellen zu sehen. Größenbalken 20  $\mu$ m A<sup>-</sup>-C<sup>-</sup> F-Aktin-Färbungen zu den LASP-1 Färbungen in transfizierten Ptk-2 Zellen, angefärbt mit Phalloidin Grün. Die weißen Pfeile zeigen nicht-transfizierte Zellen an. D Western Blot von LASP-1 und F-Aktin (Ladekontrolle) in Kern (K) bzw. Zytosolfraktionen (Z), vor (Basal) und nach Transfektion mit wt LASP (+wt), mit wt LASP und anschließender Leptomycin B Inkubation (+LepB) und mit der LASP-1 Mutante L74A (+NES). Auch hier ist, wie bei der Immunfluoreszenz, eine steigende LASP-1 Anreicherung im Kern nach LepB Inkubation und LASP-1 L74A Transfektion zu detektieren. Größenbalken 20  $\mu$ m.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass LASP-1 durch einen CRM-1 vermittelten Exportmechanismus aus dem Zellkern ins Zytosol gelangt. Daher wurde versucht, eine direkte Bindung zwischen LASP-1 und CRM1 mittels Pulldown und Immunpräzipitation in MDA-MB231 Zellen nachzuweisen. Für die Pulldown Experimente wurden LASP-1-GST Beads und GST Beads zur Kontrolle (siehe Kapitel 4.3) mit Zelllysat inkubiert und anschließend per Western Blot auf eine CRM1 Bindung analysiert. Dabei musste festgestellt werden, dass CRM1 auch an GST allein bindet und daher der Pulldown keine geeignete Methode für den Nachweis der direkten Bindung von LASP-1 an CRM1 darstellt (Abb. 4-4). Der CRM1 Antikörper eignete sich nicht für Co-IPs, denn es konnten auch keine bekannten Bindungspartner von CRM1 präzipitiert werden. Die LASP-1 Antikörper sind ebenfalls nicht IP geeignet, so konnte die CRM1-LASP-1 Bindung nur indirekt über den Exportmechanismus aufgeklärt werden.



Abbildung 4-4 Western Blot eines LASP-GST Pulldown in MDA-MB231 Homogenaten. Die Zelllysate wurden 2 h entweder mit GST oder LASP-1-GST Beads inkubiert. Im Western Blot wurde die CRM1 Bindung untersucht. CRM1 bindet auch an die GST Kontroll-Beads, daher kann die direkte Interaktion von LASP-1 und CRM1 nicht nachgewiesen werden.

### 4.3 Identifizierung von neuen LASP-1 Bindungspartnern

Nachdem der Kern-Export des LASP-1 Proteins aufgeklärt werden konnte, wurde als nächstes der Kern-Import untersucht. Da LASP-1 selbst nicht über ein Kernimport-Signal verfügt (NLS), welches der übliche Importweg eines Kernproteins ist, benötigt es einen Partner. Dieser sollte mittels Pulldown Experimenten identifiziert werden.

Dazu wurde GST-LASP-1 in *E.coli* Zellen überexprimert und über GSH-Sepharose Beads affinitätschromatografisch aufgereinigt. Die Klonierung von GST-LASP-1 gelang über den pGEX Vektor, der das GST Gen direkt vor dem LASP-1 Gen liegen hat, so dass bei der Expression ein Fusionsprotein entsteht.

Als Ergebnis der Aufreinigung erhält man Beads, an die über GSH das Fusionsprotein gebunden hat. Mit diesen Beads konnten nun Pulldown Experimente in Blutplättchenlysaten durchgeführt werden. Dabei wurden 0,5 µg LASP-1-GST-Beads sowie als Kontrolle 0,5 µg GST-Beads zu den vorgereinigten Lysaten gegeben und einige Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads durch Zentrifugation sedimentiert und gewaschen um sie von nicht-gebundenen Proteinen zu befreien. So erhielt man am Schluss Beads an denen das Fusionsprotein und die dazugehörigen Bindungspartner gebunden waren. Durch Aufkochen in SDS-Stopp Puffer wurden die Bindungen zwischen GSH und GST sowie zwischen dem Fusionsprotein und seinen gebundenen Partnern gebrochen. Die Proben konnten daher mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Nach der Auftrennung wurden die Gele kolloidal gefärbt und analysiert. Bei der Analyse der Gele wurden nun die Banden der Pulldowns von Kontroll-GST und GST-LASP verglichen. Die Banden, die bei beiden Pulldowns identisch sind, waren unspezifischen Bindungen an GST zuzuschreiben (Abb. 4-5 A) und wurden nicht weiter aufgearbeitet. Die GST-LASP-1 spezifischen Banden wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und nach Dortmund zur Massenspektrometrie gesendet. Dort wurden die Proteine in den Banden identifiziert (Abb. 4-5 B). Dabei wurden Aktin, Zyxin, Dynamin 1 und Dynamin 2 gefunden, vier Proteine die als LASP-1 Bindungspartner bereits bekannt sind. Weiterhin konnten die Proteine Thrombospondin-1 und das 170 kDa Protein ZO-2 (zona occludens protein 2) identifiziert werden, zwei bisher unbekannte LASP-1 Interaktionsproteine.



Abbildung 4-5 Kolloidal gefärbtes Gel eines LASP-GST Pulldowns in Plättchenlysaten. A 0,5 µg GST bzw. GST-LASP Beads wurden in Plättchenlysate gegeben und für einige Stunden im Überkopfschüttler gedreht. Danach wurden die Beads sedimentiert und der Überstand abgenommen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben in SDS-Stopp Puffer für 5 min aufgekocht. Die Banden in der GST Beads Spur sind unspezifische Bindungen an GST oder die Beads. B Massenspekrometrisch identifizierte Proteine eines LASP-GST Pulldowns in Blutplättchen. Es wurden bekannte LASP-1 Bindungspartner wie Dynamin-1 und 2, Zyxin und Aktin gefunden, aber auch ZO-2 und Thrombospondin-1, bei denen eine Interaktion mit LASP-1 bisher unbekannt war.

# 4.4 Verifizierung des neu identifizierten möglichen LASP-1 Bindungspartners ZO-2 und der LASP-1 Interaktionsdomäne

Zur Verifizierung der möglichen LASP-1 Bindungspartner ZO-2 und Thrombospondin-1 wurden mehrere Pulldowns in Blutplättchen- und MDA-MB231 Zelllysaten vorgenommen und per Western Blot untersucht. Dabei wurden nicht nur GST-LASP wt Beads sondern auch GST-LASP  $\Delta$ LIM (fehlende LIM Domäne) und GST-LASP  $\Delta$ SH3 (fehlende SH3 Domäne) verwendet. Mit diesen Mutanten sollte die Interaktionsdomäne innerhalb des LASP-1 Proteins nachgewiesen werden. Thrombospondin-1 ließ sich per Western Blot in keinem Pulldown nachweisen und konnte daher nicht als LASP-1 Bindungspartner bestätigt werden.

In Abbildung 4-6 ist ein Western Blot mit Wildtyp LASP und den Mutanten zu sehen. Anhand der abgebildeten Coomassie Färbung kann gezeigt werden, dass für alle Pulldowns die gleichen Proteinmengen eingesetzt wurden. Als positiv-Kontrolle wurden die Pulldowns auf Zyxin, LPP und Aktin untersucht. Aktin bindet unspezifisch auch an die Kontrollbeads, während Zyxin und LPP nur an den LASP wt und LASP  $\Delta$ LIM Beads binden. Für Zyxin und LPP ist bekannt, dass sie mit ihrer prolinreichen Domänen an die SH3 Domäne von LASP binden. Der neue LASP-1 Interaktionspartner ZO-2 zeigt das gleiche Bindungsverhalten wie LPP und Zyxin und bindet ebenfalls nur am LASP Wildtyp und der  $\Delta$ LIM Mutante.



Abbildung 4-6 Western Blot eines GST-LASP Pulldowns in MDA-MB231 Zellen. Das Zellhomogenat wurde mit GST, GST-LASP, GST-LASP  $\Delta$ LIM und GST-LASP  $\Delta$ SH3 Beads inkubiert. Die Coomassie Färbung zeigt, dass für jeden Pulldown gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Aktin bindet auch an den Kontroll GST Beads, während Zyxin, LPP und ZO-2 nur an den LASP wt und  $\Delta$ LIM Beads binden.

Um die Bindung von LASP-1 zu ZO-2 weiter zu charakterisieren, wurden Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) durchgeführt. Bei dieser Methode wurde der ZO-2 monoklonale Antikörper in Homogenate von MDA-MB231 oder Blutplättchen gegeben und für einige Stunden bzw. über Nacht inkubiert. Als nächstes wurden Protein A/G beschichtete Sepharose Beads dazugegeben. Diese binden an IgG Antikörper und wurden auch zur Vorreinigung des Lysats verwendet, so dass alle unspezifisch an den Beads bindende Proteine vorab entfernt wurden. Nach 2 Stunden Inkubation der Beads mit dem Homogenat wurde der Komplex aus gebundenem Antikörper, ZO-2 und die ZO-2 Bindungspartner durch Zentrifugation präzipitiert und per Western Blot auf gebundene Proteine untersucht (Abb. 4-7). Als Kontrolle wurde der Versuch parallel mit einem unspezifischen Maus IgG Mix durchgeführt, so dass Sicherheit bestand, dass ZO-2 oder LASP-1 nicht unspezifisch am Antikörper binden. In Abbildung 4-7 ist zu erkennen, dass sich im Überstand der abzentrifugierten Präzipitate ZO-2 und LASP-1 befinden. Aber auch an den Beads lagen ZO-2 und LASP-1 gebunden vor, was einen weiteren Nachweis der direkten Interaktion von ZO-2 und LASP-1 darstellt.

Die Co-IP wurde auch vice versa mit einem LASP-1 Antikörper versucht, um aus den Zelllysaten LASP-1 mit gebundenem ZO-2 zu präzipitieren. Dabei wurde sowohl der polyklonale als auch der monoklonale LASP-1 Antikörper getestet. Beide Antikörper eignen sich jedoch nicht für eine Co-IP, denn sie blockieren mit ihrer Bindung an LASP-1 die SH3 Domäne, die LASP zur Bindung an seine Partner benötigt. Daher konnten keine LASP-1 Bindungspartner wie LPP, Zyxin oder ZO-2 ko-präzipitiert werden.

#### Überstand Beads



Abbildung 4-7 Co-Immunpräzipitation von LASP-1 und ZO-2 in MDA-MB 231 Zellen. Maus IgG Kontroll Antikörper und ZO-2 Antikörper wurden über Nacht in Zelllysat inkubiert und am nächsten Tag mit Hilfe von Protein A/G Beads präzipitiert. Dabei konnte LASP-1 nachgewiesen werden.

Auch der Lokalisation von ZO-2 und LASP-1 in der Zelle wurde mit Immunfluoreszenzen überprüft. Dazu wurden fixierte MDA-MB231 Zellen und Blutplättchen mit dem monoklonalen ZO-2 und dem polyklonalen LASP-1 Antikörper inkubiert. Im zweiten Schritt wurde ZO-2 grün und LASP-1 rot angefärbt. Wie in Abbildung 4-8 A zu erkennen ist, zeigen beide Proteine die gleiche Verteilung in den MDA-MB231 Zellen. So kann man eine deutliche Kolokalisation im Bereich der fokalen Kontakte, aber auch entlang der Aktin-Fasern beobachten. Dies ist vor allem in der ZO-2 Aufnahme erkennbar, wo durch das Überlagern der roten LASP-1 Färbung und der grünen ZO-2 Färbung gelbe Bereiche entstehen. Auch in Blutplättchen (Abb. 4-8 B) sind LASP-1 und ZO-2 kolokalisiert, dies lässt sich in den orangen Bereichen im Overlay erkennen. Die Plättchen wurden auf Fibrinogen beschichteten Deckgläschen fixiert und lagen deswegen im aktivierten Zustand vor. ZO-2 liegt sowohl an der äußeren Membran als auch im Zytosol der Plättchen vor, LASP-1 ist ebenfalls im Zytosol detektierbar.



Abbildung 4-8 Immunfluoreszenzfärbung von LASP-1 und ZO-2 in MDA-MB231 Zellen und Blutplättchen. A LASP und ZO-2 sind kolokalisiert, was vor allem an den gelben Bereichen in der ZO-2 Färbung zu erkennen ist. B Auch in Blutplättchen zeigt sich im Overlay in gelben Bereichen eine Kolokalisation von ZO-2 und LASP-1.

# 4.5 Identifizierung der LASP-1 Interaktionsstelle in der ZO-2 Sequenz

ZO-2 bindet an die SH3 Domäne von LASP-1. SH3 Domänen binden typischerweise an Prolin-reiche Domänen mit dem charakteristischen PPxP Motiv, wobei P ein Prolin und x eine hydrophobe Aminosäure ist (Ferraro, Peluso et al. 2007). Mit dem SH3 Hunter Programm (<u>http://cbm.bio.uniroma2.it/SH3-Hunter</u>) wurde die ZO-2 Sequenz nach Prolin-reichen Domänen überprüft, dabei fand das Programm am C-Terminus zwei mögliche SH3 bindende Stellen: KPDPGPT (Aminosäure 1103-1109) und PPEPQK (Aminosäure 1116-1121). Um den Einfluss dieser beiden Stellen auf die LASP-1 Bindung zu überprüfen, sollten Mutanten hergestellt werden, die einen Austausch der entscheidenden Proline durch Alanine enthalten. Dazu wurde zunächst das ZO-2 Gen in einem pGEX Vektor kloniert und versucht es in *E.coli* zu exprimieren. Dies gelangt jedoch nicht, da ZO-2 mit 170 kDa ein sehr großes Protein ist. Verschiedene Versuchsreihen zur Expression, zum Beispiel unterschiedliche Temperaturen und Induktionszeiten, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Daher wurde das ZO-2 Gen (Isoform C1) in zwei Teile fragmentiert: den N-Terminus, der von der Aminosäure 1 bis Aminosäure 878 ging (im folgenden N-Term genannt) und den C-Terminus, der von der Aminosäure 878 bis zur letzten Aminosäure 1137 ging (im folgenden C-Term genannt). Die beiden ZO-2 Teile wurden dann in den pcDNA3 Vektor kloniert und mit dem QuickChange site-directed Mutagenese Kit wurde in dem C-Term Fragment Prolin 1106 und Prolin 1116 zu Alanin geändert (P1106A und P1116A) sowie ein Doppelmutante hergestellt (P1106A/P1116A). Diese ZO-2 Fragmente und Mutanten wurden anschließend in HEK293T Zellen mit Hilfe des Reagenz Metafectene transfiziert und exprimiert. Mit den gewonnen HEK293T Lysaten konnten nun LASP-GST Pulldowns durchgeführt und per Western Blot auf die Bindung der Mutanten an LASP-1 untersucht werden (Abb. 4-9). Dabei ergab sich folgendes Bild: LASP-1 bindet am Wildtyp des C-Term Fragments, nicht aber am N-Term, so dass die Bindestelle von ZO-2 an LASP-1 im Bereich der Aminosäuren 878-1137 liegen muss. Innerhalb dieses Fragments bindet LASP-1 an der P1116A Mutante und nicht an der P1106A- und der Doppel-Mutante, woraus folgt, dass die LASP-1 SH3 Erkennungsstelle im Bereich der Prolin-reichen Sequenz von Aminosäuren 1103-1109 im ZO-2 Gen liegt.



Abbildung 4-9 Western Blot eines LASP-1 Pulldowns in mit ZO-2 Mutanten transfizierten HEK293T Zellen. Die Zellhomogenate wurden mit GST-LASP Beads inkubiert und diese auf Bindung von den ZO-2 Mutanten untersucht. Am LASP-1 bzw. ZO-2 Input lässt sich erkennen, dass die Ausgangsmengen von ZO-2 und LASP-1 in allen vier Proben gleich waren. LASP-1 bindet am Wildtyp

des C-Terms sowie an der P1116A Mutante. Nicht gebunden wird die P1106A Mutante, die Doppelmutante P1106A/P1116A und der N-Term.

# 4.6 Einfluss der Ser-146 Phosphorylierung auf die Bindung von LPP, Zyxin und ZO-2

Eine mögliche Verbindung zwischen der LASP-1 Phosphorylierung an Ser- 146 durch die PKA und die Interaktion mit den Bindungspartnern wurde mit GST Pulldown Experimenten mit wt LASP und mit vorher *in vitro* phosphoryliertem LASP überprüft. Zusätzlich wurde noch die Phosphomimikry Mutante LASP-S146D verwendet. Dabei täuschte das Aspartat eine Phosphorylierung an Ser-146 vor. Der pGEX-4T1 Vektor mit LASP-S146D-GST war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden (Butt, Gambaryan et al. 2003).

Die Pulldown Experimente wurden in Thrombozyten-Lysaten durchgeführt. Die LASP-1 GST Beads wurden zunächst in 2 Ansätze geteilt. Einer blieb unbehandelt, der andere wurde in Phosphorylierungspuffer mit der C-Untereinheit der PKA und ATP für 30 min inkubiert. Zusätzlich zu den phosphorylierten LASP-1 GST Beads wurden 10 µM von dem Phosphatasehemmer Calyculin A in das Lysat gegeben, um eine vorzeitige Dephosphorylierung zu verhindern. Die Auswertung der Pulldowns erfolgte mit Western Blots gegen Zyxin, LPP und ZO-2 (Abb. 4-10). Dabei konnte gezeigt werden, dass am Wildtyp LASP alle Bindungspartner binden, während das phosphorylierte LASP-1 als auch die Phosphorimikry Mutante eine stark verringerte Bindung an Zyxin und LPP aufweisen. Diese Beobachtung gilt nicht für ZO-2, denn dieses Protein lässt sich vom LASP-1 Phosphorylierungsstatus nicht beeinflussen und bindet an alle drei LASP-1 Varianten gleich gut.



Abbildung 4-10 Phosphorylierungsabhängige Bindung von LASP-1 an Zyxin, LPP und ZO-2. Plättchen-Lysate wurden mit wt LASP, in-vitro phosphoryliertem (pLASP) und mit der Phosphomimikry Variante S146D inkubiert. Diese wird interessanterweise auch vom pLASP Antikörper erkannt, wenn auch mit verringerter Affinität. An die Kontroll-GST-Beads bindet kein Bindungspartner von LASP. Zyxin und LPP binden am LASP Wildtyp, aber nicht am Ser-146 phosphoryliertem LASP oder an der Mimikry-Mutante. ZO-2 hingegen bindet an allen LASP-1 Varianten gleich gut.

## 4.7 Lokalisation von ZO-2 in LASP-1 Knockout Zellen

In der Arbeitsgruppe vorhandene LASP-1 defiziente Mäuse wurden genutzt, um die ZO-2 Lokalisation in Abwesenheit von LASP-1 zu untersuchen. Dafür wurden MEF (mouse embryonic fibroblasts) Zellen aus den Mäusen isoliert und Immunfluoreszenzen auf LASP-1 und ZO-2 durchgeführt (Abb. 4-11). In Wildtyp MEF Zellen sind LASP-1 sowie ZO-2 vor allem entlang den Aktin Stressfasern und an den fokalen Kontakten lokalisiert. Eine gelbliche Färbung in der ZO-2 Immunfluoreszenz (Abb. 4-11) zeigt eine Kolokalisation der beiden Proteine an. Hingegen ist in den Knockout Zellen kein LASP-1 exprimiert und daher auch nicht detektierbar, ebenfalls ändert sich in diesen Zellen die ZO-2 Lokalisation. Im Vergleich zu den Wildtyp Zellen ist ZO-2 nicht mehr an den fokalen Kontakten zu finden sondern verteilt sich diffus im Zytosol und im Zellkern.



**Abbildung 4-11 Immunfluoreszenzfärbung von MEF Wildtyp und LASP-1 Knockdown Zellen.** Die Zellen wurden aus LASP-1 <sup>+</sup>/<sup>+</sup> und LASP-1 <sup>-</sup>/<sup>-</sup> Mäusen isoliert und mit LASP-1 und ZO-2 Antikörpern angefärbt. In den Knockdown Zellen wird kein LASP exprimiert und auch die ZO-2 Verteilung erscheint diffus.

# 4.8 Lokalisation von LASP-1 in MDA-MB231 Zellen mit stabilem ZO-2 Knockdown

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass LASP-1 einen direkten Bindungspartner von ZO-2 darstellt und auch die zelluläre Lokalisation von den beiden Proteinen miteinander verknüpft ist. Nach einer Forskolin Stimulation von MDA-MB 231 Zellen wird LASP-1 phosphoryliert und weist eine Translokation in den Zellkern auf. Auch ZO-2 zeigt eine erhöhte Zellkern- Akkumulation nach Forskolin Stimulation, was auf einen gemeinsamen Regulationsmechanismus hindeutet (Abb. 4-12).



Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen, wurden mittels eines lentiviralen Transfektionssytems stabile, mit ZO-2 shRNA transfizierte MDA-MB231 Zellen

erzeugt, die einen induzierbaren Knockdown von ZO-2 aufweisen. Zuerst wurden HEK293T Zellen mit dem pTRIPZ Vektor transfiziert. Die HEK Zellen produzierten daraufhin den Lentivirus, der ins Medium abgegeben wurde. Dieses Medium konnte dann auf MDA-MB231 Zellen gegeben werden, so dass die Viren die Zellen befallen und ihr Erbgut in das der MDA-MB231 Zellen integriert wird. Durch eine nachfolgende Puromycin Selektion überlebten nur die Zellen, bei denen der pTRIPZ Vektor erfolgreich ins Genom eingebaut werden konnte. Diese Zellen wurden dann vermehrt und schließlich mit Doxycyclin-haltigem Medium inkubiert. Durch die Induktion mit Doxycyclin wird neben der ZO-2 shRNA auch TurboRFP aktiv, das unter dem Fluoreszenzmikroskop rot sichtbar ist (Abb. 4-13 A). So konnte die Transfektionseffizienz und die Induktion der ZO-2 shRNA unter dem Mikroskop nachverfolgt werden. Auch im Western Blot gegen ZO-2 wurde der Knockdown untersucht. Es konnte eine Proteinrunterregulation von über 90 % erreicht werden (Abb. 4-13 B).





**Abbildung 4-13 MDA-MB231, stabil transfiziert mit ZO-2 sh RNA. A** Nach Zugabe von 0,5 µg/ml Doxycyclin ins Medium leuchten die transfizierten Zellen durch die TurboRFP Induktion rot. **B** Western Blot von transfizierten MDA-MB231 Zellen ohne (Kontrolle) und mit Doxycyclin im Medium. ZO-2 wird unter Doxycyclin Einfluss nahezu komplett ausgeschalten. Aktin dient als Ladekontrolle.

Die MDA-MB231 ZO-2 shRNA Zellen wurden nun mit Forskolin stimuliert, um die LASP-1 Lokalisation zwischen Zellen mit und ohne ZO-2 Knockdown zu vergleichen. Dazu wurden die Zellen für 2 Tage +/- Doxycyclin kultiviert, für 20 min mit Forskolin stimuliert und anschließend eine Zellkern/Zytosoltrennung durchgeführt. Die Proben wurden per Western Blot auf ZO-2 und pLASP analysiert (Abb. 4-14). In den Zellen, die ohne Doxycyclin gewachsen sind und die keinen ZO-2 Knockdown aufweisen, ist pLASP nach der Aktivierung der PKA durch Forskolin auch im Zellkern detektierbar.

Hingegen befindet sich in den Zellkernen der Zellen mit einem ZO-2 Knockdown nahezu kein pLASP.



Abbildung 4-14 Kern/Zytosoltrennung in MDA-MB231 ZO-2 shRNA Zellen vor und nach ZO-2 Knockdown. Nach Doxycyclin Inkubation ist ZO-2 deutlich herunterreguliert. In Zellen mit ZO-2 ist nach einer 20 minütigen Stimulation durch Forskolin eine vermehrte Lokalisation von pLASP im Zellkern zu beobachten. Ohne ZO-2 hingegen ist pLASP nach Forskolin-Stimulation kaum im Zellkern zu detektieren.

# 4.9 Proliferationsverhalten von MDA-MB231 Zellen mit stabilem ZO-2 Knockdown

Mit dem Proliferationsassay *CellTiter 96*® *Aqueous Non-Radioactive Cell* von Promega wurde die Proliferation von ZO-2 shRNA stabil transfizierten MDA-MB231 Zellen mit und ohne Doxycyclin Induktion gemessen und verglichen. Die ZO-2 Knockdown Zellen wurden 4 Tage mit Doxycyclin im Medium kultiviert, bevor sie für den Versuch verwendet wurden. Es wurden insgesamt 3 Assays mit einmal 7 und zweimal 8 Proben durchgeführt. Die Proben wurden statistisch mit dem t-Test für Mittelwertsgleichheit ausgewertet. Dabei konnte bei allen 3 Versuchen eine Proliferationshemmung mit hoher Signifikanz ( $p \le 0,001$ ) zwischen den ZO-2 Knockdown Zellen wachsen signifikant langsamer als solche, die ZO-2 exprimieren.

**Tabelle 1 Messwerte und Signifikanz** *p* von drei Proliferationsassays von MDA-MB231 Kontrollund ZO-2 Knockdown Zellen. Die Proben wurden bei 595 nm gemessen und mittels t-Test für Mittelwertsgleichheit ausgewertet. Alle errechneten Signifikanzen liegen unter 0,001. Damit unterscheiden sich die Werte zwischen den Wildtyp (wt) und Knockdown (KD) Zellen hoch signifikant.

Versuchs		Werte								Mittel	Signifi	
nummer											werte	kanz p
	wt	0,80	0,73	0,75	0,79	0,80	0,74	0,76	0,80		0,77	0,0005
1	KD	0,72	0,70	0,65	0,73	0,66	0,66	0,68	0,72		0,69	
	wt	0,92	0,86	0,86	0,86	0,86	0,81	0,86	0,96	0,92	0,87	0,00004

2	KD	0,72	0,71	0,68	0,72	0,69	0,70	0,72	0,75	0,72	0,71	
	wt	0,77	0,76	0,77	0,76	0,76	0,71	0,73	0,73	0,77	0,75	0,00000
3	KD	0,58	0,55	0,55	0,55	0,49	0,44	0,59	0,58	0,58	0,54	5

# 4.10 Nachweis der direkten Bindung von ZO-2 und LASP-1 im Zellkern

Um die direkte oder indirekte Bindung zwischen LASP-1 und ZO-2 zu untersuchen, wurden Duolink® proximity ligation assays (PLA) der Firma O-Link Bioscience durchgeführt. Mit dieser Methode erzeugen nur direkt interagierende Proteine ein rotes Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop, da im ersten Schritt zwei hochspezifische Antikörper gegen die beiden zu untersuchenden Proteine eingesetzt werden und im zweiten Schritt die sekundären Antikörper (PLA Proben), an denen Oligonukleotide gebunden sind, nur ligiert werden wenn sie in unmittelbarer Nachbarschaft vorliegen. Nach der Ligation folgen kreisförmige Amplifikationen. Die dabei entstehenden Replikate werden von Fluoreszenz-markierten Sonden gebunden und können somit unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dabei ergibt jedes Heterodimer einen roten Punkt (Soderberg, Gullberg et al. 2006). In Abbildung 4-15 sind MDA-MB231 Zellen zu sehen, die mit Erstantikörpern gegen LASP, ZO-2, LPP und Zyxin inkubiert worden. Das Aktinskelett der Zellen wurde mit Phalloidin grün gefärbt und die Zellkerne erscheinen durch eine DAPI Färbung blau. Im Bild LASP/ZO-2 sind viele rote Punkte, also LASP-1/ZO-2 Heterodimere entlang der fokalen Kontakte, aber auch im Zellkern zu sehen. Auch der LASP-LPP Komplex zeigt, neben der erwarteten zytosolischen Verteilung, eine nukleäre Lokalisation. LASP und Zyxin hingegen liegen gebunden nur im Zytosol an den fokalen Kontakten und perinukleär vor. Um die Spezifität und Sensitivität des Essays nachzuweisen, wurde als negative Kontrolle außerdem noch LASP/IKBa untersucht. Die beiden Proteine interagieren nicht, demnach sind auch keine roten Punkte in den so gefärbten Zellen erkennbar.



**Abbildung 4-15** *In situ* Immunfluoreszenz in MDA-MB231 Zellen zur Detektion von LASP-1/Proteinkomplexen mittels PLA. Die LASP-1/Bindungspartner Heterodimere wurden durch Färben der Zellen mit Erstantikörpern gegen ZO-2, LPP, Zyxin und IKBα, dann mit PLA Sekundärantikörpern und anschließender Ligation und Amplifikation der Oligonukleotide sichtbar gemacht. Jeder rote Punkt repräsentiert dabei eine Proteininteraktion. Das Zytoskelett wurde mit Phalloidin grün, die Zellkerne mit DAPI blau gefärbt. Größenbalken 20 μm.

In Abbildung 4-15 sind LASP-ZO-2 Komplexe im Bereich des Zellkerns zu sehen. Anhand der Abbildung kann jedoch nicht sicher bestimmt werden, ob die Proteine nur auf dem Zellkern aufliegen oder sich wirklich im Zellkern befinden. Um die nukleäre Lokalisation zu bestätigen, wurde ein Z-Stack mit einem konfokalen Mikroskop durch den Zellkern einer MDA-MB231 Zelle durchgeführt. Dabei fotografiert das Mikroskop in einem bestimmten Abstand Ebenen vertikal durch die Zelle (Abb. 4-16). Die roten Punkte der LASP/ZO-2 Färbung sind dabei in jeder Ebene zu finden: sie tauchen bei der Analyse von oben nach unten durch den Zellkern periodisch auf und verschwinden wieder. Damit ist nachgewiesen, dass die Heterodimere im Kern lokalisiert sind und diesen nicht nur überlagern.



Z-stack 0.0 µm

Z-stack 0.58 µm

Z-stack 1.16 µm

Z-stack 2.33 µm

**Abbildung 4-16 Z-Stack einer MDA-MB231 Zelle, anfärbt mit PLA gegen LASP-1 und ZO-2.** Die Lokalisation von LASP-1/ZO-2 Komplexen wurde in 4 vertikal aufgenommenen Ebenen einer Zelle mittels eines konfokalen Mikroskops untersucht. Die LASP-1/ZO-2 Interaktionen sind durch rote Punkte gekennzeichnet und können in jeder aufgenommenen Ebene im Zellkern detektiert werden. Die Zellkerne sind durch DAPI blau gefärbt. Größenbalken: 10 μm.

Zur weiteren Untersuchung der phosphorylierungsabhängigen Bindung von LASP-1 an seine Interaktionspartner wurden PLA Essays mit Antikörpern gegen das Ser-146 in phosphorylierter (pLASP) und unphosphorylierter (dpLASP) Form sowie gegen ZO-2 und LPP durchgeführt (Abb. 4-17). Dabei sind die Heterodimere aus pLASP und ZO-2 hauptsächlich nukleär lokalisiert, während dpLASP und ZO-2 eher eine zytosolische Verteilung zeigen. pLASP und LPP sind in gebundener Form kaum zu finden, vereinzelte rote Punkte sind im Zytosol detektierbar. LPP präferiert eher die Bindung an dpLASP, dabei sind die Dimere zytosolisch und perinukleär verteilt und nicht in den Zellkernen zu detektieren.



Abbildung 4-17 *In situ* Immunfluoreszenz in MDA-MB231 Zellen zur Detektion von pLASP/depLASP-1/Proteinkomplexen mittels PLA. Die Bindung von phosphoLASP-1 (pLASP) und dephosphoLASP-1 (dpLASP) an LPP und Zyxin wurde durch Anfärben der Zellen mit PLA Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine, gefolgt von einer Ligation und Amplifikation, sichtbar gemacht. Jeder rote Punkt repräsentiert dabei eine Interaktion. ZO-2/pLASP ist vor allem im Zellkern zu sehen, während LPP bevorzugt an dpLASP bindet und sich im Zytosol aufhält. Das Zytoskelett wurde mit Phalloidin grün, die Zellkerne mit DAPI blau gefärbt. Größenbalken 20 µm.

## 5 DISKUSSION

#### 5.1 LASP-1 enthält ein NES Signal

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass LASP-1 neben der Lokalisation an dynamischen Strukturen einer Zelle auch im Zellkern zu finden ist. Über den Mechanismus des Kern-Exports und -Imports des LASP-1 Proteins war bisher nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde daher zunächst der Export von LASP-1 untersucht. Vorversuche zeigten eine Anreicherung von LASP-1 im Zellkern, nachdem die Zellen mit Leptomycin B behandelt wurden. LepB blockiert das Protein CRM1/Exportin, das an NES Sequenzen eines Proteins bindet und es durch die Kernporen vom Zellkern ins Zytoplasma exportiert. Da sich der LASP-1 über ein NES verfügt. Dieses konnte im Rahmen dieser Arbeit durch ein Programm identifiziert und experimentell verifiziert werden. Damit wurde die Vermutung über ein aktives NES in der LASP-1 Sequenz bestätigt. Die Präsenz eines solchen Signals lässt vermuten, dass LASP-1, wie viele andere LIM Domänen Proteine, in der Signaltransduktion zwischen fokalen Adhäsionen und dem Zellkern mitwirkt.

#### 5.2 Der LASP-1 Zellkernimport ist Phosphorylierungs-abhängig

Bisher konnte in Studien nur gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von LASP-1 durch die PKA die Lokalisation von LASP-1 beeinflusst, indem eine Translokation von LASP-1 aus dem Zytosol in den Zellkern stattfindet. (Grunewald, Kammerer et al. 2007; Frietsch, Grunewald et al. 2010). Dieser Mechanismus wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Dafür wurden die Zellen mit Forskolin stimuliert, welches indirekt die PKA stimuliert und damit für einen Anstieg von pLASP in der Zelle sorgt (Abb. 4-1). Der Anstieg des nuklearen Anteils von pLASP zeigt deutlich, dass die Phosphorylierung die LASP-1 Lokalisation steuert. Fast alles LASP-1 im Zellkern ist phosphoryliert. Der LASP-1 Gehalt im Zellkern korreliert mit der Prognose für Brustkrebspatientinnen: je mehr LASP-1 im Zellkern akkumuliert ist, desto schlechter ist auch das Langzeitüberleben (Grunewald, Kammerer et al. 2007). Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung, dass die regulatorische Untereinheit der PKA-I Isoform, RIα, in verschiedenen Krebsarten, wie zum Beispiel in Darmkrebs (Bradbury, Carter et al. 1994), Prostatakrebs (Cho, Lee et al. 2000) und Brustkrebs (Miller 2002). überexprimiert wird. Die PKA-I Isoform ist vor allem in Signalwegen, die das

Zellwachstum regulieren, involviert, während die PKA-II lsoform mit der Zelldifferenzierung assoziiert ist. Folglich steht die unkontrollierte Proliferation vor allem mit der erhöhten Expression von der PKA-I Isoform, beziehungsweise Änderungen im Expressionsverhältnis zwischen PKA-I und PKA-II, in Zusammenhang (Naviglio, Caraglia et al. 2009). Im Vergleich zu gesundem Brustgewebe konnte in Brustkrebszellen eine vierfach erhöhte Konzentration der PKA werden, mit gemessen zusammen einer daraus resultierenden Hyperphosphorylierung des PKA Substrats CREB (Merkle and Hoffmann 2011). Die Akkumulation von pLASP im Zellkern könnte also durch die Überexpression von LASP-1 zusammen mit einer Hyperphosphorylierung durch die PKA resultieren.

### 5.3 Der neue LASP-1 Bindungspartner ZO-2

Mit GST-LASP Pulldown Experimenten in Blutplättchen konnte, neben den schon bekannten LASP-1 Bindungspartnern Zyxin, Aktin, Dynamin 1 und Dynamin 2 das Zonula occludens Protein ZO-2 präzipitiert werden. Dieses wurde durch weitere Pulldown Experimente und Immunpräzipitationen in MDA-MB231 Zellen bestätigt. ZO-2 gehört mit ZO-1 und ZO-3 zu den Membran-assoziierten Guanylylkinasen (MAGUK) und bindet an Proteine der Tight Junctions (TJ). Die TJs umgürten Epithelzellen und stehen mit den Tight Junctions der Nachbarzelle in enger Verbindung. TJs sind aus Claudinen und Occludin aufgebaut, die je nach Zelltyp in unterschiedlicher Zusammensetzung vorliegen. Claudine und Occludin sind mit den internen Zonula occludens (ZO) Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 assoziiert, die wiederum die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen und an andere Proteine wie Kinasen, Phosphatasen, G-Proteine und Transkriptionsfaktoren binden. Über diese Proteine organisieren sich die TJs und reagieren auf Umweltreize (Alberts 2002; Gonzalez-Mariscal, Tapia et al. 2008; Hartsock and Nelson 2008). ZO Proteine sind verantwortlich für die strukturelle Integrität der TJs und bilden die Basis für eine geordnete Bildung von Multiproteinkomplexen (Umeda, Ikenouchi et al. 2006).

Alle Proteine der MAGUK Familie besitzen strukturell konservierte Domänen. Dazu gehören die PDZ, SH3 und die Guanylylkinase (GK) Domäne (Abb. 5-1). Mit seinen drei N-terminalen PDZ Domänen bildet ZO-2 Dimere mit ZO-1 und bindet an C-terminale Regionen von integralen Membranproteinen und intrazellulären Proteinen. Die GK Domäne ist homolog zu dem Enzym Guanylylkinase. Da bei Untersuchungen der Sequenzen von ZO Proteinen kein Hinweis auf eine enzymatische Aktivität

gefunden werden konnte, geht man davon aus, dass die GK Domäne als Protein-Protein Interaktionsdomäne dient. Mit dem C-Terminus bindet ZO-2 direkt an Aktin Filamente (Gonzalez-Mariscal, Betanzos et al. 2000).

Neben der zytosolischen Lokalisation sind ZO-1 und ZO-2 auch im Zellkern lokalisiert. Die Seguenz von ZO-2 weist mehrere funktionsfähige NES und NLS auf (Islas, Vega et al. 2002; Traweger, Fuchs et al. 2003; Gonzalez-Mariscal, Ponce et al. 2006). Interessanterweise ist die Lokalisation von ZO-2 abhängig von der Konfluenz der Zellen. In dünn bewachsenen Zellkulturen ist ZO-2 in Zellkern-Clustern detektierbar (Islas, Vega et al. 2002; Jaramillo, Ponce et al. 2004). Wenn Zellen jedoch konfluent gewachsen sind, ist ZO-2 nahezu vollständig an den Tight Junction Regionen zu finden. Durch mechanische Verletzung, Hitzeschock, chemische Behandlung oder Ablösen der Zell-Zell-Kontakte kann eine Verlagerung von ZO-2 von den TJs in den Zellkern herbeigeführt werden (Islas, Vega et al. 2002; Traweger, Fuchs et al. 2003). Die ZO-2 Lokalisation hängt also vom Zustand der Zell-Zell-Kontakte ab. Daher wird angenommen, dass ZO-2 regulatorische Signale zwischen dem Zustand der Zelloberfläche und dem Zellkern übermittelt (Traweger, Fuchs et al. 2003). Die Aufgabe von ZO-2 im Zellkern scheint sehr vielfältig zu sein, denn es gibt verschiedene Kernproteine mit denen ZO-2 interagiert. Dies deutet darauf hin, dass ZO-2 genau wie LASP-1 an der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation beteiligt ist (Bauer, Zweimueller-Mayer et al. 2010).

Wie bei LASP-1 konnte eine erhöhte Expression von ZO-2 in Brustkrebsgeweben gegenüber gesundem Brustgewebe festgestellt werden (Martin, Watkins et al. 2004).



**Abbildung 5-1 Domänenstruktur und Bindungspartner von ZO-2.** Dargestellt sind die drei PDZ Domänen, die SH3 Domäne, die Guanylatkinase Domäne (GK) und die prolinreichen Regionen. Weiterhin sind an den Domänen einige der von ihnen erkannten Bindungspartner aufgeführt. (PtdInsP: Phophatidylinositol 4,5 Bisphosphat). Nach Bauer et.al., 2009

Die Translokation von LASP-1 zwischen Zellkern und Zytosol ist Zellzyklus-abhängig. In der S-Phase von BT-20 Zellen ist der nukleare LASP-1 Gehalt noch gering, aber in der G<sub>2</sub>/M Phase erreicht der LASP-1 Gehalt im Kern seinen Höhepunkt. Demnach wirkt LASP-1 wahrscheinlich an der Regulation des Zellzyklus mit (Frietsch, Grunewald et al. 2010). Die Verteilung von ZO-2 zwischen Zellkern und Zytosol ändert sich ebenfalls mit den Zellzyklusphasen. Die Proliferation von MDCK Zellen reguliert ZO-2 über die Transkription von Cyclin D1 (CD1). Dazu bindet ZO-2 an den Transkriptionsfaktor Myc, welcher wiederum an eine Enhancer Box im CD1 Promoter bindet. Auf diesem Weg hemmt ZO-2 die CD1 Expression und damit die Proliferation der Zellen (Huerta, Munoz et al. 2007; Gonzalez-Mariscal, Tapia et al. 2009). CD1 ist unerlässlich für die G<sub>1</sub> Phase im Zellzyklus. Durch eine ZO-2 Überexpression wird CD1 runter reguliert und damit der Zellzyklus am Übergang zwischen G<sub>1</sub> und S-Phase geblockt. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die ZO-2 Lokalisation von Tapia et. al. in Abhängigkeit vom Zellzyklus untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass ZO-2 den Zellkern in der späten G1-Phase betritt und in der G2/M-Phase die höchste Akkumulation im Kern erreicht. Vermutlich verlässt ZO-2 den Kern in der Mitosephase wieder (Tapia, Huerta et al. 2009). Diese Verteilung korreliert mit der von LASP-1, möglich wäre, dass LASP-1 von ZO-2 mit in den Zellkern genommen wird.

# 5.4 Identifikation der Bindungsstellen zwischen LASP-1 und ZO-2

In dieser Arbeit konnten die Bindungsstellen identifiziert werden, mit denen ZO-2 und LASP-1 miteinander interagieren. In Pulldown Experimenten banden wt LASP-1 und die Deletionsmutante  $\Delta$ LIM LASP-1 an ZO-2, nicht aber  $\Delta$ SH3 LASP-1 (Abb. 4.6). So wurde nachgewiesen, dass LASP-1 das Protein ZO-2 mit seiner SH3 Domäne erkennt und bindet. SH3 Domänen interagieren mit Prolin-reichen Sequenzen und binden an diese. Die Sequenz von ZO-2 weist am C-Terminus zwei Prolin-reiche Regionen auf, an die die SH3 Domäne von LASP-1 binden könnte (Beatch, Jesaitis et al. 1996). Tatsächlich konnte die Stelle um das Prolin 1106 als Bindungsstelle für LASP-1 identifiziert werden.

Eine direkte Bindung von LASP-1 an ZO-2 konnte sowohl in Blutplättchen, als auch in der Brustkrebszelllinie MDA-MB231 nachgewiesen werden. Im Uniprot Eintrag von ZO-2 finden sich fünf verschiedene Isoformen: A1, A2, A3, C1 und C2. Die A und C Isoformen entstehen durch zwei alternative Promotoren. ZO-2A ist das Volllängen-

Protein, während den C-Isoformen die Aminosäuren 1-23 fehlen. Bei der massenspektometrischen Untersuchung des LASP-1-GST-Pulldowns in Blutplättchen konnte aufgrund der verschiedenen Charaktere der Isoformen festgestellt werden, dass LASP-1 an ZO-2C1 gebunden hat. Die ZO-2 Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert und haben vermutlich auch unterschiedliche Funktionen (Chlenski, Ketels et al. 2000). In verschiedenen Krebsgeweben und Zelllinien wurden unterschiedliche Verhältnisse von ZO-2A und C gefunden. Chlenski et. al. haben mehrere Brustkrebszelllinien auf die ZO-2A und C Expression untersucht und fanden dabei eine Fehlregulation im Vergleich zu einer gesunden Brustepithelzelllinie. In vier von fünf untersuchten Brustkrebszelllinien wurde eine Herabregulierung von ZO-2 gefunden, nur in MDA-MB231 Zellen waren sowohl ZO-2A als auch ZO-2C hoch exprimiert. Wie sich die einzelnen Isoformen in ihrer Funktion unterscheiden, ist bisher noch nicht bekannt. In Blutplättchen rekrutieren und fixieren ZO-1 und ZO-2 JAMs (junctional adhesion molecule) an die TJs. Die JAMs wiederrum werden für die Bindung von aktivierten Plättchen an das Endothelium benötigt (Ebnet, Suzuki et al. 2004). Blutplättchen haben keinen Zellkern, das heißt die Funktion von ZO-2 könnte durchaus eine andere als in Kernhaltigen Zellen sein. Womöglich ist dieser Funktionsunterschied durch die verschiedenen Isoformen bedingt. Es könnte auch sein, dass LASP-1 an unterschiedliche Isoformen bindet und somit auch unterschiedliche Funktionen vermittelt. In aktivierten Plättchen wird LASP-1 vom Zytosol an die Membran verlagert und bindet dabei neben Zyxin wahrscheinlich auch ZO-2 (siehe Abbildung 3-8). Weitere Versuche sind nötig, um die unterschiedliche Verbreitung und Funktionen von ZO-2 Isoformen aufzuklären und zu sehen, ob LASP-1 nur an ZO-2C1 oder auch an andere ZO-2 Isoformen binden kann.

#### 5.5 Lokalisation von LASP-1 und ZO-2 in Knockout Zellen

Da ZO-2 und LASP-1 eine direkte Bindung miteinander eingehen, wurde untersucht, ob ein LASP-1 Knockout die ZO-2 Lokalisation beeinflusst. Dazu wurden MEFs von LASP-1 Knockout Mäusen verwendet. Wie Zhang et. al gezeigt haben, führt eine komplette Stilllegung von LASP-1 zu einer erhöhten Migration und Proliferation von MEFs (Zhang, Chen et al. 2009). In der eigenen Arbeitsgruppe konnten jedoch beim Wiederholen der von Zhang et. al. durchgeführten Experimente keine Unterschiede in der Proliferation und Migration zwischen LASP-1 Knockout MEFs und Wildtyp MEFs festgestellt werden. Dafür wurde ein unterschiedliches Blutungsverhalten von LASP<sup>-</sup>/<sup>-</sup> Mäusen gegenüber LASP<sup>+</sup>/<sup>+</sup> Mäusen festgestellt. Die Knockout Mäuse bluten signifikant länger, was mit dem Fehlen von LASP-1 in Blutplättchen zusammenhängen könnte (unveröffentlichte Ergebnisse).

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von ZO-2 in LASP-1 Knockout MEFs untersucht. Die ZO-2 Verteilung erschien in diesen Zellen diffus im Zytoplasma und Kern verteilt, an den fokalen Adhäsionen war ZO-2 gänzlich verschwunden (siehe Abbildung 4-11). Diese Ergebnisse sind im Kontext mit denen von Zhang et. al. sehr interessant. ZO-2 treibt, bisherigen Forschungen zu Folge, die Migration und das Wachstum von Zellen im Zellkern voran, während es in ruhenden Zellen eher an den TJs gebunden vorliegt. Der Verlust von LASP-1 könnte demnach eine Fehlregulation von ZO-2 bewirken, so dass die MEFs durch den Rückzug von ZO-2 in den Kern schneller migrieren. Um diese Vermutung zu klären, sollte in der Zukunft auch das Verhalten von ZO-2 in mit LASP-1 siRNA behandelten Zellen untersucht und verglichen werden.

Auch die Lokalisation von LASP-1 in ZO-2 Knockdown Zellen wurde untersucht. Zellen mit herunterreguliertem ZO-2 zeigen einen veränderten Aufbau von TJs und veränderter Expressionen von TJ Proteinen. Dies führt zu einer abnormalen Architektur von Monolayern und zu Funktionseinschränkungen der TJs (Hernandez, Chavez Munguia et al. 2007). ZO-2 Knockout Mäuse sind hingegen im frühen Embryonalstatus letal (Xu, Kausalya et al. 2008). Eigene Knockdown Versuche mit siRNA gegen ZO-2 verliefen nicht erfolgreich, da nicht ausreichend ZO-2 ausgeschalten werden konnte. Deswegen wurde ein stabiles und durch Tetrazyklin induzierbares lentivirales shRNAmir LASP-1 Transfektionssystem verwendet. Die transfizierten MDA-MB231 Zellen zeigten durch Zugabe von Doxycyclin einen hohen ZO-2 Knockdown Effekt. Die Lokalisation von LASP-1 konnte in diesen Zellen jedoch nicht per Immunfluoreszenz untersucht werden, da das rote Leuchten von TurboRFP die Immunfluoreszenz-Aufnahmen gestört hat. Daher wurden Zellkern-Zytosol Auftrennungen durchgeführt. Nach Forskolin Stimulation, bei der normalerweise phosphoryliertes LASP in den Nukleus translokalisiert, war kaum pLASP in den Zellkernen von ZO-2 runterregulierten Zellen detektierbar. Diese Beobachtung verstärkt die Vermutung, dass LASP-1 nicht ohne ZO-2 in den Zellkern transportiert werden kann, also das ZO-2 der LASP-1 Kerntransportpartner ist.

Weiterhin wurde das Proliferationsverhalten von MDA-MB231 Zellen mit stabilem ZO-2 Knockdown untersucht. Es konnte eine signifikant langsamere Proliferation im Vergleich zu ZO-2 exprimierenden Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis passt zu denen von Traweger et. al., die für ihre Studie den Einfluss von dauerhaft im Zellkern exprimiertem ZO-2 auf Proliferation und Expression anderer Proteine untersucht haben. Dabei fanden sie eine erhöhte Expression der M2 Pyruvatkinase, die vor allem in proliferierenden Zellen exprimiert wird, und damit einhergehend eine gesteigerte Proliferation der Zellen (Traweger, Lehner et al. 2008). Bei Herunterregulation von ZO-2 bleibt hingegen die Proliferations-steigernde Wirkung des Proteins im Zellkern aus und die Zellen proliferieren langsamer. Die Aufgabe von ZO-2 wird auch nicht durch die sehr homologen Proteine ZO-1 oder ZO-3 übernommen. ZO-2 weist anscheinend nicht-redundante Funktionen auf (Traweger, Fuchs et al. 2003). Unter dem Gesichtspunkt, dass ZO-2 der Kerntransportpartner von LASP-1 ist, lässt sich das Ergebnis erklären. Ohne ZO-2 kann auch LASP-1 nicht in den Zellkern wandern. Im Zellkern regt LASP-1 die Proliferation und Migration der Zellen an (Grunewald, Kammerer et al. 2007), ohne LASP-1 im Kern sind indes die Zellen in ihrer Proliferation gehemmt.

# 5.6 Einfluss der Ser-146 Phosphorylierung auf das Bindungsverhalten von LASP-1

Die Phosphorylierung an Serin 146 durch die PKA hat nicht nur einen Einfluss auf die Lokalisation von LASP-1, sondern auch auf die Bindung zu den Interaktionspartnern LPP und Zyxin. pLASP und die Phospho-Mimikry Mutante LASP-S146D zeigen eine verminderte Bindung an LPP und Zyxin, während die Bindung an ZO-2 von der Phosphorylierung unbeeinflusst bleibt. Zu dieser Beobachtung passt folgender möglicher Ablauf: LASP-1 ist gebunden an den fokalen Kontakten und dabei assoziiert mit LPP, Zyxin, ZO-2 und anderen Proteinen. Durch Phosphorylierung verändert sich die Ladung von LASP-1 so, dass es Zyxin und LPP nicht mehr binden kann. Daher löst es sich aus dem Proteinkomplex an den fokalen Kontakten und wandert, weiterhin an ZO-2 gebunden, in den Zellkern. Dieser Mechanismus wird durch die ebenfalls erhöhte Kernakkumulation von ZO-2 nach Aktivierung der PKA an Serin 142 phosphoryliert. Dies beeinflusst die Zyxin Aktivität. So bindet die Zyxin Phospho-Mimikry Mutante stärker an die fokalen Kontakte (Call, Chung et al. 2011).

Demnach führt eine Aktivierung der PKA zu einer stärkeren Bindung von Zyxin an den fokalen Kontakten und gleichzeitig zu einem Loslösen von LASP-1, einhergehend mit einer erhöhten Translokation in den Zellkern.

### 5.7 ZO-2 und LASP-1 interagieren im Zellkern

Mit Hilfe des sehr spezifischen Duolink® PLA konnte nachgewiesen werden, dass LASP-1 und ZO-2 direkt sowohl im Zytosol als auch im Zellkern interagieren (Abbildung 4-15 und 4-16). Bei dieser Methode entsteht nur ein Fluoreszenz-Signal wenn die beiden Proteine gebunden vorliegen, da Oligonukleotide, die gekoppelt an Sekundärantikörper vorliegen, nur bei enger räumlicher Nähe zu einem DNA Ring verbunden und von einer Fluoreszenz- markierten Sonde erkannt werden. Bei einem Z-Stack durch den Zellkern konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich die ZO-2/LASP-1 Komplexe im Zellkern befinden. Mit dieser Methode konnten auch LPP/LASP-1 Komplexe im Zytosol und im Zellkernbereich nachgewiesen werden, während Zyxin mit LASP-1 nur außerhalb des Kerns direkt interagiert. Damit scheidet Zyxin als potenzieller Kerntransportpartner für LASP-1 aus. Daraufhin wurde die Phosphorylierungs-abhängige Bindung von pLASP an LPP und ZO-2 mit dem PLA-Kit untersucht. Interessanterweise sind nahezu alle ZO-2/pLASP Komplexe im Zellkern zu finden. Die Bindung von ZO-2 an unphosphoryliertes LASP-1 ist sowohl im Kern als auch im Zytosol zu finden. LPP hingegen bindet, wie vorher im Western Blot schon gesehen, nicht an phosphoryliertes LASP. Damit ergibt sich folgendes Gesamtbild: In ruhenden Zellen bindet LASP-1 an ZO-2, LPP und anderen Proteinen der fokalen Kontakte. Die ZO-2/LASP-1 sowie die LPP/LASP-1 Komplexe können sowohl zytosolisch als auch nukleär lokalisiert sein. Wird jedoch durch einen externen Stimulus, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, die PKA via G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert, wird LASP-1 phosphoryliert und verlässt die Interaktionspartner der fokalen Kontakte. Die ZO-2/pLASP Komplexe verlagern sich dadurch ins Zytosol und können somit auch in größerer Zahl in den Zellkern wandern und dort das Zellwachstum regulieren. Durch CRM1/Exportin wird LASP-1 schließlich wieder aus dem Kern transportiert und durch die Phosphatase PP2B dephosphoryliert (Abb. 5-2). Der Kernexport von ZO-2 erfolgt ebenfalls über CRM1 und wird durch Phosphorylierung mittels Proteinkinase Cɛ reguliert. Diese phosphoryliert ZO-2 im Bereich des NES an Serin 369. Erst dadurch kann ZO-2 den Zellkern wieder verlassen (Chamorro, Alarcon et al. 2009).



Abbildung 5-2 Schema des LASP-1 Zellkernimport/Export Mechanismus. Durch einen externen Stimulus werden G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert, die die Adenylatzyclase (AC) aktivieren. Dadurch wird cAMP freigesetzt welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese phosphoryliert das an Proteinen der fokalen Kontakte gebundene LASP-1. LASP-1 verliert daraufhin die Bindung an LPP und Zyxin und verlagert sich mit ZO-2 in das Zytosol und in den Zellkern. Im Zellkern steuert der ZO-2/LASP-1 Prozess die Proliferation. Durch CRM1 wird LASP-1 wieder exportiert und durch die Phosphatase PP2B dephosphoryliert. Anschließend bindet LASP-1 wieder an den fokalen Kontakten.

ZO-2 reguliert auch von einem anderen Protein die nukleare Lokalisation. Mit seiner PDZ Domäne bindet es an YAP2 (Yes Kinase-assoziiertes Protein 2). YAP2 ist ein Transkriptions-Ko-Aktivator im Hippo Signalweg und kolokalisiert im Zellkern mit ZO-2. In der Domänenstruktur von YAP2 konnte, wie bei LASP-1, ein NES, aber kein NLS identifiziert werden. Und wie bei LASP-1 kann YAP2 nur gebunden an ZO-2 in den Zellkern transportiert werden (Oka, Remue et al. 2010).

Aber auch LPP scheint ein LASP-1 Transportpartner zu sein. Zwar bindet es nicht an pLASP, aber LPP/LASP-1 Komplexe sind sowohl im Zytosol als auch im Zellkern detektierbar. LPP ist aufgrund seiner Eigenschaften und Funktionen ein interessanter
LASP-1 Bindungspartner, eine gemeinsame Regulation wäre denkbar. So wurde in MEFs von LASP-1 defizienten Mäusen eine zweifach erhöhte Expression von LPP festgestellt (Zhang, Chen et al. 2009). Wie der LPP/LASP-1 Komplex reguliert wird ist noch völlig offen. Möglich wäre, dass sich LASP-1 nach seinem Kerntransport von ZO-2 löst, dephosphoryliert wird und sich dann an LPP bindet. LPP und LASP-1 könnten aber auch zu einem geringen Prozentsatz basal in den Zellkern translokalisieren und dort gemeinsam Funktionen übernehmen. Im Zellkern bindet LPP zum Beispiel an den Tumorsupressor Scrib, der an einem Signalweg zwischen den Zell-Zell-Kontakten und dem Zellkern beteiligt ist, an dem LPP möglicherweise in Scrib-assoziierter Form mitwirkt (Petit, Crombez et al. 2005; Petit, Meulemans et al. 2005). In vielen bösartigen Tumoren ist LPP mutiert und hält sich permanent im Kern auf- ähnlich wie LASP-1 (Petit, Fradelizi et al. 2000). Eine LPP Überexpression führt zum Beispiel im Gebärmutterkarzinom zu abnormen Transkriptionsregulierungen. Dort konnte LPP eine aktive Rolle in der Tumorinvasion nachgewiesen werden, da LPP als Sensor für extrazelluläres EGF (epidermal growth factor) dient, indem es den Transkriptionsfaktor ETV5 reguliert (Colas, Muinelo-Romay et al. 2012). Nicht zuletzt könnten auch überexprimierte Bindungspartner von LPP, wie zum Beispiel LASP-1, eine potentiell pathophysiologische Genregulation auslösen, indem sie mehr LPP an den fokalen Kontakten gebunden oder im Zellkern halten und somit die Lokalisation von LPP in der Zelle verändert (Grunewald, Pasedag et al. 2009).

### 5.8 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen konnte aufgeklärt werden, wie LASP-1 in den Nukleus hinein und wieder hinaus translokalisiert und welchen Einfluss die Serin 146 Phosphorylierung dabei hat. Dennoch bleiben einige Fragen offen, für die weiterführende Experimente notwendig sind:

Wie erfolgt der LASP-1 Export aus dem Kern: in der Sequenz von LASP-1 konnte ein NES identifiziert werden, und der LASP-1 Kernexport lässt sich durch LepB inhibieren. Dies sind eindeutige Hinweise, dass der LASP-1 Export über das Exportmolekül CRM1 erfolgt. Eine direkte Bindung von LASP-1 an Exportin könnte mit einem GST-Pulldown oder mit Immunpräzipitationen nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht mit LASP-GST-Beads CRM1 zu binden. CRM1 bindet jedoch bedauerlicherweise auch an GST-Kontroll-Beads. Damit konnte der Versuch nicht für einen Nachweis der direkten Bindung herangezogen werden.

Eine IP mit einem gegen LASP-1 gerichteten Antikörper funktionierte ebenfalls nicht. Von daher könnte nur mit CRM1-GST-Beads oder mit einem IP-geeigneten CRM1 Antikörper der Nachweis gelingen. Im Rahmen dieses Versuches wäre es interessant zu analysieren, ob die CRM1 Bindung an LASP phosphorylierungsabhängig ist. So könnte eventuell geklärt werden, ob LASP-1 schon im Zellkern oder erst im Zytosol dephosphoryliert wird.

Weiterhin wäre es interessant, mehr über die Verbreitung und Funktion der unterschiedlichen ZO-2 Isoformen zu erfahren. Im Pulldown Assay, durchgeführt in Blutplättchen, konnte ZO-2C1 als Bindungspartner identifiziert werden. Um zu erfahren, ob es noch andere ZO-2 Isoformen in Plättchen gibt, müssten PCRs mit den entsprechenden Primern mit Plättchen-cDNA durchgeführt werden. So könnten auch die MDA-MB231 Zellen und weitere Zelllinien getestet werden. Vermutlich gibt es in den kernlosen Plättchen andere Isoformen als in kernhaltigen Zellen. Eventuell bindet LASP-1 nicht alle ZO-2 Isoformen gleich gut, wodurch sich auch die unterschiedlichen Funktionen der ZO-2 Isoformen manifestieren könnten. Dazu könnten Bindungsassays mit LASP-1 und den ZO-2 Isoformen durchgeführt werden.

Die Verteilung von ZO-2 in LASP-1 Knockout Zellen erschien diffus und eher zytosolisch. Da sich LASP-1 Knockdown- und Knockout Zellen unterschiedlich verhalten, wäre es von Interesse, auch in Knockout Zellen zu untersuchen, ob die ZO-2 Verteilung anders ist als in LASP-1 exprimierenden Zellen. Zusätzlich zu den bisher durchgeführten Immunfluoreszenzen bieten sich auch Zellkern/Zytosol Auftrennungen zur Analyse der ZO-2 Lokalisation an. Damit ließe sich klären, ob es auch Unterschiede in der nuklearen und zytosolischen Verteilung von ZO-2 gibt.

Mit Zellkern/Zytosol Auftrennungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass in ZO-2 Knockdown Zellen LASP-1 kaum mehr in den Zellkern wandern kann, selbst nicht nach Forskolin Stimulation. Aber auch die LASP-1 Lokalisation innerhalb des Zytosols nach ZO-2 Knockdown würde Aufschluss über den ZO-2/LASP-1 Komplex bieten, denn es wäre möglich, dass das Fehlen von ZO-2 auch die LASP-1 Bindung an die fokalen Kontakte beeinflusst. Für die erforderlichen Immunfluoreszenzen könnten noch andere ZO-2 Knockdown Möglichkeiten getestet werden, bei denen keine rote TurboRFP Färbung stört, zum Beispiel mit einem Mix aus verschiedenen ZO-2 siRNAs.

DISKUSSION

Um ein besseres Verständnis der Regulation von den ZO-2/LASP-1 Komplexen zu erlangen wäre es nützlich zu wissen, welche externen Reize die G-Protein gekoppelten Rezeptoren aktivieren, die eine Kerntranslokation von ZO-2/LASP-1 bewirken. Dazu könnten Kulturzellen mit verschiedenen Stimulantien, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, oder auch mit chemischem Stress behandelt und anschließend die Wirkung auf die LASP-1 und ZO-2 Lokalisation per Immunfluoreszenz untersucht werden. Dazu müssten noch Proliferations- und Migrationsassays durchgeführt werden, um die Reaktionen der Zellen zu erfassen. Dabei würde sich zeigen, ob ZO-2 und LASP-1 auf die gleichen Reize reagieren und wie sich dies auf die Zellen auswirkt. Das Verhalten von LPP müsste bei diesen Versuchen mit überprüft werden, denn auch LPP könnte zusammen mit LASP-1 reguliert werden. Womöglich ließen sich auch Lokalisationsunterschiede von LPP beobachten, die die Funktion von LASP-1 beeinflussen. Ein Z-Stack durch den Zellkern bei Duolink® gefärbten Proben würde den Nachweis bringen, dass die beobachteten LPP/LASP-1 Komplexe tatsächlich im Zellkern lokalisiert sind. Um LPP als LASP-1 Importpartner komplett auszuschließen, müsste in LPP Knockout Zellen aus den entsprechenden LPP<sup>-/-</sup> Mäusen überprüft werden, ob LASP-1 auch ohne LPP in den Zellkern importiert wird. Dazu ist ein nahezu hundertprozentiges Ausschalten von LPP erforderlich, das bei eigenen Versuchen nicht erreicht werden konnte.

Am wichtigsten ist es aber, die Aufgabe von LASP-1 im Zellkern zu klären. Erst wenn das bekannt ist, lässt sich weiter nach Funktionen der LASP-1/ZO-2 beziehungsweise LASP-1/LPP Komplexe suchen. In der Arbeitsgruppe wurde schon mit ChiP-on-Chip Assays begonnen, die zeigen konnten, dass LASP-1 mit Chromatin assoziiert ist. Weitere Experimente werden aufdecken, an welchen Promotorregionen LASP-1 direkt oder indirekt bindet. Dies lässt wiederrum Rückschlüsse zu, welche Transkriptionsfaktoren LASP-1 koaktiviert. Anschließend können Reporter-Gene-Assays für Promotoren zeigen, unter welchen Umständen LASP-1 die Transkription reguliert.

Die Bedeutung von LASP-1 in Krebszellen ließe sich sehr gut im orthotropen Mausmodell untersuchen. Dabei werden MDA-MB231 Zellen, die stabil mit LASP-1 shRNA oder Nonsens shRNA transfiziert wurden, in die Flanken der Nacktmäuse injiziert. Wie erste Vorversuche zeigten, bilden sich dabei nach 3-6 Wochen solide Tumoren. Nach Anwachsen der Tumore soll mit Zugabe von Doxycyclin ins Trinkwasser eine Herunterregulation von LASP-1 erfolgen. Danach wird sowohl die Tumorprogression als auch die Metastasierung verfolgt. Durch die parallele TurboRFP Induktion können die Tumore und Metastasen leicht gefunden und analysiert werden. Der Versuch würde zeigen, ob die Tumore nach LASP-1 Knockdown auch *in vivo* schlechter metastasieren und langsamer proliferieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass LASP-1 ein wichtiger Baustein in der Krebsforschung ist und das Potenzial als ein Angriffspunkt in der Behandlung von Brustkrebs und weiteren Krebsarten birgt.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B. J., A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P (2002). <u>Molecular Biology of</u> <u>The Cell</u>. New York, Garland Science.
- Ardelt, P., N. Gruenemay, et al. (2012). "LASP-1, a novel urinary marker for detection of bladder cancer." <u>Urologic oncology</u>.
- Bach, I. (2000). "The LIM domain: regulation by association." Mech Dev **91**(1-2): 5-17.
- Bauer, H., J. Zweimueller-Mayer, et al. (2010). "The dual role of zonula occludens (ZO) proteins." Journal of biomedicine & biotechnology **2010**: 402593.
- Beatch, M., L. A. Jesaitis, et al. (1996). "The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ (PSD-95/Discs-Large/ZO-1) domains and an alternatively spliced region." J Biol Chem **271**(42): 25723-25726.
- Bradbury, A. W., D. C. Carter, et al. (1994). "Protein kinase A (PK-A) regulatory subunit expression in colorectal cancer and related mucosa." <u>Br J Cancer</u> **69**(4): 738-742.
- Butt, E., S. Gambaryan, et al. (2003). "Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146." J Biol Chem **278**(18): 15601-15607.
- Call, G. S., J. Y. Chung, et al. (2011). "Zyxin phosphorylation at serine 142 modulates the zyxin head-tail interaction to alter cell-cell adhesion." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> **404**(3): 780-784.
- Chamorro, D., L. Alarcon, et al. (2009). "Phosphorylation of zona occludens-2 by protein kinase C epsilon regulates its nuclear exportation." <u>Molecular biology</u> of the cell **20**(18): 4120-4129.
- Chew, C. S., X. Chen, et al. (2008). "Targeted disruption of the Lasp-1 gene is linked to increases in histamine-stimulated gastric HCI secretion." <u>American journal</u> of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **295**(1): G37-G44.
- Chew, C. S., X. Chen, et al. (2002). "Lasp-1 binds to non-muscle F-actin in vitro and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly in vivo." <u>J Cell Sci</u> **115**(Pt 24): 4787-4799.
- Chew, C. S., J. A. Parente, Jr., et al. (1998). "Lasp-1 is a regulated phosphoprotein within the cAMP signaling pathway in the gastric parietal cell." <u>The American</u> journal of physiology **275**(1 Pt 1): C56-67.
- Chiyomaru, T., H. Enokida, et al. (2010). "Functional role of LASP1 in cell viability and its regulation by microRNAs in bladder cancer." <u>Urologic oncology</u>.
- Chlenski, A., K. V. Ketels, et al. (2000). "Organization and expression of the human zo-2 gene (tjp-2) in normal and neoplastic tissues." <u>Biochimica et biophysica acta</u> **1493**(3): 319-324.
- Cho, Y. S., Y. N. Lee, et al. (2000). "Biochemical characterization of extracellular cAMP-dependent protein kinase as a tumor marker." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **278**(3): 679-684.
- Colas, E., L. Muinelo-Romay, et al. (2012). "ETV5 cooperates with LPP as a sensor of extracellular signals and promotes EMT in endometrial carcinomas." <u>Oncogene</u>.
- Deng, X. A., A. Norris, et al. (2008). "Ectopic expression of LIM-nebulette (LASP2) reveals roles in cell migration and spreading." <u>Cell motility and the cytoskeleton</u> **65**(10): 827-840.

- Ebnet, K., A. Suzuki, et al. (2004). "Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?" <u>J Cell Sci</u> **117**(Pt 1): 19-29.
- Esteva, F. J. and G. N. Hortobagyi (2009). "Fortschritte in der Brustkrebstherapie." <u>Spektrum der Wissenschaft</u> 03/09: 38-45.
- Ferraro, E., D. Peluso, et al. (2007). "SH3-Hunter: discovery of SH3 domain interaction sites in proteins." <u>Nucleic acids research</u> **35**(Web Server issue): W451-454.
- Frietsch, J. J., T. G. Grunewald, et al. (2010). "Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long-term survival in female breast cancer." <u>Br J Cancer</u> **102**(11): 1645-1653.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, et al. (2000). "MAGUK proteins: structure and role in the tight junction." <u>Seminars in cell & developmental biology</u> **11**(4): 315-324.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Ponce, et al. (2006). "The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals." <u>Exp Cell Res</u> **312**(17): 3323-3335.
- Gonzalez-Mariscal, L., R. Tapia, et al. (2008). "Crosstalk of tight junction components with signaling pathways." <u>Biochimica et biophysica acta</u> **1778**(3): 729-756.
- Gonzalez-Mariscal, L., R. Tapia, et al. (2009). "The tight junction protein ZO-2 blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 expression." <u>Annals of the New York Academy of Sciences</u> **1165**: 121-125.
- Grunewald, T. G. and E. Butt (2008). "The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both?" <u>Mol Cancer</u> **7**: 31.
- Grunewald, T. G., U. Kammerer, et al. (2007). "Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma." <u>BMC Cancer</u> **7**: 198.
- Grunewald, T. G., U. Kammerer, et al. (2006). "Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells." <u>Exp Cell Res</u> **312**(7): 974-982.
- Grunewald, T. G., U. Kammerer, et al. (2007). "Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation." <u>Br J Cancer</u> **96**(2): 296-305.
- Grunewald, T. G., S. M. Pasedag, et al. (2009). "Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Protooncogene LPP." <u>Translational</u> <u>oncology</u> **2**(3): 107-116.
- Guo, B., R. E. Sallis, et al. (2006). "The LIM domain protein LPP is a coactivator for the ETS domain transcription factor PEA3." <u>Molecular and cellular biology</u> **26**(12): 4529-4538.
- Hammarstrom, A., K. D. Berndt, et al. (1996). "Solution structure of a naturallyoccurring zinc-peptide complex demonstrates that the N-terminal zinc-binding module of the Lasp-1 LIM domain is an independent folding unit." <u>Biochemistry</u> 35(39): 12723-12732.
- Hansen, M. D. and M. C. Beckerle (2008). "alpha-Actinin links LPP, but not zyxin, to cadherin-based junctions." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **371**(1): 144-148.
- Hartsock, A. and W. J. Nelson (2008). "Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton." <u>Biochimica et biophysica</u> <u>acta</u> **1778**(3): 660-669.
- Hernandez, S., B. Chavez Munguia, et al. (2007). "ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture." <u>Exp Cell Res</u> **313**(8): 1533-1547.

- Hervy, M., L. Hoffman, et al. (2006). "From the membrane to the nucleus and back again: bifunctional focal adhesion proteins." <u>Current opinion in cell biology</u> **18**(5): 524-532.
- Hirota, T., T. Morisaki, et al. (2000). "Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor." <u>The Journal of cell biology</u> **149**(5): 1073-1086.
- Hoffman, L. M., C. C. Jensen, et al. (2006). "Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling." <u>The Journal of cell biology</u> **172**(5): 771-782.
- Hudson, R. S., M. Yi, et al. (2011). "MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer." <u>Nucleic acids research</u>.
- Huerta, M., R. Munoz, et al. (2007). "Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc." <u>Molecular biology of the cell</u> **18**(12): 4826-4836.
- Islas, S., J. Vega, et al. (2002). "Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells." <u>Exp Cell Res</u> **274**(1): 138-148.
- Jaramillo, B. E., A. Ponce, et al. (2004). "Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells." <u>Exp Cell Res</u> **297**(1): 247-258.
- Jin, L., M. J. Kern, et al. (2007). "Angiotensin II, focal adhesion kinase, and PRX1 enhance smooth muscle expression of lipoma preferred partner and its newly identified binding partner palladin to promote cell migration." <u>Circulation</u> <u>research</u> **100**(6): 817-825.
- Kadrmas, J. L. and M. C. Beckerle (2004). "The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus." <u>Nature reviews. Molecular cell biology</u> **5**(11): 920-931.
- Katoh, M. (2003). "Identification and characterization of LASP2 gene in silico." International journal of molecular medicine **12**(3): 405-410.
- Keicher, C., S. Gambaryan, et al. (2004). "Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase." <u>Biochem</u> <u>Biophys Res Commun</u> **324**(1): 308-316.
- Lee, S., L. Zhou, et al. (2008). "Lasp anchors the Drosophila male stem cell niche and mediates spermatid individualization." <u>Mech Dev</u> **125**(9-10): 768-776.
- Li, B., L. Zhuang, et al. (2004). "Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1." J Biol Chem **279**(19): 20401-20410.
- Li, Z., M. Szabolcs, et al. (2006). "Prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma in mice expressing a probasin-Neu oncogenic transgene." <u>Carcinogenesis</u> **27**(5): 1054-1067.
- Lin, Y. H., Z. Y. Park, et al. (2004). "Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1." <u>The Journal of cell biology</u> **165**(3): 421-432.
- Luo, H., X. Liu, et al. (2005). "Disruption of palladin results in neural tube closure defects in mice." <u>Molecular and cellular neurosciences</u> **29**(4): 507-515.
- Macalma, T., J. Otte, et al. (1996). "Molecular characterization of human zyxin." J Biol Chem **271**(49): 31470-31478.
- Martin, T. A., G. Watkins, et al. (2004). "Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer." <u>European journal of cancer</u> **40**(18): 2717-2725.
- Merkle, D. and R. Hoffmann (2011). "Roles of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the progression of prostate cancer: cross-talk with the androgen receptor." <u>Cellular signalling</u> **23**(3): 507-515.

- Miller, W. R. (2002). "Regulatory subunits of PKA and breast cancer." <u>Annals of the New York Academy of Sciences</u> **968**: 37-48.
- Nakagawa, H., H. Suzuki, et al. (2009). "Contribution of the LIM domain and nebulinrepeats to the interaction of Lasp-2 with actin filaments and focal adhesions." <u>PloS one</u> **4**(10): e7530.
- Nakagawa, H., A. G. Terasaki, et al. (2006). "Short-term retention of actin filament binding proteins on lamellipodial actin bundles." <u>FEBS Lett</u> **580**(13): 3223-3228.
- Naviglio, S., M. Caraglia, et al. (2009). "Protein kinase A as a biological target in cancer therapy." <u>Expert opinion on therapeutic targets</u> **13**(1): 83-92.
- Nishiya, N., H. Sabe, et al. (1998). "The LIM domains of hic-5 protein recognize specific DNA fragments in a zinc-dependent manner in vitro." <u>Nucleic acids research</u> **26**(18): 4267-4273.
- Oka, T., E. Remue, et al. (2010). "Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling." <u>The Biochemical journal</u> **432**(3): 461-472.
- Okamoto, C. T., R. Li, et al. (2002). "Regulation of protein and vesicle trafficking at the apical membrane of epithelial cells." <u>Journal of controlled release : official</u> journal of the Controlled Release Society **78**(1-3): 35-41.
- Parast, M. M. and C. A. Otey (2000). "Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions." <u>The Journal of cell biology</u> **150**(3): 643-656.
- Petit, M. M., K. R. Crombez, et al. (2005). "The tumor suppressor Scrib selectively interacts with specific members of the zyxin family of proteins." <u>FEBS Lett</u> **579**(22): 5061-5068.
- Petit, M. M., J. Fradelizi, et al. (2000). "LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity." <u>Molecular biology of the cell</u> **11**(1): 117-129.
- Petit, M. M., S. M. Meulemans, et al. (2005). "The tumor suppressor Scrib interacts with the zyxin-related protein LPP, which shuttles between cell adhesion sites and the nucleus." <u>BMC cell biology</u> **6**(1): 1.
- Petit, M. M., S. M. Meulemans, et al. (2003). "The focal adhesion and nuclear targeting capacity of the LIM-containing lipoma-preferred partner (LPP) protein." J Biol Chem **278**(4): 2157-2168.
- Petit, M. M., R. Mols, et al. (1996). "LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family." <u>Genomics</u> **36**(1): 118-129.
- Phillips, G. R., T. R. Anderson, et al. (2004). "Actin-binding proteins in a postsynaptic preparation: Lasp-1 is a component of central nervous system synapses and dendritic spines." Journal of neuroscience research **78**(1): 38-48.
- Rachlin, A. S. and C. A. Otey (2006). "Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin." J Cell Sci **119**(Pt 6): 995-1004.
- Raman, D., J. Sai, et al. (2010). "LIM and SH3 protein-1 modulates CXCR2-mediated cell migration." <u>PloS one</u> **5**(4): e10050.
- Reinhard, M., J. Zumbrunn, et al. (1999). "An alpha-actinin binding site of zyxin is essential for subcellular zyxin localization and alpha-actinin recruitment." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **274**(19): 13410-13418.
- Schreiber, V., C. Moog-Lutz, et al. (1998). "Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions." <u>Mol Med</u> **4**(10): 675-687.

- Soderberg, O., M. Gullberg, et al. (2006). "Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation." <u>Nature methods</u> **3**(12): 995-1000.
- Spence, H. J., L. McGarry, et al. (2006). "AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins." <u>Molecular and cellular biology</u> 26(4): 1480-1495.
- Sun, H. J., Y. Y. Bahk, et al. (2006). "A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell." <u>J Orthop</u> <u>Res</u> 24(11): 2059-2071.
- Suyama, R., A. Jenny, et al. (2009). "The actin-binding protein Lasp promotes Oskar accumulation at the posterior pole of the Drosophila embryo." <u>Development</u> **136**(1): 95-105.
- Suzuki, T., H. Tazoe, et al. (2006). "DNA microarray analysis of changes in gene expression induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human promyelocytic leukemia HL-60 cells." <u>Biomedical research</u> **27**(3): 99-109.
- Tapia, R., M. Huerta, et al. (2009). "Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle." <u>Molecular biology of the cell</u> **20**(3): 1102-1117.
- Tomasetto, C., C. Moog-Lutz, et al. (1995). "Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains." <u>FEBS Lett</u> **373**(3): 245-249.
- Tomasetto, C., C. Regnier, et al. (1995). "Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11q21.3 region of chromosome 17." <u>Genomics</u> **28**(3): 367-376.
- Traenka, C., M. Remke, et al. (2010). "Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma." <u>Cancer research</u> **70**(20): 8003-8014.
- Traenka, J., C. R. Hauck, et al. (2009). "Integrin-dependent translocation of LASP-1 to the cytoskeleton of activated platelets correlates with LASP-1 phosphorylation at tyrosine 171 by Src-kinase." <u>Thrombosis and haemostasis</u> **102**(3): 520-528.
- Traweger, A., R. Fuchs, et al. (2003). "The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B." J Biol Chem **278**(4): 2692-2700.
- Traweger, A., C. Lehner, et al. (2008). "Nuclear Zonula occludens-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells." <u>Differentiation; research in biological diversity</u> **76**(1): 99-106.
- Umeda, K., J. Ikenouchi, et al. (2006). "ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation." <u>Cell</u> **126**(4): 741-754.
- Vervenne, H. B., K. R. Crombez, et al. (2009). "Targeted disruption of the mouse Lipoma Preferred Partner gene." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **379**(2): 368-373.
- Viney, R. L., A. A. Morrison, et al. (2007). "A proteomic investigation of glomerular podocytes from a Denys-Drash syndrome patient with a mutation in the Wilms tumour suppressor gene WT1." <u>Proteomics</u> **7**(5): 804-815.
- Walter, U., P. Miller, et al. (1980). "Immunological distinction between guanosine 3':5'-monophosphate-dependent and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases." J Biol Chem **255**(8): 3757-3762.

- Wang, B., P. Feng, et al. (2009). "LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma." <u>Journal of hepatology</u> **50**(3): 528-537.
- Xu, J., P. J. Kausalya, et al. (2008). "Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development." <u>Molecular and cellular</u> <u>biology</u> 28(5): 1669-1678.
- Zhang, H., X. Chen, et al. (2009). "Lasp1 gene disruption is linked to enhanced cell migration and tumor formation." <u>Physiological genomics</u> **38**(3): 372-385.
- Zhao, L., H. Wang, et al. (2010). "Promotion of colorectal cancer growth and metastasis by the LIM and SH3 domain protein 1." <u>Gut</u> **59**(9): 1226-1235.
- Zheng, Q. and Y. Zhao (2007). "The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction." <u>Biology</u> of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization 99(9): 489-502.
- Zieseniss, A., A. G. Terasaki, et al. (2008). "Lasp-2 expression, localization, and ligand interactions: a new Z-disc scaffolding protein." <u>Cell motility and the cytoskeleton</u> **65**(1): 59-72.

# 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Alanin
С°	Grad Celsius
CD1	Cyclin D1
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpLASP	dephosphoryliertes LASP
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GK	Guanylatkinase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEK 293T	human embryonic kidney cells
IP	Immunpräzipitation
k	Kilo
КО	Knockout
LASP-1	LIM and SH3 protein 1
LepB	Leptomycin B
LPP	LIM- containing lipoma preferred partner
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
m	Meter/milli (10 <sup>-3</sup> )
MEF	mouse embryonic fibroblasts
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
Р	Prolin
PLA	proximity ligation assay
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
РКА	cAMP- abhängige Proteinkinase

PKG	cGMP- abhängige Proteinkinase
pLASP	phosphoryliertes LASP
Ptk	protoroo kidney cells
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	sodium dodecylsulfate
Ser	Serin
shRNAmir	micro RNA- adapted short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
т	Tween/Triton X-100
TJ	Tight junction
tRFP	TurboRFP
VASP	vasodilator stimulated phosphoprotein
wt	Wildtyp
ZO-2	Zonula occludens protein 2

#### 8 PUBLIKATIONEN

#### 8.1 Präsentationen

06/2011

Poster Präsentation beim 36. FEBS Kongress in Turin, Italien

**Sabrina Jasper**, Petra Thalheimer, Sabine Herterich, Joachim Kremerskothen and Elke Butt

"Dynamic Regulation of the Phosphorylation-dependent LASP-1 Transport into the Nucleus"

#### 8.2 Publikationen

#### 05/2012

**Mihlan S**, Reiß C, Thalheimer P, Herterich S, Gaetzner S, Kremerskothen J, Lewandrowski U, Sickmann A and Butt E

"Nuclear Import of LASP-1 is regulated by Phosphorylation and Dynamic Protein-Protein Interactions"

Oncogene, accepted

#### 05/2010

Frietsch JJ, Grunewald TG, **Jasper S**, Kammerer U, Herterich S, Kapp M, Honig A, Butt E

"Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long term survival in female breast cancer"

Br J cancer 2010 May 25; 102 (11): 1645-1653

### 9 DANKSAGUNG

Meiner Doktormutter Prof. Dr. Elke Butt-Dörje danke ich für die hervorragende Betreuung, für die Aufbauarbeit nach misslungenen Versuchen, für die Ideen und Anregungen und für die jederzeit offene Tür. Ich empfand die Zusammenarbeit, die auch übers berufliche hinausging, als sehr angenehm und prägend.

Prof. Dr. Thomas Dandekar danke ich herzlich, dass er das Zweitgutachten für diese Arbeit übernommen hat.

Prof. Ulrich Walter danke ich für die Stipendien, die er mir gewährt hat.

Vielen Dank an Dr. Viacheslav Nikolaev, der mir bei den Aufnahmen am fokalen Fluoreszenzmikroskop und der Auswertung der Bilder geholfen hat.

Urs Lewandrowski danke ich für die massenspektrometrische Analyse meiner Pulldown Proben.

Ein großes Dankeschön geht an die AG Butt. Petra Thalheimer danke ich für die Unterstützung und Hilfe bei Versuchen und den vielen guten Tipps aus ihrem reichen Erfahrungsschatz. Cora Reiß hat mir neue Methoden beigebracht und mich auch sonst bei Problemen unterstützt. Lieben Dank an Amelie Hailer, die trotz ihrer "Hammertage" meine Arbeit Korrektur gelesen hat. Weiterhin Danke ich Ruwan Perera, Semjon Willier und Katharina Werner für die sympathische Zusammenarbeit.

Der AG Geiger danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor und für die Hilfe bei der Blutplättchenaufarbeitung. Die Laborarbeit hat immer Spaß gemacht, vor allem mit Claudia Schütz, die für gute Musik immer zu haben war. Dr. Jörg Geiger danke ich für die Hilfe bei Computerproblemen und auch Petra Hönig-Liedl konnte ich jederzeit um Hilfe und Rat bitten, dem sie immer freundlich nachgekommen ist. Nicht zuletzt danke ich Kathi Hubertus, die von Anfang an bis zum Schluss dabei war und mit der ich die Hochs und Tiefs der Doktorarbeit durchlebt habe. Sabine Herterich sowie Sabine Gätzner danke ich für die Unterstützung beim Erstellen der ZO-2 Mutanten. Linda Kehrer hat oft meine Gelkammern vor dem Auslaufen gerettet, danke dafür.

Ein großes Dankeschön an unsere Laborfee Elfi Walter, die immer für ein vollständiges Laborinventar sorgt und mit ihrer unglaublich hilfsbereiten Art für jedes Problem eine Lösung findet.

Allen Auverianern danke ich für das tolle und unvergleichliche Klima. In den Mittagspausen konnte man fürs Leben lernen! Es war immer was los und es gab auch wertvolle Stunden außerhalb des Labors, an die ich mich gerne zurückerinnern werde.

Ich danke all den Doktoranden und Diplomanden, die ich während meiner Zeit hier kennengelernt habe. Es war zu jeder Zeit eine prima Stimmung im Doktorandenzimmer, vor allem durch Jacki Kramer, Regina Mark, Cathrin Horras, Helene Hoffmann und Florian Röhrig, dem ich auch für Hilfen im Umgang mit sämtlichen PC-Programmen danken möchte.

Meine Eltern Frank und Kerstin Jasper haben mich immer unterstützt und ich danke ihnen, dass sie immer an mich geglaubt haben. Ein besonderer Dank geht an meinen Mann Christian, der mich sehr unterstützt, sich in guten Zeiten mit mir gefreut wie auch in schlechten Zeiten mich wieder aufgebaut, sich meine Vorträge angehört, mir bei statistischen Auswertungen geholfen und die Dissertation Korrektur gelesen hat.

Diese Arbeit wurde durch die DFG finanziell unterstützt.

## 10 ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fakultät für Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Würzburg angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit "Identifikation von Zonula Occludens 2 (ZO-2) als neuen LASP-1 Interaktionspartner und Aufklärung der LASP-1/ZO-2 Kern-Zytosol Translokation" selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit in keinem anderen Studiengang als Prüfungsleistung verwendet wurde und ich mit Ausnahme des Titels Diplom-Biologe keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 2012

Sabrina Mihlan