

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie  
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Alma Zerneck-Madsen



**LASP1 REGULIERT DIE GENEXPRESSION UND SEKRETION VON MATRIX-  
METALLOPROTEASEN IN BRUSTKREBSZELLEN.**

**LASP1 REGULATES THE GENE EXPRESSION AS WELL AS THE SECRETION OF MATRIX-  
METALLOPROTEASES IN BREAST CANCER CELLS.**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde der  
Graduate School of Life Sciences  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Marcel Matthias Endres**  
aus Gaukönigshofen

Würzburg, 2016



**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r:** Prof. Dr. med. A. Rosenwald

**1. Betreuer/in:** Prof. Dr. rer.nat. E. Butt

**2. Betreuer/in:** Prof. Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer

**3. Betreuer/in:** Prof. Dr. med. M. Eigenthaler

**Tag des Promotionskolloquiums :** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

**Der Promovend ist Zahnarzt**



---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	vii
<i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	xii
<i>Tabellenverzeichnis</i> .....	xiv
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Das invasive duktales Karzinom .....	1
1.2. Podosome und Invadopodien .....	5
1.3. Matrix-Metalloproteasen (MMPs) .....	8
1.4. Das LIM und SH3 Domänen Protein 1 (LASP1) .....	12
1.5. Zielsetzung .....	17
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
2.1. Material .....	18
2.1.1. Zelllinien .....	18
2.1.2. Reagenzien für die Zellkultur .....	18
2.1.3. Antikörper .....	18
2.1.4. Primer .....	19
2.1.5. siRNAs .....	20
2.1.6. Reaktionskits .....	20
2.1.7. Chemikalien und Reagenzien .....	21
2.1.8. Verbrauchsmaterialien .....	24
2.1.9. Geräte und Instrumente .....	25
2.1.10. Software und Webseiten .....	28
2.1.11. Puffer und Lösungen .....	29
2.2. Methoden .....	35
2.2.1. Zellbiologische Methoden .....	35
2.2.1.1. Zellkulturbedingungen .....	35
2.2.1.2. Auftauen einer Zellkultur .....	36

---

2.2.1.3.	Aufkonzentrieren einer Zellkultur .....	36
2.2.1.4.	Ernten einer Zellkultur .....	36
2.2.1.5.	Einfrieren einer Zellkultur .....	37
2.2.1.6.	siRNA-Transfektion .....	37
2.2.1.7.	Stabiler Knockdown .....	37
2.2.1.8.	Stimulation der Zellen mit Forskolin & TPA .....	38
2.2.2.	Proteinbiochemische Methoden .....	38
2.2.2.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	38
2.2.2.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	39
2.2.2.3.	Western Blot .....	39
2.2.2.4.	Zymographie .....	40
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden .....	41
2.2.3.1.	Primer Design .....	41
2.2.3.2.	RNA-Isolation .....	42
2.2.3.3.	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Reinheit.....	42
2.2.3.4.	RNA-Agarose-Gelelektrophorese .....	43
2.2.3.5.	Reverse Transkription .....	43
2.2.3.6.	Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) .....	44
2.2.3.7.	Mikroarray & „Functional Enrichment Analysis“ .....	46
2.2.4.	Etablierung eines Matrix-Degradations-Assays .....	47
2.2.5.	Statistische Auswertung .....	48
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>49</b>
3.1.	Einfluss von LASP1 auf die Matrixdegradation in Invadopodien humaner Brustkrebszellen (MDA-MB-231) .....	49
3.1.1.	Stabiler LASP1 Knockdown in MDA-MB-231 Zellen .....	49
3.1.2.	Degradationsverhalten von Invadopodien humaner Brustkrebs- zellen mit bzw. ohne stabilem LASP1 Knockdown .....	51
3.2.	Regulation der Genexpression der Matrix-Metalloproteasen durch LASP1	54

3.2.1.	Stimulation stabil transfizierter MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Kontroll- und Knockdownzellen mit Forskolin .....	55
3.2.2.	Qualität und Quantität der isolierten RNA .....	56
3.2.3.	RT-PCR: Spezifität und Effizienz der designten Primer .....	57
3.2.4.	Relative Genexpressionsanalyse mittels $\Delta\Delta$ CT-Methode .....	60
3.2.5.	Absolute Genexpressionsanalyse unter Etablierung einer Standardkurve .....	63
3.3.	Korrelation zwischen $\Delta$ Proteinexpression und $\Delta$ Genexpression der Matrix-Metalloproteasen nach LASP1 Knockdown .....	64
3.3.1.	Western Blot Analyse der MMP-Proteinexpression in stabil transfizierten MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Zellen vor bzw. nach stabilem LASP1 Knockdown .....	64
3.3.2.	Western Blot Analyse der MMP-Proteinexpression in wt MDA-MB-231 Zellen vor bzw. nach transientem LASP1 Kockdown .....	67
3.4.	Regulation der MMP-Sekretion in die Extrazellulärmatrix durch LASP1 .....	68
3.5.	Aktivitätsverhalten der Matrix-Metalloproteasen in MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Zellen mit stabilem LASP1 Knockdown .....	71
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>74</b>
<b>5.</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>83</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY</b> .....	<b>84</b>
	<b>Deutsch</b> .....	<b>84</b>
	<b>Englisch</b> .....	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG DER MIKROARRAYDATEN</b> .....	<b>101</b>

*Danksagung*

*Lebenslauf*

*Affidavit/Eidesstattliche Erklärung*

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
A	Ampere
ABL-Kinase	Abelson Tyrosinkinase
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Abelson-related Gene
Arp2/3	Actin-related Proteins 2/3
ATF	Activating-Transcription-Factor
ATM	Ataxia-Teleangiectasia Mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BCA-Assay	Bicinchoninic Acid Assay
BHK-21	Baby Hamster Kidney Cell
bp	Basenpaare
BRCA1/-2	Breast Cancer 1/-2
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBP	CCAAT/Enhancer-binding Protein 1
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDC42	Cell Division Control Protein 42
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	Kontrolle
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB1	cAMP-responsive Element-binding Protein 1
CT	Cycle threshold
DABCO®	1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTE	1,4-Dithioerythrit
E	Primereffizienz
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FOS	FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog
G9a	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathione-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Protonen-Kalium-Pumpe
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	Human Liver Carcinoma
His	Histidin



HUF	Human Uterine Fibroblasts
JUN	Jun Proto-Oncogene
kDa	Kilodalton
KO/ KD	Knockout/ Knockdown
LASP1	LIM und SH3 Domänen Protein 1
LB-Puffer	Lithiumborat-Puffer
LIM	Lin11, Isl-1 & Mec-3
LKB1	Liver Kinase B1
log	Logarithmus
LPP	Lipoma preferred partner
M	Molarität
MAF	Musculoaponeurotic Fibrosarkoma
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinases
mbar	Millibar
mm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter/-zentimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS1	Nijmegen Bruch Syndrom 1
NC	Nitrocellulose
NCK1	Non-Catalytic Region Of Tyrosine Kinase Adaptor Protein 1
NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng/ µg/ mg/ g	Nano-/ Mikro-/ Milli-/ Gramm
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NHE-1	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter
nm/ mm/ cm	Nano-/ Milli-/Zentimeter
NP-40	Nonylphenoethoxylat

nTRIP6	Nuclear Thyroid Receptor-interacting Protein 6
N-WASP	Wiskott–Aldrich Syndrom Protein
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PEA3	Polyomavirus Enhancer Activator 3
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pLASP1	phosphoryliertes LASP1
PM	Plasmamembran
PMA/TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Pyrophosphat
Rab	Ras-related In Brain
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	Ribosomal Protein, Large, P0
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
rtTA	Reverse Tetracycline-dependent Transactivator
rxn	Reaktion
SAF-1	Secondary Wall- thickening Associated F-box Protein 1
SAFB	Scaffold Attachment Factor B
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek/ min/ h/ d	Sekunde/ Minute/ Stunde/ Tag
SH3	Src-homology 3

shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Receptor
SP1	Specificity Protein 1
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	TRIS und EDTA-Puffer
TFB1M	Transcription Factor B1, mitochondrial
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TRE	Tetracycline-responsive Element
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UHRF1	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1
UV	Ultraviolett
V	Volt
VAMP4	Vesicle-associated Membrane Protein 4
V-AQ	vacuum-aqueous
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus G-Protein
WIP	WASP-interacting Protein
wt	Wildtyp
ZEB	Zinc finger E-box binding homeobox
ZO-2	Zonula Occludens 2

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abbildung 1.1.</b>	Schematische Darstellung der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) .....	3
<b>Abbildung 1.2.</b>	Podosomale/invadopodiale Architektur und Zusammensetzung .....	7
<b>Abbildung 1.3.</b>	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Matrix-Metalloproteasen .....	8
<b>Abbildung 1.4.</b>	Domänenstruktur und Bindungspartner von LASP1 .....	13
<b>Abbildung 1.5.</b>	LASP1 ist in der Ringstruktur der Podosomen lokalisiert .....	14
<b>Abbildung 1.6.</b>	Der Knockdown des neu identifizierten Gerüstproteins in der Ringstruktur von Podosomen – LASP1, beeinträchtigt insbesondere die Matrixdegradationskapazität .....	15
<b>Abbildung 2.1.</b>	Pipettierungsschema einer RT-PCR zur Genexpressionsanalyse von LASP1 .....	45
<b>Abbildung 3.1.</b>	Western Blot stabil transfizierter MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Zellen .....	50
<b>Abbildung 3.2.</b>	Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	50
<b>Abbildung 3.3.</b>	Die Matrixdegradation in Invadopodien humaner Brustkrebszellen wird durch einen LASP1 Knockdown beeinflusst .....	52
<b>Abbildung 3.4.</b>	Western Blot stabil transfizierter MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Zellen ohne (CO) bzw. mit 0,5 µg/ml Doxycyclin (KD) im Medium .....	53
<b>Abbildung 3.5.</b>	Anstieg an pLASP1 nach Forskolin-Stimulation stabil transfizierter MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Zellen .....	55
<b>Abbildung 3.6.</b>	RNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Qualitätsbestimmung der extrahierten RNA .....	56
<b>Abbildung 3.7.</b>	Darstellung eines Amplifikationsplots zur Genexpressionsanalyse am Beispiel von LASP1 .....	57
<b>Abbildung 3.8.</b>	Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Primerspezifität .....	59

---

<b>Abbildung 3.9.</b>	Darstellung einer typischen Standardkurve zur Berechnung der Primereffizienz am Beispiel von LASP1 .....	60
<b>Abbildung 3.10.</b>	Relative Genexpressionsanalyse zum Nachweis eines transkriptionellen Effektes von LASP1 auf Matrix-Metalloproteasen .....	62
<b>Abbildung 3.11.</b>	Gegenüberstellung der Matrix-Metalloproteasen mRNA Expression & der korrespondierenden Proteintranskription in MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Kontroll- (CO) und Knockdownzellen (KD) .....	66
<b>Abbildung 3.12.</b>	Immunblot zur Analyse verschiedener Matrix-Metalloproteasen in Wildtyp (wt) MDA-MB-231 und stabil transfizierten MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Zellen nach LASP1 Knockdown .....	67
<b>Abbildung 3.13.</b>	Regulation der Matrix-Metalloproteasen Sekretion in die Extrazellulärmatrix durch LASP1 .....	70
<b>Abbildung 3.14.</b>	Aktivität der Matrix-Metalloproteasen in MDA-MB-231 <sub>sh</sub> LASP1 Zellen vor (CO) und nach (KD) dem LASP1 Knockdown .....	73
<b>Abbildung 4.1.</b>	Schematische Darstellung des regulatorischen Effektes von Dynamin auf die „Kiss and Run“-Exozytose .....	77
<b>Abbildung 4.2.</b>	Cis-regulatorische Elemente der Promotor-Region von Matrix-Metalloproteasen .....	79

---

**TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 1.1.</b>	Differentielle Eigenschaften von Podosomen und Invadopodien .....	5
<b>Tabelle 1.2.</b>	Hauptaktivatoren der Zymogene (pro-MMPs) .....	10
<b>Tabelle 2.1.</b>	RPMI1640, PBS und Trypsin-EDTA/Fläche .....	35
<b>Tabelle 2.2.</b>	Programm des Concentrator plus .....	36
<b>Tabelle 2.3.</b>	Ansatz des 2X RT Master Mix .....	44
<b>Tabelle 2.4.</b>	Programm der Reversen Transkription .....	44
<b>Tabelle 2.5.</b>	Ansatz des RT-PCR Master Mix .....	45
<b>Tabelle 2.6.</b>	Programm der RT-PCR .....	46
<b>Tabelle 3.1.</b>	Primereffizienz (E) .....	60
<b>Tabelle 3.2.</b>	„Fold-Change“ der mRNA-Transkription nach Doxycyclin-Behandlung (ohne & mit zusätzlicher Forskolin-Inkubation) .....	61
<b>Tabelle 3.3.</b>	Absolutwerte der Zielgene .....	63
<b>Tabelle 3.4.</b>	Vergleich der Konzentration der Matrix-Metalloproteasen in MDA-MB- 231 <sub>sh</sub> LASP1 Kontrollzellen (CO) und Knockdownzellen (KD) .....	64

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. DAS INVASIVE DUKTALE KARZINOM**

Mit einem Anteil von 31,3 % aller Krebsneuerkrankungen zählt das Mammakarzinom, neben dem Bronchial- und dem Colonkarzinom, zu den häufigsten Tumoren bei Frauen (P. Kaatsch, C. Spix et al. 2013). Allein im Jahr 2014 erkrankten schätzungsweise 75200 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Dies entspricht einer altersstandardisierten Inzidenz von 120/100000 (J. Haberland and U. Wolf 2015). Im Vergleich zu 1970 ist eine Verdopplung des Lebenszeitriskos auf aktuell 12,4 % (Stand 2012), bei gleichzeitiger Abnahme der Morbiditätsrate konstatiert worden (N. Howlader, AM. Noone et al. 2012).

Hauptrisikofaktoren sind Kinderlosigkeit, frühe Menarche, steigendes Lebensalter, ionisierende Strahlung, familiäre Belastung, sowie Mutationen in den „High-Penetrance“ Genen (p53, ATM, NBS1, LKB1) bzw. den Brustkrebs-Genen BRCA1 und BRCA2 (U. Kunze 2011).

Das „Outcome“ der Brustkrebspatienten wird durch die Tumorentität bestimmt. Verglichen mit dem inflammatorischem, den präinvasiven und dem invasiv lobulärem Mammakarzinom, ist das invasiv duktales Karzinom (Adenokarzinom) mit einer Wahrscheinlichkeit von 70-80 %, die am häufigsten diagnostizierte Brustkrebsform (H. P. Sinn and H. Kreipe 2013).

Da oftmals nicht der Primärtumor selbst die Todesursache ist, sondern die Metastasierung in entlegene Organe, senkt vor allem das Adenokarzinom, aufgrund seines invasiven Potentials, die 10-Jahre Überlebenschance auf unter 50 % (B. Weigelt, J. L. Peterse et al. 2005).

Der Prozess der Metastasierung ist eine komplexe Verknüpfung aufeinanderfolgender Schritte, dessen Ursprung in der Infiltration der Tumorzellen in das umliegende Gewebe liegt (G. Poste and I. J. Fidler 1980).

Hierzu werden in einem ersten Schritt Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion modifiziert. Eine prädominante Rolle wird hierbei der Superfamilie der Cadherine,

insbesondere den antagonisierenden E-Cadherin und N-Cadherin, zugeschrieben (D. M. Li and Y. M. Feng 2011). E-Cadherin ist für die Aufrechterhaltung des zellulären Verbunds verantwortlich. Infolgedessen wird die Herunterregulation dieses Adhäsionsproteins als obligate Determinante der Metastasierung angesehen (M. K. Wendt, M. A. Taylor et al. 2011). Das Malignitätsrisiko wird ferner durch Expression von N-Cadherin nach zunehmender Fibrosierung und Zystenbildung im Brustdrüsengewebe amplifiziert (A. M. Kotb, A. Hierholzer et al. 2011). Insgesamt ist somit eine positive Korrelation zwischen Tumorprogression und N-Cadherin zu beobachten, während im Fall von E-Cadherin eine inverse Wechselbeziehung in Bezug auf Tumordinvasion und Metastasierung festgestellt wurde. Neben Cadherinen begünstigen v.a. Integrine und Heparanasen die Zellinvasion. Als transmembranäre Rezeptoren extrazellulärer Komponenten, wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen, vermitteln Integrine die Tumorzelladhärenz an Stromazellen. Dies ermöglicht wiederum das Eindringen der Brustkrebszellen in das umliegende Bindegewebe (M. Mego, S. A. Mani et al. 2010). Des Weiteren erhöhen Integrine durch Hochregulation der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Urokinasen die Matrixdegradationskapazität. Heparanasen zeigen ähnliche Effekte. Durch Spaltung von Heparansulfat wird einerseits die Zell-Matrix-Adhäsion gemindert, zum anderen werden krebsfördernde Wachstumsfaktoren, die u.a. an der Regulation der Matrix-Metalloproteasen bzw. Urokinasen partizipieren, freigesetzt (A. Purushothaman, L. Chen et al. 2008).

Zusätzlich erfordert der invasive Phänotyp die Migration und Motilität der Tumorzellen. Tumorzellen migrieren entweder isoliert über amöboide bzw. mesenchymale Bewegung oder im Kollektiv unter Bildung sog. Leitschienen via Aktivierung der membranständigen MMP14 (E. A. McSherry, S. Donatello et al. 2007).

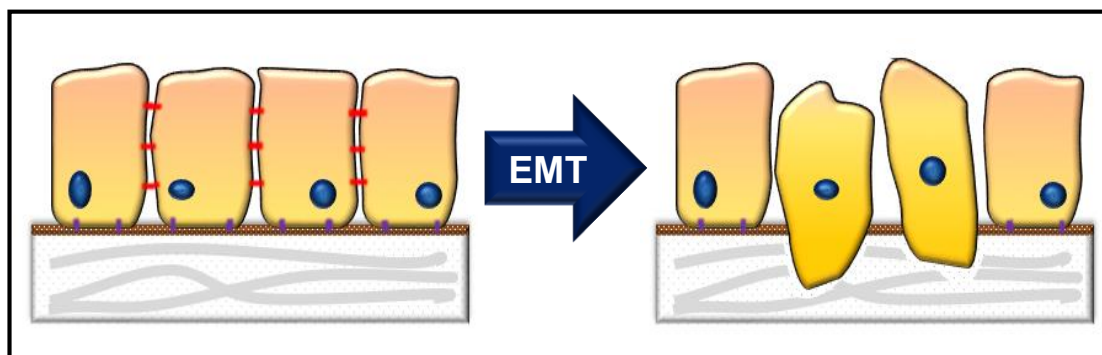
Ein wichtiger Prozess im Rahmen der malignen Zellmigration ist die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT). EMT beschreibt die Änderung des Phänotyps von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalem Charakter (vgl. Abb. 1.1).

Der Übergang wird intrinsisch von Transkriptionsfaktoren (z.B. ZEB1, ZEB2, SNAIL, SLUG) bzw. extrinsisch von Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- $\beta$ , EGF, FGF) induziert. Dies hat den Verlust der interzellulären Adhäsion durch Abnahme epithelialer Proteine, wie



E-Cadherin, zur Folge. Zugleich ist ein Anstieg mesenchymaler Marker, insbesondere von Vimentin, zu verzeichnen (M. Yilmaz and G. Christofori 2009). Die vorausgehende Transition impliziert die Beeinträchtigung der apikal-basalen Zellpolarität, verbunden mit einem Umbau des Zytoskeletts zugunsten der Tumorformation und Proliferation.

Der Abbau der umgebenen Extrazellulärmatrix und Basalmembran wird weiterhin durch Transkriptionssteigerung proteolytisch wirkender Matrix-Metalloproteasen über diverser Signalwege (JNK-, Ras-Signalweg) gefördert (M. Iwatsuki, K. Mimori et al. 2010).



**Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT).** Nach Verlust von Zelladhäsion und Zellpolarität, nehmen Epithelzellen zur Invasion migratorische, mesenchymale Charaktereigenschaften an (modifiziert nach B. Samarasinghe 2013).

Nach Durchbruch der Basalmembran invadieren Tumorzellen das Blut- oder Lymphsystem, um entlegene Organe zu besiedeln. Da gemäß der Seed-and-Soil-Theorie eine erfolgreiche Absiedlung primärer Tumorzellen allerdings auf eine dementsprechende Mikroumgebung angewiesen ist (I. J. Fidler 2003), wird angenommen, dass die Zellen, vor Ausbildung sog. Tochtertumore, spezifische Substanzen zur Etablierung einer prä-metastatischen Nische sezernieren (B. Psaila, R. N. Kaplan et al. 2006). Untersuchungen von Hiratsuka zeigten, dass in Makrophagen und Endothelzellen der Lunge infolge einer prä-metastatischen Primärtumor-induzierten Genexpression von MMP9 die spätere Metastasierung in das genannte Organ favorisiert wird (S. Hiratsuka, K. Nakamura et al. 2002).

Zusammenfassend ist die Metastasierung als eine hochkomplexe Abfolge einzelner Schritte zu verstehen. Zellinvasion, Migration, Motilität und Mikroumgebung sind

allesamt obligate Faktoren für eine erfolgreiche Metastasenbildung. Der Gesamtprozess wird dabei maßgeblich durch Matrix-Metalloproteasen, die von Invadopodien bzw. Podosomen sezerniert werden, beeinflusst (S. Linder 2007).

## 1.2. Podosome UND INVADOPODIEN

Podosome und Invadopodien sind hochdynamische, Aktin-reiche Adhäsions- und Invasionsstrukturen migratorischer Zellen (D. A. Murphy and S. A. Courtneidge 2011).

Die Struktur wurde erstmal 1980 von D. Pfeuty und Singer beschrieben. Nach viraler Transfektion embryonaler Fibroblasten mit dem Rous-Sarkom-Virus (RSV), gruppieren sich die zytoskelettalen Proteine Vinculin und  $\alpha$ -Aktinin an Fokalkontakten zu zirkulären Clustern, sog. Rosetten (T. David-Pfeuty and S. J. Singer 1980). Aufgrund der begleitenden Ausbildung protrusiver Membranausläufer, wurde der Term Podosom eingeführt (G. Tarone, D. Cirillo et al. 1985). Chen hingegen nutzte zum Ausdruck der degradativen und adhäsiven Kapazität den synonymen Begriff Invadopodium (W. T. Chen 1989).

Da podosomale/invadopodiale Strukturen nachfolgend sowohl in somatischen Zellen (z.B. Endothelzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, Glatten Muskelzellen), als auch in entarteten Krebszellen nachgewiesen werden konnten (M. Gimona, R. Buccione et al. 2008), wurden die Bezeichnungen (Podosom, Invadopodium) für einen bestimmten zellulären Grundtyp definiert. Während in Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen von Podosomen gesprochen wird, ist der Terminus Invadopodium auf Krebszellen limitiert. Neben der zugrundeliegenden Zellart unterscheiden sich Podosome und Invadopodien ferner in Anzahl/Zelle, Größe, Beständigkeit und Matrixdegradationskapazität (vgl. Tab. 1.1) (S. Linder 2007).

**Tabelle 1.1. Differentielle Eigenschaften von Podosomen und Invadopodien\***

\* (modifiziert nach S. Linder 2007)

Eigenschaften	Podosomen	Invadopodien
Zellart	Monozyten, Endothelzellen, Glatte Muskelzellen	Krebszellen
Anzahl	20-100/Zelle	1-10/Zelle
Größe	max. 1 $\mu\text{m}$ x 0,4 $\mu\text{m}$	max. 8 $\mu\text{m}$ x 5 $\mu\text{m}$
Beständigkeit	2 – 12 min	$\leq$ 60 min
Matrixdegradationskapazität	gering (+)	hoch (+++)

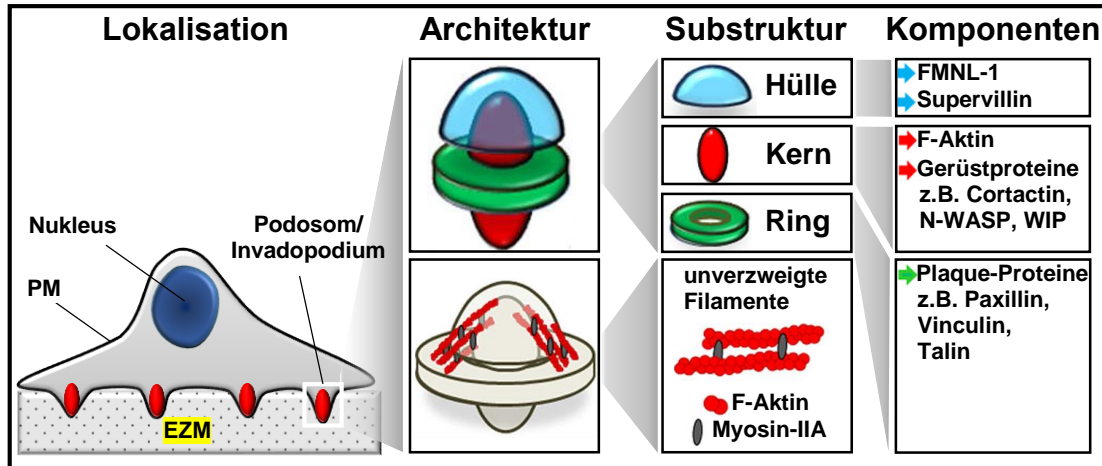
Die Ausbildung beider Strukturen wird durch Wachstumsfaktoren, insbesondere durch „Platelet-derived Growth Factors“ (PDGFs) (M. Quintavalle, L. Elia et al. 2010), „Transforming Growth Factor-beta“ (TGF- $\beta$ ) bzw. „Epidermal Growth Factors“ (EGFs) stimuliert (C. Varon, F. Tatin et al. 2006). Durch spezifische Bindung der Liganden an transmembranäre Rezeptoren, sog. Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), wird die assoziierte intrazelluläre Kinase Src mobilisiert. Src aktiviert wiederum die ABL-Kinase Arg. Diese phosphoryliert anschließend Cortactin an Tyrosin 421, zugunsten einer vermehrten Expression des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporters (NHE-1) sowie des Adapterproteins NCK-1 (Non-Catalytic Region Of Tyrosine Kinase Adaptor Protein 1) (C. C. Mader, M. Oser et al. 2011). Der ATP-abhängige Antiport von intrazellulären H<sup>+</sup>-Ionen gegen extrazelluläre Na<sup>+</sup>-Ionen mittels NHE-1, hat einen Anstieg des intrazellulären pH-Wertes zur Folge. Dadurch löst sich zum einen Cofilin von Cortactin, zusätzlich wird Cofilin funktionell aktiv und erzeugt freie Minus-Enden („barbed ends“) an fokalen Aktinfilamenten (M. A. Magalhaes, D. R. Larson et al. 2011). Währenddessen bildet Cortactin mit den Aktin-regulatorischen Proteinen N-WASP (Wiskott–Aldrich Syndrom Protein) und ARP2/3 (Actin-related Proteins 2/3), sowie WIP (WASP-interacting Protein), Dynamin und der CDC42 (Cell Division Control Protein 42) einen zunächst inaktiven Komplex im Bereich der zuvor generierten „barbed ends“ (H. Yamaguchi, M. Lorenz et al. 2005).

Nach anschließender Interaktion mit NCK-1 bewirkt der nunmehr aktive Komplex Nukleation und Elongation der Aktinfilamente sowie Polarisierung und Migration der Zellen unter Ausbildung der podosomalen/invadopodialen Strukturen (S. P. Chaki and G. M. Rivera 2013).

Invadopodien und Podosome bestehen hauptsächlich aus einem Kern, der von filamentösen Aktin-Strängen (F-Aktin) durchzogen ist. Diese sind mit den Gerüstproteinen Cortactin, Arp 2/3 und N-WASP und WIP, sowie den GTPasen CDC42 und Dynamin verknüpft (S. Linder 2009).

Der intrazelluläre Pol des Kernes ist zusätzlich von einer Hülle, bestehend aus Supervillin und „Formin-like Protein 1“ (FMNL-1), umgeben (A. T. Mersich, M. R. Miller et al. 2010). Myosin-IIA-interkalierende, unverzweigte Filamente verbinden die Hülle mit der kernumliegenden Ringstruktur (R. Bhawania, S. Cornfine et al. 2012). Zentrale Elemente sind

hierbei die adhäsiven Plaque-Proteine Paxillin, Vinculin und Talin (vgl. Abb. 1.2) (A. Zambonin-Zallone, A. Teti et al. 1989).



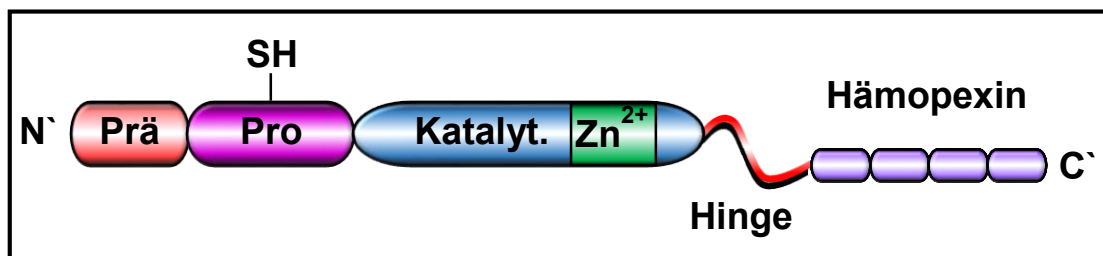
**Abbildung 1.2. Podosomale/invadopodiale Architektur und Zusammensetzung.** **Lokalisation:** Die Darstellung der Makrophagen, inklusive Nukleus und Plasmamembran (PM) auf einer 2-D Matrix (EZM) zeigt, dass Podosome/Invadopodien (rote Punkte) an der Zell-Substratseite (EZM) lokalisiert sind. **Architektur und Subkultur:** In der detaillierteren Wiedergabe der Podosome/Invadopodien sind sowohl Substrukturen (Hülle, Kern und Ring), als auch die lateral-verknüpfenden, unverzweigten Aktinmyosinfilamente zu erkennen. **Komponenten:** Während die Hülle aus den Proteinen FMNL-1 und Supervillin besteht (blaue Pfeile), setzt sich der Kern vorwiegend aus F-Aktin und Gerüstproteinen (u.a. Coactactin, N-WASP, WIP) zusammen (rote Pfeile). In den Ringstrukturen sind hingegen v.a. adhäsive Plaque-Proteine (Paxillin, Vinculin, Talin) vorzufinden (grüne Pfeile) (modifiziert nach S. Linder and C. Wiesner 2015).

Podosome und Invadopodien besitzen aufgrund ihrer Architektur vielseitige Funktionen, die es ihnen u.a. ermöglichen Zell-Matrix-Interaktionen zu etablieren, zu kontrollieren und zu beeinflussen. Dazu gehören Erkennung und Bindung von Substraten, Transmigration und Stabilisation, sowie „Antigen Sampling“ (S. Linder and C. Wiesner 2015). Hauptfunktion ist allerdings die Degradation der Extrazellulärmatrix (EZM) (S. Linder 2009). Hiefür werden proteolytische Enzyme, vorzugsweise ADAMS (A Disintegrin And Metalloproteinase) und MMPs (Matrix-Metalloproteasen) rekrutiert, sezerniert und aktiviert (Hannah Schachtner, Simon D. J. Calaminus et al. 2013).

### 1.3. MATRIX-METALLOPROTEASEN (MMPs)

Matrix-Metalloproteasen sind der Familie der Zink-abhängigen Endopeptidasen zuzuordnen. Als proteolytische Enzyme regulieren sie grundlegende Umbauprozesse der Extrazellulärmatrix (A. Gressner and T. Arndt 2013).

Die Primärstruktur der Matrix-Metalloproteasen setzt sich aus mehreren spezifischen Domänen zusammen (vgl. Abb. 1.3). Die N-terminale Prädomäne (Prä) ist ein Signalpeptid aus etwa 20, zumeist hydrophoben Aminosäuren (AS). Die Abspaltung der Prädomäne initiiert die Sekretion der Matrix-Metalloproteasen vom Ort der Translation, dem Endoplasmatischen Retikulum, in Richtung Golgi-Apparat. Dem Signalpeptid schließt sich die Prodomäne (Pro) an. Diese enthält das sog. Cystein-Switch Motif PRCGVDP. Daran ist ein Cysteinrest, mit einer freien Thiolgruppe (SH), assoziiert. Die Thiolgruppe bindet das Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ ) der katalytischen Domäne, sodass die Peptidase zunächst in ihrem inaktiven Zustand als Zymogen verweilt. Währenddessen ist das Zink-Ion mit drei Histidinresten des konservierten Bindemotifs HEXGHXXGHXXH der aktiven, katalytischen Domäne komplexiert (H. Nagase and J. F. Woessner, Jr. 1999). Mit Ausnahme von MMP7, MMP23 und MMP26, besitzen alle bislang bekannten Matrix-Metalloproteasen eine zusätzliche Hämapexin-homologe Domäne, die über eine  $\leq 75$  Aminosäure-lange Peptidkette, die sog. „Hinge Region“, mit der katalytischen Domäne verbunden ist. Diese Domäne reguliert die Protein-Protein-Interaktion der Matrix-Metalloproteasen (Helene Piccard, Philippe E. Van den Steen et al. 2007).



**Abbildung 1.3. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Matrix-Metalloproteasen.** Am N-Terminus (N') der Matrix-Metalloproteasen befindet sich eine Prädomäne (Prä). Dieser schließt sich die Prodomäne (Pro) an. Die Prodomäne enthält u.a. eine freie Thiolgruppe (SH), die mit dem Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ ) der katalytischen Domäne (Katalyt.) assoziiert ist. Alle Matrix-Metalloproteasen, ausgenommen MMP7, MMP23 und MMP26, verfügen über eine zusätzliche C-terminale (C') Hämapexin-homologe Domäne (Hämapexin). Diese ist über eine Peptidkette (Hinge) an die katalytische Domäne gebunden (modifiziert nach M. Egeblad and Z. Werb 2002).

Viele Matrix-Metalloproteasen enthalten darüber hinaus verschiedenste, hochspezifische Sequenzen. Während Gelatin-bindende Matrix-Metalloproteasen (MMP2, MMP9) eine Fibronectin-ähnliche Domäne aufweisen (J. M. Shipley, G. A. Doyle et al. 1996), haben membranständige Matrix-Metalloproteasen, wie MMP14, eine Transmembran-Domäne (Yoshifumi Itoh 2015). Intrazellulär aktivierte Matrix-Metalloproteasen, die nicht als Zymogene sezerniert werden, besitzen außerdem eine Furin-Erkennungs-Sequenz (A. G. Remacle, D. V. Rozanov et al. 2006).

Matrix-Metalloproteasen werden aufgrund der unterschiedlichen strukturellen sowie funktionellen Eigenschaften in folgende vier Klassen unterteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membranständige MMPs (M. Polette, B. Nawrocki-Raby et al. 2004). Kollagenasen (z.B. MMP1, MMP8) initiieren die extrazellulären Degradationsvorgänge durch Spaltung der Kollagenfibrillen Typ I-III. Das resultierende Spaltprodukt, die Gelatine, wird durch Gelatinasen (MMP2, MMP9) weiter abgebaut (H. Nagase and J. F. Woessner, Jr. 1999). Darüber hinaus degradieren Gelatinasen die zentralen Elemente der Basalmembran, Laminin und Kollagen Typ IV (Z. S. Zeng, A. M. Cohen et al. 1999). Stromelysine (z.B. MMP3, MMP10) hingegen zersetzen ein breites Spektrum an Substraten. Dazu zählen u.a. Fibronectine, Elastine, Caseine und Proteoglykane (S. M. Wilhelm, D. Wunderlich et al. 1992). Membranständige MMPs (z.B. MMP14, MMP24) zeichnen sich wiederum dadurch aus, dass sie, im Gegensatz zu den Matrix-Metalloproteasen der zuvor genannten Gruppen, nicht sezerniert werden, sondern in die Plasmamembran integrieren. Neben der Degradation von Fibrinen, Nidogenen und Proteoglykanen sind die membranständigen MMPs v.a. in der Aktivierung der Gelatinase MMP2 involviert (S. Hernandez-Barrantes, M. Bernardo et al. 2002).

Matrix-Metalloproteasen werden zur räumlichen und zeitlichen Kontrolle als inaktive Zymogene, sog. pro-MMPs, am Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Nach Abspaltung der Prädomäne werden die Zymogene zunächst zum Golgi-Apparat transportiert (S. Zucker and W.-T. Chen 2003). Am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die Gelatinasen MMP2 und MMP9 in VAMP4 (Vesicle-associated Membrane Protein 4)- und Rab40b (Ras-related In Brain 40b)-haltige Exportvesikel gepackt, bevor sie mit Hilfe

des Motorproteins Kinesin entlang der Mikrotubuli Richtung Podosome/Invadopodien weitergeleitet werden (A. Jacob, J. Jing et al. 2013). Dort werden die Gelatinasen voraussichtlich gemäß des "Kiss and Run"-Mechanismus exozytiert (E. M. Schnaeker, R. Ossig et al. 2004, J. K. Jaiswal, V. M. Rivera et al. 2009), um nachfolgend in der Extrazellulärmatrix durch hydrolytisches Aufspalten der Cystein-Zink-Verbindung („Cystein Switch“), mittels weiterer Proteasen (z.B. Plasmin, Trypsin, andere Matrix-Metalloproteasen), aktiviert zu werden (vgl. Tab. 1.2) (R. Visse and H. Nagase 2003).

Im Gegensatz dazu, werden die membranständigen MMPs bereits intrazellulär am TGN nach Dissoziation der Prodomäne durch die Proprotein Convertase Furin aktiviert (I. Yana and S. J. Weiss 2000). Die membranständigen MMPs werden nicht konsekutiv ins Zytosol der Zelle sezerniert, sondern in Speichervesikel auf Vorrat produziert. Die Speichervesikel werden anschließend unter Einwirken der Rab8 GTPase mobilisiert (J. J. Bravo-Cordero, R. Marrero-Diaz et al. 2007), sodass die membranständigen MMPs anschließend per Clathrin- bzw. Caveolin-vermittelter Endozytose in die Plasmamembran der podosomal/invadopodialen Strukturen integriert werden können (A. Remacle, G. Murphy et al. 2003).

Obwohl bekannt ist, dass die Sekretion von Kollagenasen und Stromelysinen ebenfalls von Podosomen und Invadopodien ausgeht (A. Lauzier, M. Charbonneau et al. 2011, N. Garamszegi, S. P. Garamszegi et al. 2012), ist der zugrundeliegende Transportmechanismus unbekannt. Beide Klassen werden allerdings, genau wie Gelatinasen, als Zymogene in die Extrazellulärmatrix sezerniert und erst nach dortiger Wechselwirkung mit anderen Proteasen (vgl. Tab. 1.2) aktiviert (H. Nagase, R. Visse et al. 2006).

**Tabelle 1.2. Hauptaktivatoren der Zymogene (pro-MMPs)\***

*\* (modifiziert nach G. Firestein, R. Budd et al. 2012)*

<b>MMP-Klasse</b>	<b>Zymogen</b>	<b>Hauptaktivatoren</b>
<b>Kollagenasen</b>	pro-MMP1	MMP3, -7, -10, -11
	pro-MMP8	MMP3, -10, Kallikrein, Cathepsin G, Trypsin
<b>Gelatinasen</b>	pro-MMP2	MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP
	pro-MMP9	MMP2, -3, -7, -13, Chymo-/Trypsin, Kallikrein



<b>Stromelysine</b>	pro-MMP3	Plasmin, Kallikrein, Chymo-/Trypsin, Chymase
	pro-MMP10	Plasmin, Chymo-/Trypsin
<b>membranständige MMPs</b>	pro-MMP11	Proprotein Convertase Furin
	pro-MMP14	Proprotein Convertase Furin

Nachdem die Matrix-Metalloproteasen durch Podosome bzw. Invadopodien freigesetzt und durch Proteasen aktiviert wurden, agieren sie aufgrund ihres hohen proteolytischen Potentials als Hauptmediatoren in Hinblick auf Veränderungen der zellulären Mikroumwelt (M. Polette, B. Nawrocki-Raby et al. 2004). Dahingehend sind sie sowohl in physiologischen Prozessen, wie der Wundheilung und der Organogenese, als auch in pathologischen Prozessen, u.a. in der Inflammation und in Autoimmunerkrankungen involviert (A. Page-McCaw, A. J. Ewald et al. 2007). Darüber hinaus sind Matrix-Metalloproteasen für die Karzinogenese und Tumorprogression essentiell (K. Kessenbrock, V. Plaks et al. 2010), da sie in der Lage sind die typischen Kennzeichen des malignen Karzinoms, d.h. Migration, Invasion, Metastasierung, Angiogenese und Wachstum des Primärtumors, zu modulieren (C. Gialeli, A. D. Theocharis et al. 2011). Infolgedessen wurde die Expression und Sekretion der Matrix-Metalloproteasen in diversen Tumorentitäten, wie dem malignen Melanom (S. Meierjohann, A. Hufnagel et al. 2010) und dem Mammakarzinom (A. G. Remacle, A. Noel et al. 1998), untersucht.

Zwei unabhängigen Studien von Bachmeier et al. 2001 und Köhrmann et al. 2009 zeigten, dass in Brustkrebszellen eine Metastasierung mit einer erhöhten Expression und Sekretion von MMP1, -2, -3, -7 (eingeschränkt), -10, -11, -12, -13, -14, -23, -27 und -28 einhergeht (B. E. Bachmeier, A. G. Nerlich et al. 2001, Andrea Köhrmann, Ulrike Kammerer et al. 2009). Des Weiteren wurde kürzlich im Rahmen einer Meta-Analyse eine positive Korrelation zwischen der Überexpression von MMP2, -9 und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines schlechten „Outcomes“ nach Brustkrebserkrankung festgestellt (F. Ren, R. Tang et al. 2015).

#### 1.4. DAS LIM UND SH3 DOMÄNEN PROTEIN 1 (LASP1)

Im Jahr 2012, wurde in Makrophagen ein neues Gerüstprotein am Sekretionsort der Matrix-Metalloproteasen, den Podosomen, identifiziert - das LIM and SH3 Domänen Protein 1 (LASP1) (M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012).

LASP1, früher MLN50 genannt, wurde erstmals 1995 in einer cDNA Bibliothek für Brustkrebsmetastasen identifiziert. Das zugrundeliegende Gen ist in einer chromosomalen Region (17q11-q21.3) lokalisiert, die bei 20-30 % aller Brustkrebspatienten mutiert ist. Dies suggeriert eine evtl. Funktion in Tumorprogression, Invasion und Metastasierung (C. Tomasetto, C. Moog-Lutz et al. 1995).

Das Protein LASP1 setzt sich aus 261 Aminosäuren zusammen. Sequenzanalysen sowie kristallographische Untersuchungen gaben weiteren Aufschluss bzgl. des strukturellen Aufbaus (vgl. Abb. 1.4). LASP1 besteht im Wesentlichen aus den folgenden vier Komponenten: einer N-terminalen LIM- (Lin11, Isl-1 & Mec-3) Domäne, zwei Nebulin Wiederholungen R1 und R2, einer „Linker Region“, sowie einer C-terminalen SH3- (Src-homology 3) Domäne (M. F. Orth, A. Cazes et al. 2015).

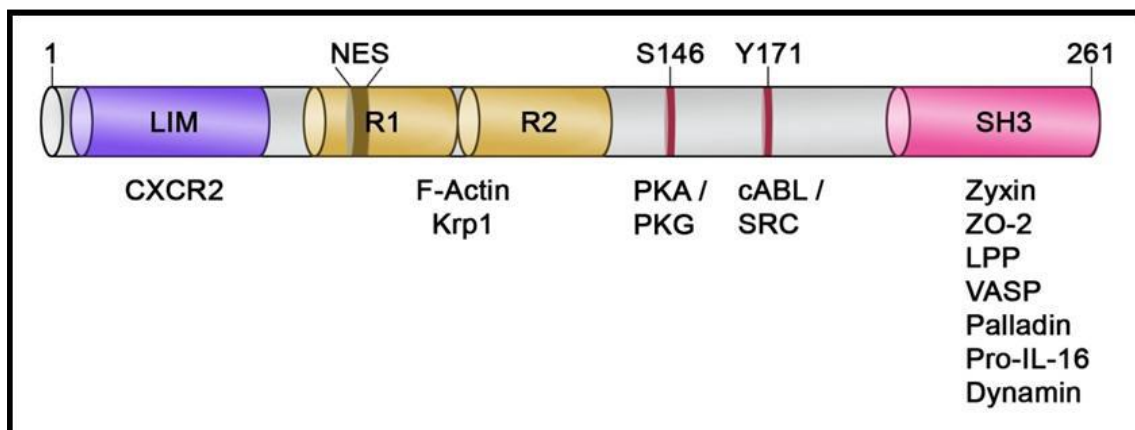
Die LIM-Domäne, eine doppelte Zinkfingerdomäne, ist aufgrund ihrer 8 Cystein- und 2 Histidinreste für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich (I. B. Dawid, J. J. Breen et al. 1998). Bis dato wurde als einziger Bindepartner der LIM-Domäne von LASP1 der Chemokinrezeptor CXCR2 identifiziert. Dabei beeinflusst die Bindung an die C-terminale Domäne von CXCR2, deren Chemotaxe und somit den Aufbau der Fokalkontakte (D. Raman, J. Sai et al. 2010).

Mit Hilfe der zwei Nebulin Wiederholungen R1 und R2, ist es LASP1 zusätzlich möglich mit F-Aktin bzw. dem an der Zellmigration und Pseudopodienwachstum-beteiligtem „Kelch-related Protein 1“ (Krp1) zu assoziieren (V. Schreiber, C. Moog-Lutz et al. 1998, H. J. Spence, L. McGarry et al. 2006).

Den Nebulin Wiederholungen folgt die „Linker Region“. Die darin enthaltenen Phosphorylierungsstellen (Serin 146 und Tyrosin 171) regulieren Funktion und Lokalisation von LASP1. Eine Phosphorylierung an Serin 146 durch cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKA und PKG) hat beispielsweise die Reduktion der

Bindungsaffinität von LASP1 zu Aktin, Zyxin und LPP (Lipoma-preferred Partner) zugunsten einer verringerten Zellmigration zur Folge (E. Butt, S. Gambaryan et al. 2003). An Tyrosin 171 hingegen, wird LASP1 von der Abelson Tyrosinkinase (ABL-Kinase) und der Src Kinase phosphoryliert. Beide Kinasen regulieren Assoziation und Dissoziation von LASP1 zu Fokalkontakten (Y. H. Lin, Z. Y. Park et al. 2004, J. Traenka, C. R. Hauck et al. 2009).

Am C-Terminus von LASP1 befindet sich eine 60 Aminosäuren-lange SH3-Domäne. Diese ist maßgeblich für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich und ermöglicht ferner die Bindung an prolinreiche Sequenzen anderer Proteine wie Zyxin, LPP (Lipome preferred partner), VASP (Vasodilator-stimulated Phosphoprotein), Palladin, Dynamin und ZO-2 (Zonula Occludens 2) (C. Keicher, S. Gambaryan et al. 2004, B. Li, L. Zhuang et al. 2004, A. S. Rachlin and C. A. Otey 2006, S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013). Eine phosphorylierungsabhängige Assoziation von ZO-2 mit LASP1 führt zur Translokation des Proteinkomplexes vom Zytosol in den Nukleus. Infolgedessen wird LASP1 im Zellkern angereichert (S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013). Diese erhöhte Kernlokalisierung wird u.a. bei Brustkrebs beobachtet (M. F. Orth, A. Cazes et al. 2015).



**Abbildung 1.4. Domänenstruktur und Bindungspartner von LASP1.** Die einzelnen Domänen des 261 Aminosäure-langen Proteins sind schematisch vom N-Terminus (1) beginnend Richtung C-Terminus (261) fortfolgend mit den bis dato bekannten Bindungspartnern (CXCR2, F-Aktin, Krp1, Zyxin, ZO-2, LPP, VASP, Palladin, Pro-IL-16 und Dynamin) dargestellt. N-terminal befindet sich die LIM-Domäne (LIM). Dieser folgen die zwei Nebulin Wiederholungen R1 und R2. Die Phosphorylierungsstellen der cAMP-/cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA/PKG) sowie der Tyrosinkinasen cABL und Src innerhalb der „Linker Region“, Serin 146 (S146) und Tyrosin 171 (Y171) sind markiert. Der „Linker Region“ schließt sich die SH3-Domäne (SH3) am C-Terminus an (übernommen von V. S. A. Vaman 2015).

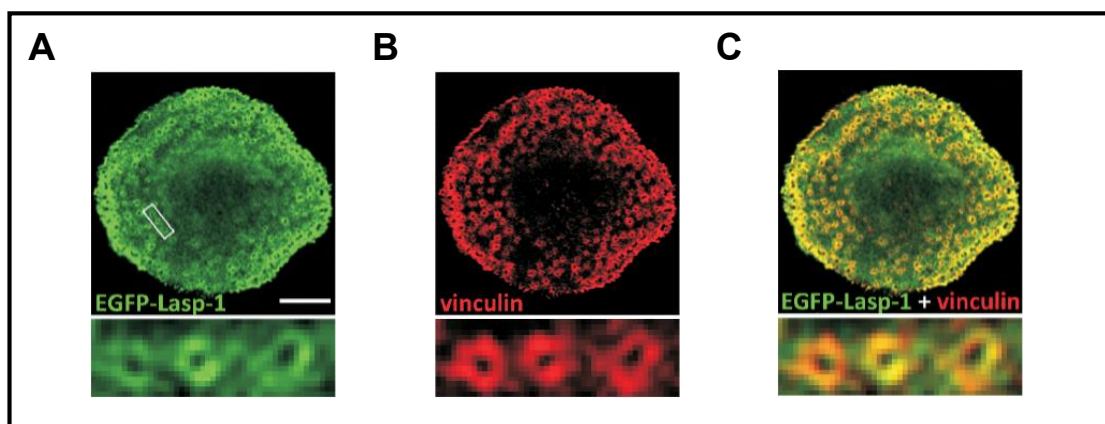
LASP1 ist ubiquitär, wenngleich in unterschiedlichen Konzentration, in menschlichen Geweben (z.B. Herz, Lunge, Leber, Gehirn, Niere) exprimiert (T. G. Grunewald and E. Butt 2008). Besonders hoch ist die Konzentration in F-Aktin-reichen, sekretorischen Zellen, wie Melanozyten und Parietalzellen (C. S. Chew, X. Chen et al. 2002).

Hierbei ist LASP1 möglicherweise an sekretorischen Prozessen beteiligt. In Melanozyten wird angenommen, dass LASP1, als Bindungspartner von Dynamin, für dessen Rekrutierung und Positionierung am Sekretionsort der Melanosome verantwortlich ist (V. S. A. Vaman, H. Poppe et al. 2015). Somit wäre LASP1 direkt an der Aktin-Dynamin-abhängigen Abschnürung der Melanosomvesikel beteiligt.

Ein vergleichbarer Mechanismus von LASP1 wird bzgl. der Sekretion und Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase-haltigen Vesikel in Parietalzellen diskutiert (C. S. Chew, X. Chen et al. 2008).

In der Zelle ist LASP1 vorwiegend mit zytoplasmatischen, dynamischen, Aktin-reichen Strukturen, wie Fokalkontakten, Lamellipodien, Pseudopodien, aber auch Podosomen assoziiert (M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012, S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013).

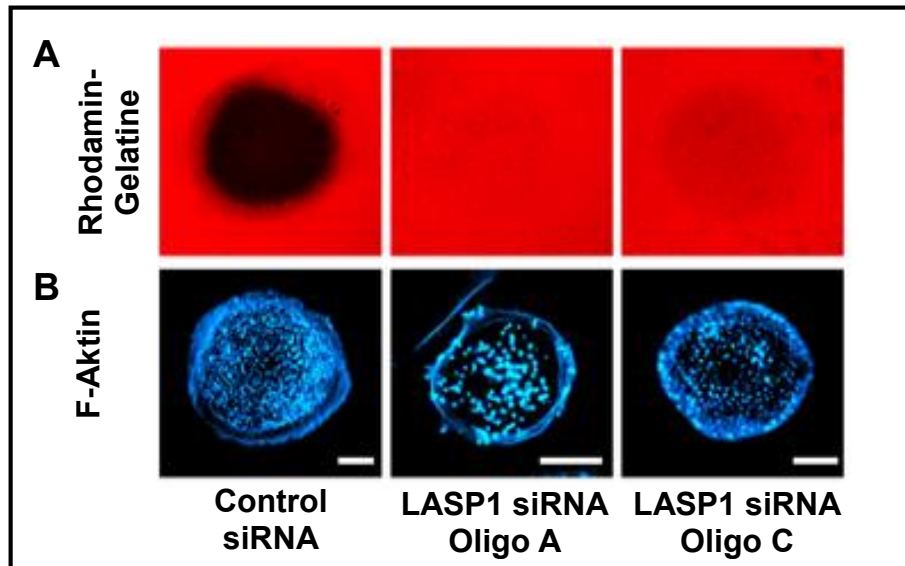
In Makrophagen konnte ferner festgestellt werden, dass LASP1 in der Ringstruktur der Podosomen, zusammen mit Vinculin, lokalisiert ist (vgl. Abb. 1.5).



**Abbildung 1.5. LASP1 ist in der Ringstruktur der Podosomen lokalisiert. (A-C)** Confokale Aufnahmen transfizierter humaner Makrophagen mit EGFP-LASP1 (A) und EYFP-Vinculin (B). Die Überlagerung (C) beider Aufnahmen (A+B) zeigt, dass LASP1 mit Vinculin in der Ringstruktur der Podosomen kolokalisiert. Die weiße Box zeigt jeweils den vergrößerten Bereich zur detaillierteren Bildwiedergabe. Größenbalken: 10  $\mu$ m (modifiziert nach M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012).

Der Knockdown von LASP1 beeinträchtigt, neben Größe, Anzahl und Beständigkeit der Podosomen, insbesondere die Matrixdegradationskapazität (vgl. Abb. 1.6) (M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012).

Der zugrundeliegende Signalweg von LASP1 wurde jedoch nicht weiter untersucht.



**Abbildung 1.6. Der Knockdown des neu identifizierten Gerüstproteins in der Ringstruktur von Podosomen – LASP1, beeinträchtigt insbesondere die Matrixdegradationskapazität. (A+B)** Confokale Aufnahmen transfizierter humaner Makrophagen mit Control siRNA und LASP1 siRNA Oligo A bzw. Oligo C. Die Zellen wurden nach der Transfektion auf Rhodamin-Gelatine **(A)** ausgesät und nach 6 h fixiert. Das Zytoskelett wurde mit Cy5-Phalloidin blau **(B)** gefärbt. Die Matrixdegradation ist als schwarze Fressstelle im Gelatinefilm sichtbar **(A)**. Nach dem LASP1 Knockdown mit LASP1 siRNA Oligo A bzw. Oligo C ist eine signifikante Abnahme der Fressstellen zu beobachten. Dies entspricht einer Reduktion des invasiven Potentials der Makrophagen. Größenbalken: 10 µm (modifiziert nach M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012).

Neben seiner physiologischen Funktion als Gerüstprotein wurde eine Überexpression des Proteins in diversen Tumorentitäten beobachtet, u.a. in Brustkrebszellen (J. J. Frietsch, T. G. Grunewald et al. 2010), in Prostatakrebszellen (R. Nishikawa, Y. Goto et al. 2014), in Eierstockkrebszellen (T. G. Grunewald, U. Kammerer et al. 2007), in Dickdarmkrebszellen (H. Wang, H. An et al. 2013), sowie im Medulloblastom (C. Traenka, M. Remke et al. 2010), dem Leberzellkarzinom (R. Tang, F. Kong et al. 2012) und dem oralen Plattenepithelzellkarzinom (Fumie Shimizu, Masashi Shiiba et al. 2013).

In den letzten Jahren wurden vermehrt Untersuchungen durchgeführt, um die Rolle von LASP1 in der Karzinogenese zu explorieren. In Brustkrebs-, Eierstock-, Prostata- und Dickdarmkrebszellen konnte u.a. gezeigt werden, dass der LASP1 Knockdown eine Abnahme der Migration und Zellproliferation, sowie einen Arrest des Zellzyklus in der G<sub>2</sub>/M-Phase zur Folge hat (T. G. Grunewald and E. Butt 2008, J. J. Frietsch, T. G. Grunewald et al. 2010).

Immunhistochemische Analysen beim Mammakarzinom und dem Medulloblastom wiesen darüber hinaus auf eine nukleäre Lokalisation des Proteins hin, die mit der Tumorgröße und einem schlechteren Überleben der Patienten korrelierte (J. J. Frietsch, T. G. Grunewald et al. 2010).

Aufgrund obiger Korrelation wird eine regulierende Funktion von LASP1 in Bezug auf die Genexpression diskutiert (M. F. Orth, A. Cazes et al. 2015). Duvall-Noelle et al. beschäftigten sich mit dieser Thematik und beobachteten eine Kollokalisierung von LASP1 mit epigenetischen Faktoren, insbesondere mit UHRF1, DNMT1 und G9a sowie dem Transkriptionsfaktor Snail1 (N. Duvall-Noelle, A. Karwandyar et al. 2015). Durch die Regulation des Calcium-bindenden Proteins S100A4 induziert LASP1 möglicherweise auch die TGF- $\beta$ -vermittelte Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (H. Wang, J. Shi et al. 2014).

### 1.5. ZIELSETZUNG

Bekanntermaßen erfordern Zellmigration und Invasion die Degradation der umliegenden Extrazellulärmatrix (M. Yilmaz and G. Christofori 2009). Dieser Umbauprozess erfolgt primär durch proteolytische Endopeptidasen, sog. Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Damit diese ihre funktionelle Aktivität ausüben können, müssen sie zunächst rekrutiert und mit Hilfe podosomaler bzw. invadopodiale Strukturen in die EZM sezerniert werden (S. Linder 2007).

Das LIM und SH3 Domänen Protein 1 (LASP1) beeinflusst, als neu in Podosomen identifiziertes regulatorisches Gerüstprotein, neben Größe, Anzahl und Beständigkeit, insbesondere die Matrixdegradationskapazität von Makrophagen (M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012).

Da LASP1 außerdem in humanen Brustkrebszellen an Fokalkontakten, den Bildungsorten von Invadopodien, dektektiert wurde (T. G. Grunewald, U. Kammerer et al. 2007), war das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit die Kollokalisierung von LASP1 und den Podosomen-äquivalenten Strukturen, den Invadopodien, nachzuweisen. Ferner sollte untersucht werden, inwiefern das Protein in humanen Brustkrebszellen das Matrixdegradationsverhalten, wie zuvor für Makrophagen beschrieben, beeinflusst.

Weiterhin sollte LASP1 bzgl. einer evtl. regulatorischen Bedeutung auf die für die EZM-Degradation wichtigen Matrix-Metalloproteasen analysiert werden. Dabei sollte folgende Fragestellung beantwortet werden:

Reguliert LASP1 die Matrix-Metalloproteasen auf transkriptioneller Ebene durch seine Lokalisation im Nukleus oder reguliert LASP1 die Matrix-Metalloproteasen als Strukturprotein durch Beeinflussung der Sekretion der inaktiven Zymogene in die EZM?

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. MATERIAL**

#### **2.1.1. Zelllinien**

Die HUF (Human Uterine Fibroblasts) Zellen sowie die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Kämmerer aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt.

Die stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen wurden in der Arbeitsgruppe via lentiviraler Infektion von Dr. Perera generiert.

#### **2.1.2. Reagenzien für die Zellkultur**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>
FBS	10270106	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Opti-MEM®	31985070	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS (10X) ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	L1835	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	SV30010	GE Healthcare Life Sc., Fairfield, CT, USA
RPMI1640 GlutaMAX™	61870010	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trypsin-EDTA	T3924	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

#### **2.1.3. Antikörper**

##### **2.1.3.1. Primärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>
LASP1	Polyklonal; Kaninchen	WB 1:2000	IG1343	immunoGlobe, Himmelstadt, Deutschl.



pLASP1 Ser146	Polyklonal; Kaninchen	WB 1:3000	IG566	immunoGlobe, Himmelstadt,Deutschl.
MMP1	Polyklonal; Kaninchen	WB 1:500	AB38929	Abcam, Cambridge, UK
MMP2	Polyklonal; Kaninchen	WB 1:100	SC10736	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschl.
MMP3	Monoklonal; Kaninchen	WB 1:1000	AB52915	Abcam, Cambridge, UK
MMP9	Polyklonal; Kaninchen	WB 1:500	AB19016	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
β-Aktin	Polyklonal; Kaninchen	WB 1:3000	SC1616	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschl.

### 2.1.3.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate	WB 1:5000	1706515	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

### 2.1.4. Primer

Die Primer wurden, nach einführender Instruktion durch Dr. Daniel Jahn aus der Hepatologie, des Universitätsklinikums Würzburg, eigenständig designt. Erworben und hergestellt wurden die Primer von der Firma Microsynth AG, Balgach, Schweiz.

Gen	Primer	Sequenz
RPLP0	Forward Reverse	5`- CATCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT -3` 5`- CAATCTGCAGACAGACACTGGC -3`
LASP1	Forward Reverse	5`- AAAACCTTCGCCTCAAGCAA -3` 5`- ACTCCTCCTTGTAGCGCACCT -3`
TFB1M	Forward Reverse	5`- TTGTCCCCAAACCAGAGGTG -3` 5`- TTCTGAACCACTTTTTCCACCAG -3`
MMP1	Forward Reverse	5`- GCTAACCTTTGATGCTATAACTACGATTC -3` 5`- GGATTTGTGCGCATGTAGAATC -3`

MMP2	Forward	5`- CCCCAAAACGGACAAAGA -3`
	Reverse	5`- CCTTCAGCACAAACAGGTTGC -3`
MMP3	Forward	5`- CAACATAGAGCTAAGTAAAGCCAGTGG -3`
	Reverse	5`- CTAGATATTTCTGAACAAGGTTTCATGCT -3`
MMP9	Forward	5`- TCCCTGGAGACCTGAGAACCA -3`
	Reverse	5`- CGACTCTCCACGCATCTCTG -3`
MMP14	Forward	5`- GTCAGGAATGAGGATCTGAATGG -3`
	Reverse	5`- CGAGGGGTCACTGGAATGC -3`

### 2.1.5. siRNAs

siRNA	Zielsequenz	Hersteller
Control siRNA	5`- AATTCTCCGAACGTGTACGT -3`	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
LASP1 siRNA	5`- AAGCATGCTTCCATTGCGAGA -3`	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

### 2.1.6. Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR® Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.1.7. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Katalognummer	Hersteller
Agarose NEE0	2267	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	A9434	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aprotinin	A1250000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
APS	215589	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua ad iniectabilia	1080181	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, Deutschland
Borax	T880	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Brilliant Blau R	B7920	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromphenolblau	B0126	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA	23209	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Casein Protein Gel	64052	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Collagen	C9791	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DABCO®	D27802	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DAPI	D9564	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Developing Buffer (10X)	LC2671	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DMSO	D2650	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Doxycycline hyclate	D9891	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DTE	D8161	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	E6758	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	33209	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	32205	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Forskolin	66575	BIOZOL Diagnostica Vertrieb, Eching, Deutschland
Gelatine	4274	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Gelatin Protein Gel	61752	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GelRed™	41003	Biotium Incorporated, Hayward, CA, USA
Glutaraldehyd	G5882	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycerin	3783	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glyzin	G8898	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Goat-Serum	G9023	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES	H7006	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	107022	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Kaliumchlorid	P9541	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LB®-Puffer (5X)	LB5N-8	Faster Better Media LLC, Hunt Valley, MD, USA
Leupeptin	L5793	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Luminol Natriumsalz	A4685	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Metafectene®	T020	Biontex Laboratories GmbH, Planegg, Deutschland
Methanol	322415	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MicroAmp® Optical Adhesive Film	4360954	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Milchpulver	170-6404	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mowiol®4-88	0713	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NHS-Rhodamin	46406	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumchlorid	31434	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdesoxycholat	D6750	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumphosphat	S0751	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumhydroxid Lösung	109137	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Natriumhydroxid Pellets	S5881	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Oregon Green® 488 Phalloidin	O7466	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
p-Cumarinsäure	C9008	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pefabloc® SC	76307	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pepstatin A	P5318	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PFA	P6148	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PMA/ TPA	524400	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Ponceau S	P3504	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Renaturing Buffer (10X)	LC2670	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rotiphorese® Gel 30	3029	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant (5X)	K015	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SeeBlue® Plus2 Prestained Protein Standard	LC5925	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS	L3771	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SDS Running Buffer (10X)	LC2675	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS Sample Buffer (2X)	LC2676	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sucrose	S0389	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tergitol® NP-40	NP40	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS/ HCl	A1379	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton™ X-100	T8787	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TWEEN® 20	P1379	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	M6250	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Deckglas rund	15 mm/ 25 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Desinfektionsmittel	Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Dialyse-Kassette	Slide-A-Lyzer™ 3.5k	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Einmalspritze	5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Filterpapier	Gefaltet; 240 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Röntgenfilm	FUJIFILM Super RX	Fujifilm Medical Systems, Tokio, Japan
Insulinspritze	Omnican 40	Braun GmbH, Kronberg i. T., Deutschland
Kryoröhrchen	2ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Nitrilhandschuhe	SensiCare® 200	Medline Industries, Kleve, Deutschland
Nitrocellulose Membran	BA85 30 cm x 3 m	GE Healthcare Life Sc., Fairfield, CT, USA
Objektträger	SuperFrost®	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitze	Biosphere® Filter Tip  Combitips advanced®  Gel-loading Tip	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland  Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
qPCR Reaction Plate	MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Scepter Sensor-Spitze	X-50; 60 µm	Merck Millipore, Billerica, MA, USA

Verschlussfolie	PARAFILM® M	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zellkulturflasche/-platte	T25/ T75 6-Well/ 12-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschl.
Zellschaber	C25B	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Mikroreaktionsgefäß	0,5 ml/ 1,5 ml/ 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon®	15 ml/ 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschl.

### 2.1.9. Geräte und Instrumente

Gerät/Instrument	Modell	Hersteller
Biosafety Werkbank (Kl.2 Typ A2)	SterilGARD® e3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
Brutschrank	CO <sub>2</sub> Inkubator 3336	Labotect GmbH, Rosdorf, Deutschland
ELISA microplate reader	Wallac 1420 VICTOR2™	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Elektrophoresekammer	PROTEAN II XL Cell/ Sub-Cell® GT Cell  PerfectBlue Tank Web S	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA  Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Feinwaage	Type 1801/ Universal	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Filmentwickler	X-OMAT M35	Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA
Heizplatte	PC-420D	Coring Diagnostix, Gernsheim, Deutschland
Imager	Amersham™ Imager 600	GE Healthcare Life Sc., Fairfield, CT, USA

Magnetrührer	RCT basic	IKA-Werke,Staufen i. B., Deutschland
Mikroinjektionsspritze	Hamilton 25µl Syringe	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
PCR Thermal Cycler	peqSTAR 96X	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	PHM 92 LAB	Radiometer Analytical, Lyon, Frankreich
qPCR System	ViiA™ 7 PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Scepter™ 2.0 (automat. Zellzähler)	PHCC00000	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Scherbeneismaschine	AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Laborschüttler	Heidolph Duomax 1030  KS 10	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland  Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Spannungsgerät	Consort E 455  PowerPac™ HC	Consort, Turnhout, Belgien  Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Test tube shaker	L46	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Thermomixer Compact	5350	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferkammer	Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
UV-Tisch	TFX 35	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
UV/VIS-Spectrophotometer	Ultra Spec 2000	GE Healthcare Life Sc., Fairfield, CT, USA
Vakuum-Pumpe	VACUUBRAND Membran Pumpe	Vaccubrand, Wertheim, Deutschland
Vortex-Genie	K-550-GE	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz



Wasserbad	GFL 1083	GFL, Willich, Deutschland
Kühl-/Gefrierschrank		
Kühlschrank	4 °C – 8 °C	Kirch GmbH, Offenberg, Deutschland
Gefrierschrank	- 20 °C	Liebherr MediLine, Newport, UK
	- 80 °C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroskope		
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
	BZ 9000	Keyence, Osaka, Japan
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetten		
Einkanalpipette	0,5-10 µl / 2-20 µl 20-200 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipette® plus	200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pasteurpipette	5 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Serologische Pipette	5ml/ 10ml / 25ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschl.
Pipette Controller	accu-jet® pro	BrandTech Scientific, Essex, CT, USA
Zentrifugen		
Zellkultur-Zentrifuge	Universal 320	HettichLab, Tuttlingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Mikro 120	HettichLab, Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge	5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Concentrator	Concentrator plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
--------------	-------------------	---------------------------------------

### 2.1.10. Software und Webseiten

ImageJ Software	ImageJ Software version 1.48
Primer Express® Software	Primer Express® Software version 3.0.1
ViiA™ 7 PCR System Software	ViiA™ 7 Software version 1.2.4
FunRich Software	Functional Enrichment Analysis Tool
BZ-9000 Software	BZ-II Viewer
Adobe Photoshop	Photoshop CS2
Microsoft Office	Office 2013
Molarity Calculator	<a href="http://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform">http://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform</a>
Microsynth	<a href="https://srvweb.microsynth.ch/">https://srvweb.microsynth.ch/</a>
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
Primer-BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Reverse Complement	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>
Universal ProbeLibrary Assay Design Center	<a href="https://lifescience.roche.com/shop/en/us/overview/s/brand/universal-probe-library">https://lifescience.roche.com/shop/en/us/overview/s/brand/universal-probe-library</a>

### 2.1.11. Puffer und Lösungen

#### **Agarose-Gel (1 %, 30 ml)**

(A) TAE-Puffer (1X)	:	30 ml
Agarose	:	0,3 g
(B) GelRed™	:	1,2 µl

Stocklösung – Beide Substanzen (A) in der Mikrowelle aufkochen, bis eine klare Lösung ohne Schlieren entsteht.

Arbeitslösung – Nach Abkühlen auf circa 60°C, 1,2 µl GelRed™ (B) zugeben und ausgießen.

#### **Ammoniumpersulfat-Lösung (10 %, 10 ml)**

APS	:	1 g
-----	---	-----

Arbeitslösung – 1 g APS in 10 ml VE-Wasser lösen und bei 4 °C lagern.

#### **Coomassie – Brilliant Blau (Färbelösung)**

Brilliant Blau R	:	0,8 g
Isopropanol, absolut	:	200 ml
Essigsäure	:	200 ml

Arbeitslösung – Nach Zugabe von 2 l VE-Wasser, Färbelösung filtrieren und bei RT verwahren.

#### **Coomassie – Entfärbelösung**

Essigsäure	:	100 ml
Ethanol	:	100 ml

Arbeitslösung – Reagenzien in 1 l VE-Wasser gelöst, bei RT lagern.

#### **ECL home-made**

##### Stocklösung bestehend aus:

Reagenz A	:	200 ml 0,1 M TRIS/ HCL + 50 mg Luminol
Reagenz B	:	11 mg p-Cumarinsäure in 10 ml DMSO
Reagenz C	:	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Während Reagenz C bei Raumtemperatur zu verwahren ist, lagern Reagenz A und Reagenz B bei 4 °C.

Arbeitslösung – 3 ml-Ansatz, bestehend aus 3 ml Reagenz A + 300 µl Reagenz B + 0,9 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, unmittelbar vor Gebrauch zusammenmischen.

**Gel-Elektrophoresepuffer (10X, pH 8,9, 4 l)**

TRIS/ HCl	:	120 g
Glyzin	:	576 g
SDS	:	40 g

Stocklösung – Substanzen in VE-Wasser lösen, pH auf 8,9 einstellen und auf 4 l auffüllen. Puffer anschließend bei Raumtemperatur verwahren.

Arbeitslösung – Zum Gebrauch 1:10 mit VE-Wasser verdünnen.

**Glutaraldehyd-Lösung (0,5 %, 1 l)**

Glutaraldehyd	:	5 ml
---------------	---	------

Arbeitslösung – 5 ml Glutaraldehyd zu 955 ml VE-Wasser geben und bei 4 °C lagern.

**Goat-Serum (5 %)**

Goat-Serum	:	1 ml
0,1 % Triton/ PBS	:	20 ml

Arbeitslösung – Aliquotieren und in 2 ml Zentrifugenröhrchen bei -20 °C wegfrieren.

**Hypotoner Puffer (1X, pH 8,1, 100 ml)**

10 mM HEPES	:	238 mg
10 mM KCl	:	74 mg
1,5 mM EDTA	:	29 mg
200 mM Sucrose	:	6,84 g

Arbeitslösung – Reagenzien in VE-Wasser lösen, pH-Wert auf 8,1 einstellen und auf 100 ml auffüllen. Puffer anschließend bei 4 °C lagern.

**Laemmli Probenpuffer (3X, 100 ml, pH 6,7)**

(A) 200mM TRIS/ HCl	:	2,42 g
SDS	:	6 g
Glyzerin	:	19 g
Bromphenolblau	:	3 mg
(B) $\beta$ -Mercaptoethanol	:	10 %

Stocklösung – Substanzen (A) in 100 ml VE-Wasser gelöst, bei RT lagern.

Arbeitslösung – Vor Gebrauch 9 ml Stocklösung mit 1 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzen.

**Mowiol (pH 8,5)**

Reagenz A	:	6 g Glyzerin + 2,4 g Mowiol®4-88 + 6 ml H <sub>2</sub> O
Reagenz B	:	12 ml 0,2 M TRIS/ HCl
Reagenz C	:	2,5 % DABCO

Arbeitslösung – Reagenz A über Nacht bei RT ruhen lassen. Anschließend unter Zugabe der Reagenz B den pH-Wert auf 8,1 einstellen und 10 s bei 50 °C verrühren. Nach Lösen des Mowiols, den Ansatz 15 s bei 5000 x g zentrifugieren. Abschließend Reagenz C beifügen und bei -20 °C luftdicht aufbewahren.

**Natriumhypochlorid-Lösung (100 ml)**

50 mM NH <sub>4</sub> Cl	:	370 mg
PBS	:	100 ml

Arbeitslösung – 370 mg NH<sub>4</sub>Cl in 100 ml PBS lösen und bei RT lagern.

**Natriumborat-Puffer (1X, pH 9,3, 500 ml)**

50 mM Borax	:	9,535 g
-------------	---	---------

Arbeitslösung – 9,535 g Borax in 500 ml VE-Wasser geben und bei RT aufbewahren.

**Natriumlaurylsulfat-Lösung (10 %, 100 ml)**

SDS	:	10 g
-----	---	------

Arbeitslösung – 10 g SDS in 100 ml VE-Wasser gelöst, bei RT lagern.

**Paraformaldehydlösung (4 %, 50 ml)**

4 % PFA	:	2 ml
PBS	:	50 ml

Arbeitslösung – Aliquotieren und in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen bei -20 °C wegfrieren.

**PBS-Puffer(1X, 5 l)**

PBS (10X) ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	:	500 g
--	---	-------

Arbeitslösung – 500 g PBS (10X) ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> in 5 l VE-Wasser lösen, in Flaschen à 500 ml aliquotieren, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

**Polyacrylamid-Gel (1X)**

Trenngel (10 %)	:	5,3 ml VE-Wasser + 3,3 ml 30 % Acryl-/ Bisacrylamid + 1,25 ml Puffer B + 0,1 ml 10 % SDS + 0,1 ml 10 % APS + 10 µl TEMED
Sammelgel	:	1,8 ml VE-Wasser + 0,35 ml 30 % Acryl-/ Bisacrylamid + 325 µl Puffer A + 25 µl 10 % SDS + 0,1 ml 10 % APS + 5 µl TEMED

**Ponceau S (0,5 %, 100 ml)**

Ponceau S	:	0,5 g
10 % Essigsäure	:	100 ml

Arbeitslösung – 0,5 g Ponceau S in 100 ml 10 %iger Essigsäure lösen und bei RT lagern.

**Puffer A (1X, pH 6,7, 100 ml)**

0,5 M TRIS/ HCl	:	6,057 g
-----------------	---	---------

Arbeitslösung – 6,057 g TRIS/ HCl in 80 ml VE-Wasser lösen, pH-Wert auf 6,7 einstellen und auf 100 ml auffüllen. Anschließend bei RT lagern.

**Puffer B (1X, pH 8,9, 100 ml)**

3 M TRIS/ HCl	:	36,34 g
---------------	---	---------

Arbeitslösung – 36,34 g TRIS/HCl in 50 ml VE-Wasser unter Einstellen des pH-Wertes auf 8,9 lösen und auf 100 ml auffüllen. Puffer bei RT aufbewahren.

**RIPA-Puffer (1X, pH 7,6, 100 ml)**

25 mM TRIS/ HCl	:	2,5 ml
150 mM NaCl	:	0,875 g
1 % Tergitol® NP-40	:	1 ml
1 % NaDesoxycholat	:	1 g
0,1 % SDS	:	100 mg

Arbeitslösung – Substanzen in 100 ml VE-Wasser lösen und bei 4 °C lagern.

**Sucroselösung (100 %, 100 ml)**

Sucrose	:	100 g
PBS	:	100 ml

Arbeitslösung – 100 g Sucrose mit 100 ml PBS vermengen und bei 4 °C lagern.

**TAE-Puffer (50X, pH 8,5, 1 l)**

TRIS/ HCl	:	242 g
0,5 M EDTA	:	18,61 g
Essigsäure	:	57,1 ml

Stocklösung – 242 g TRIS/ HCl primär in 750 ml VE-Wasser lösen. 18,61 g EDTA, sowie 57,1 ml Essigsäure zugeben. Anschließend den pH-Wert auf 8,5 einstellen, Lösung auf 1 l auffüllen und bei RT lagern.

Arbeitslösung - Vor Gebrauch 1:50 mit VE-Wasser verdünnen.

**TBS-Puffer (10X, pH 7,5, 1 l)**

(A) 100 mM TRIS/HCl	:	12,1 g
1,5 M NaCl	:	87,6 g
(B) 0,1 % TWEEN 20	:	1 ml

Stocklösung – Substanzen (A) in 750 ml VE-Wasser geben und den pH-Wert auf 7,5 einstellen. Anschließend die Lösung auf 1 l auffüllen und bei RT lagern.

Arbeitslösung – 100 ml Stocklösung mit 900 ml VE-Wasser vermischen und 1 ml TWEEN 20 zugeben ( $\cong$  1 % TBS-T).

**TBS-T Milch (3 %, 100 ml)**

3 % Milchpulver	:	3 g
1 % TBS-T	:	100 ml

Arbeitslösung – 3 g Milchpulver (Nonfat-Dried Milk) in 100 ml 1 % TBS-T lösen und bei 4 °C lagern.

**TE-Puffer (1X, pH 8,0, 100 ml)**

0,5 M EDTA	:	14,6 g
1 M TRIS/ HCl	:	12,1 g

Arbeitslösung – 14,6 g EDTA und 12,1 g TRIS/ HCl unter Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 in 100 ml VE-Wasser geben. Puffer bei RT lagern.

**Transferpuffer (1X, pH 10, 10 l)**

(A) 25mM TRIS/ HCl	:	30 g
192 mM Glyzin	:	144 g
NaOH-Pellets	:	56 g
(B) Methanol	:	2 l

Arbeitslösung – Reagenzien (A) in 5 ml VE-Wasser unter Rühren lösen bis sich ein klares Gemisch ergibt. Anschließend 2 l Methanol zugeben und den Puffer auf 10 l mit VE-Wasser auffüllen. Der Transferpuffer ist bei 4 °C zu lagern.

**Triton X-Lösung (0,1%, 100ml)**

Triton™ X-100	:	100 µl
PBS	:	100 ml

Arbeitslösung – 100 µl Triton™ X-100 mit 100 ml PBS vermengen. Als Aliquots à 2 ml bei -20 °C wegfrieren.



## 2.2. METHODEN

### 2.2.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Zellkulturbedingungen

Die Wildtyp (wt) MDA-MB-231 und stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen wurden in einem mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin angereichertem RPMI1640 GlutaMAX™ Medium (vgl. Tab. 2.1) bei 38 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Da LASP1 in späteren Passagen tendenziell einer Hochregulation unterliegt (H. J. Sun, Y. Y. Bahk et al. 2006), wurden die Zellen für Folgeexperimente maximal bis zu Passage 6 verwendet. Ferner ist zu beachten, dass die Zellen bei einer Konfluenz von 70 % – 90 %, i.d.R. nach 3-4 d, zu passagieren sind. Dabei wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums in PBS (vgl. Tab. 2.1) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin-EDTA (vgl. Tab. 2.1) hinzugegeben. Der Inkubation für 2 min im Brutschrank, folgte das Überführen der Zellsuspension in einem mit 5 ml RPMI1640 gefüllten 15 ml Greiner. Dies hat die Inaktivierung des Trypsins zur Folge. Durch anschließende Zentrifugation bei 160 x g für 4 min, wurden die Zellen pelletiert. Das Zellsediment wurden in 1 ml RPMI1640 resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung ausgesät. Die HUF Zellen wurden ausschließlich in der Zymographie, als interne MMP-Kontrolle, verwendet. Insofern wurden uns dementsprechende Lysate von Prof. Dr. Kämmerer aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.1. RPMI1640, PBS und Trypsin-EDTA/ Fläche

Zellkulturplatte/-flasche	Fläche	RPMI1640	PBS	Trypsin
12-Well	3,9 cm <sup>2</sup>	1,0 ml	1,0 ml	0,6 ml
6-Well	9,6 cm <sup>2</sup>	2,0 ml	2,0 ml	1,5 ml
T25	25 cm <sup>2</sup>	5,0 ml	5,0 ml	3,0 ml
T75	75 cm <sup>2</sup>	15,0 ml	10,0 ml	5,0 ml

### 2.2.1.2. Auftauen einer Zellkultur

Die Kryoröhrchen mit dem zellulären Inhalt wurden vom N<sub>2</sub>-Gefäß entnommen und zum Auftauen für 2 min in ein 37 °C Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Zellen in eine T25 mit 10 ml warmem RPMI1640 Medium gegeben. Nach Zentrifugation bei 160 x g für 2 min wurde das Zellpellet in 1 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert. Das Resuspensat wurde zusammen mit 5 ml RPMI1640 Medium in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank zur Inkubation gestellt.

### 2.2.1.3. Aufkonzentrieren von Lösungen und Proteinen

Die Quantifikation von Proteinen im konditionierten Medium durch Immunblots bzw. Zymogramme, erforderte eine vorhergehende Aufkonzentrierung. Dies geschah unter Verwendung des Concentrator plus der Firma Eppendorf.

Dabei wurden primär 500 µl des konditionierten Mediums in ein 1,5 ml Mikrogefäß überführt und in den zuvor programmierten Concentrator plus (vgl. Tab. 2.2) gestellt. Das Gerät wurde sodann gestartet. Bei 128 x g wurde, zur Vakuumierung der Zentrifuge, die Membran Pumpe aktiviert. Das Programm lief mit einem Enddruck von max. 20 mbar und 248 x g bis die gewünschte Aufkonzentration, i.d.R. 5:1 bzw. 10:1, erreicht wurde. Das Konzentrat wurde bei -20 °C weggefroren.

Tabelle 2.2. Programm des Concentrator plus

Modus	Bremsfunktion	Temperatur	Laufzeit
V-AQ (vacuum-aqueous)	Ein	RT	∞

### 2.2.1.4. Ernten einer Zellkultur

Die Zellen wurden in Analogie zur Subkultivierung (vgl. 2.2.1.1) geerntet. Im Unterschied wurde hierbei jedoch die Zellzahl des in 1 ml RPMI1640 resuspendierten Zellsediments bestimmt. Dafür wurden 10 µl des Resuspensats 1:20/ 1:50 in PBS verdünnt. Der Ansatz wurde sodann in den Sensor des Scepter™ 2.0 aufgenommen. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellen}_{\text{Resuspensat}} = \text{Anzeige (Zellen/ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Abschließend wurden die Zellen in der gewünschten Konzentration lysiert bzw. ausgesät.

#### **2.2.1.5. Einfrieren einer Zellkultur**

Nach Erreichen der Passage 5 wurden die Zellen nach oben beschriebenen Schema (vgl. 2.2.1.1) in eine T75 passagiert und im Brutschrank inkubiert. Bei einer Konfluenz von  $\geq 90\%$  erfolgte die Pelletierung der Zellen. Diese wurden wiederum in Freezing Medium, bestehend aus 3,4 ml RPMI1640, 0,6 ml DMSO und 2,0 ml FBS, resuspendiert und in Kryoröhrchen à 1,5 ml bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Die terminale Lagerung in flüssigem  $\text{N}_2$  erfolgte nach einer Zeitspanne von 3 d.

#### **2.2.1.6. siRNA-Transfektion**

Der transiente LASP1 Knockdown in wt MDA-MD-231 Zellen erfolgte, gemäß dem Protokoll des Herstellers, unter Einsatz von Metafectene<sup>®</sup>. Zuerst wurde der Transfektionsansatz, bestehend aus 12  $\mu\text{l}$  Metafectene<sup>®</sup> und 1,2  $\mu\text{M}$  Control siRNA (AllStars Negative Control, Qiagen) bzw. 1,2  $\mu\text{M}$  LASP1 siRNA (5`-AAG CAT GCT TCC ATT GCG AGA -3` (bases 80-100)), für 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen pelletiert, in 1 ml RPMI1640 resuspendiert und mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen 3 d bei  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.1.7. Stabiler Knockdown**

Um einen stabilen LASP1 Knockdown zu produzieren, wurden die in der Arbeitsgruppe generierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen für 96 h mit Doxycyclin (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde an Tag 2 das Medium ausgetauscht und Doxycyclin erneut hinzugegeben.

Doxycyclin aktiviert das transregulatorische Protein rtTA. Dieses bindet wiederum an TRE-Promotoren des Plasmids. Die daraufhin exprimierte LASP1-spezifischen shRNA (Sequenz 5`- CTTACGAAGGAGACATAA -3`) bindet an die homologe mRNA und unterbindet somit die Translation von LASP1 (N. Matsushita, S. Matsushita et al. 2013).

### **2.2.1.8. Stimulation der Zellen mit Forskolin und TPA**

Forskolin ist ein direkter Stimulator der Adenylylcyclase. Durch Katalyse der Abspaltung von Pyrophosphat (PP) aus Adenosintriphosphat (ATP), erhöht diese den intrazellulären cAMP Spiegel. Als Signalstoff aktiviert dieser wiederum die Proteinkinase A (PKA), welche die Phosphorylierung von LASP1 an Serin 146 bedingt. Dies bewirkt eine Abschwächung der Bindungsaffinität von LASP1 zu den membranständigen Proteinen, F-Aktin und Zyxin. Im Komplex mit ZO-2 wird LASP1 anschließend in den Zellkern transportiert. Dies hat eine Anreicherung von LASP1 im Nukleus zur Folge (S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013). Um diese nukleäre Überexpression zu erzielen, wurde das Basismedium der MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen bei einer Konfluenz von 70 %, durch FBS-freies RPMI1640 Medium ersetzt. Nach 16 h, wurde das Medium mit 10 µM Forskolin versetzt. Es folgte eine weitere Inkubationsphase von 30 min. Anschließend wurden die Zellen für weiterführende Experimente geerntet.

Bei 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) handelt es sich um einen spezifischen, direkten Aktivator der Proteinkinase C (PKC). Diese stimuliert den MAP-Kinase- sowie den NF-κB-Signalweg und verstärkt die DNA-Bindungsaffinität des AP-1-Transkriptionsfaktors. Dies hat u.a. eine Zunahme der Genexpression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) zur Folge (Y. R. Lee, E. M. Noh et al. 2013). Um die relative mRNA-Expression von MMP1, MMP3 und MMP9 zu amplifizieren, wurde bei MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 80 %, das Medium abgesaugt und durch frisches, mit 100 nM TPA versetztes Medium, ersetzt. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet.

## **2.2.2. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinbestimmung erfolgte unter Verwendung des Pierce™ BCA Protein Assay Kits. Diese Methode basiert auf einer Proteinkonzentration-abhängigen Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup>. Cu<sup>+</sup> bildet wiederum mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Farbkomplex, der bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden kann (J. M. Walker 1994).

In einem ersten Schritt wurden 500 µl des konditionierten Mediums in ein 1,5 ml Mikrogefäß überführt, die kultivierten Zellen pelletiert und in hypotonen Puffer (100µl /6-Well) lysiert. Beide Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

Anschließend wurden je 10 µl destilliertes Wasser, sowie unterschiedliche BSA-Konzentration (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,0 mg/ml) und die zu messenden Proteinproben, in einer 1:1 Verdünnung, in die einzelnen Wells pipettiert. Jede Lösung wurde als Triplet aufgetragen.

Ferner wurden 15 ml Pierce Lösung A mit 300 µl Pierce Lösung B vermischt, sodass je 200 µl des Ansatzes in jedes Well pipettiert werden konnte. Nach Inkubation für 1 h bei RT, erfolgte die Auswertung am ELISA-Reader bei 595 nm.

#### **2.2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit Hilfe einer SDS-PAGE können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Dafür wurden die zu analysierenden Proben nach dem Waschen mit PBS, in entsprechender Menge SDS-Stopp Puffer (100 µl/ 6-Well) lysiert, 4 min bei 95 °C gekocht und für 10 s bei 12000 x g zentrifugiert. Anschließend konnten die Lysate bei -20 °C weggefroren werden bzw. direkt auf das Gel geladen werden.

Hierbei wurde ein Polyacrylamid-Gel (1X), bestehend aus einem 10 % Trenngel und einem darüber liegendem Sammelgel, in die zuvor präparierte Gelapparatur eingegossen. Das Trenngel sollte dabei bis 1,5 cm unter dem Rand der Gelapparatur reichen. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Gel in eine mit Elektrophoresepuffer (1X) gefüllte Elektrophoresekammer gespannt und die Proben zu gleichen Mengen ( $1 \times 10^4$  Zellen/Tasche) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer anfänglichen Spannung von 70 V. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Spannung für 1h auf 120 V erhöht.

#### **2.2.2.3. Western Blot**

Die Übertragung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran (NC) erfolgte via Immunblot. Dafür wurde das Gel als zentraler

Bestandteil des sog. „Transfer Sandwichs“, der sich aus Schaumstoff, Blotting Paper, der Nitrocellulose und dem Gel zusammensetzt, in eine mit Transferpuffer (1X) gefüllte Kammer gegeben und für 1h bei 4 °C einer Stromstärke von 1,71 A ausgesetzt. Nach dem Blot wurde die Membran 2 min mit Ponceau S gefärbt. Durch anschließendes Waschen mit destilliertem Wasser, sollten die zuvor gefärbten Banden sichtbar werden. Dies ermöglichte die Beurteilung der Transfereffizienz. Nachdem die NC mit 1 % TBS-T entfärbt wurde, erfolgte zum Sättigen unspezifischer Bindungen, das Blocken der NC mit 5 ml 3 % TBS-T Milch für 1h bei RT und 20 rpm auf einem Plattformschüttler. Die NC wurde über Nacht bei 4 °C und 75 rpm auf dem Schüttler (KS 10, Edmund Bühler GmbH) mit dem Primärantikörper inkubiert. Der Applikation eines mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörpers für 1 h bei RT und 20 rpm auf dem Schüttler, ging das Waschen der Membran mit 5 ml 1 % TBS-T für die Dauer von 30 min voraus. 1 % TBS-T wurde dabei 3-mal gewechselt. Dieser Waschgang wurde nach Inkubation des Sekundärantikörpers wiederholt. Abschließend wurde die Membran mit ECL home-made (3 ml/ 10x10 cm) bedeckt. Durch Exposition eines Röntgenfilmes für 1 s – 1 min konnten die spezifischen Proteinbanden dargestellt werden. Die Filme wurden unter Verwendung der ImageJ Software analysiert.

#### **2.2.2.4. Zymographie**

Die Zymographie ist ein semi-quantitatives, SDS-PAGE zugrundeliegendes Verfahren zur Detektion enzymatischer Aktivität von MMPs (X. Hu and C. Beeton 2010).

In einem ersten Schritt wurde das Basismedium der in T75 kultivierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen bei einer Konfluenz von > 80 % abgesaugt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, wurde die Zellkultur für weitere 24 h in serumfreiem RPMI1640 Medium (5ml/ T75) im Brutschrank inkubiert.

Zur späteren Analyse des Überstandes, wurden 500 µl des konditionierten Mediums im Concentrator plus um den Faktor 5 aufkonzentriert (vgl. 2.2.1.3). Das Konzentrat wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

Währenddessen wurden die Zellen pelletiert und in 100 µl mit 1:1000 Pefabloc, Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin, frisch angereichertem RIPA-Puffer (100µl/ 2x10<sup>6</sup>

Zellen) versetzt. Der Ansatz wurde mit zwischenzeitlichem Vortexen für 30 s auf Eis inkubiert und durch Spritzenaufschluss (291/2 gauche Insulinspritze) homogenisiert. Das Lysat wurde wiederum 15 s bei 4 °C und 13000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei -20 °C zunächst weggefroren.

Die 10 % Gelatin bzw. 12 % Casein Protein Gele wurden in eine mit SDS Running Buffer (1X) gefüllte Gelkammer eingespannt. Vor dem Laden der Gele (30 µl/ Tasche), wurden die Proben 1:1 mit SDS Sample Buffer (2X) vermischt. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und 125 V über einen Zeitraum von 1,5 h. Nachdem die Lauffront das Ende der Gele erreichte, wurden diese aus der Kammer gelöst, 2-mal für 30 min bei RT in 100 ml Renaturing Buffer (1X) und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in 100 ml Developing Buffer (1X) inkubiert. Vor dem Färben der Gele für 2 h bei RT mit 100 ml Coomassie, wurden diese wiederum 5 min mit eiskaltem, destilliertem Wasser gewaschen. Zuletzt wurden die Gele in 100 ml Coomassie-Entfärbelösung gegeben. Die Entfärbung wurde bis zur Darstellung klarer Banden fortgeführt. Die Lagerung der Gele erfolgte in 100 ml 20 % NaCl-Lösung.

### **2.2.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1. Primer Design**

Die Primer wurden, nach einführender Instruktion durch Dr. Daniel Jahn aus der Hepatologie des Universitätsklinikums Würzburg, eigenständig designt. Zu Beginn wurden in der Online-Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) Transkripte der zu quantifizierenden Gene gesucht. Diese sollten proteinkodierend, sowie Intron-überspannend sein und eine möglichst große Basenpaarlänge (≥ 1000 bp) aufweisen.

Zum Entwurf der Primer, wurden die gewählten mRNA-Sequenzen in das Universal ProbeLibrary Assay Design Centers (<http://qpcr.probefinder.com/organism.jsp>) kopiert. Beim Design wurde darauf geachtet, dass die Primer 20-25 nt lang sind, einen GC-Gehalt von 40-60 % haben und ein ≈ 100 nt Amplicon Intron-überspannend kodieren (L. Y. Chuang, Y. H. Cheng et al. 2013). Ferner wurde, unter Verwendung der Primer

Express® Software, die Schmelztemperatur auf 58-60 °C eingestellt. Durch das Programm konnten die Primerpaare zusätzlich auf gegenseitige Hybridisierung getestet werden. Zum Ausschluss unspezifischer Amplifikate wurde des Primer-BLAST Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) verwendet. Die designten Primer wurden sodann als entsalzte, lyophilisierte Syntheseprodukte über die Firma Microsynth AG bezogen. Diese wurden mit einem entsprechenden Volumen RNase-freiem dH<sub>2</sub>O versetzt, um eine Ausgangskonzentration von 100 µM zu erhalten. Die gelösten Primer wurden schließlich bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.3.2. RNA-Isolation**

Die in 6-Well-Platten kultivierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 % in insgesamt 400 µl RNA Lysis Buffer T (200 µl/ 6-Well) lysiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgende RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kits gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Zur Homogenisierung wurde das Lysat auf eine DNA Removing Column pipettiert und bei 12000 x g 1 min zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde anschließend 1:1 mit 70 % Ethanol versetzt und durch Vortexen gemischt. Ferner wurde die Probe auf die PerfectBind RNA Column pipettiert und 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die mit RNA beladene Silikatmembran wurde daraufhin mit 500 µl RNA Wash Buffer I und 600 µl RNA Wash Buffer II bei 10000 x g für 15 s gewaschen. Der letzte Waschriff wurde wiederholt. Zum Trocknen der Membran erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 10000 x g. Abschließend wurden 50 µl RNase-freies dH<sub>2</sub>O direkt auf die Matrix pipettiert und die PerfectBind RNA Column in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 min bei 5000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Eluat wurde bei -80 °C weggefroren.

#### **2.2.3.3. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration/-Reinheit**

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe eines UV/VIS-Spectrophotometers. Hierbei wurden 10 µl RNA-Lösung mit 190 µl TE-Puffer versetzt. Durch Absorptionsmessung des verdünnten Aliquots bei einer Wellenlänge von 260 nm, konnte die RNA-Konzentration bestimmt werden. Da eine



Absorptionseinheit  $A_{260}$ -Einheit 40  $\mu\text{g}$  RNA/ml entspricht, berechnet sich die Konzentration wie folgt:

$$\text{conc.}_{\text{RNA}} (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die zusätzliche Messung des Extinktionskoeffizienten bei 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der Probe. Reine RNA besitzt ein  $A_{260/280}$ -Verhältnis von 2,0. Somit sollte das  $A_{260/280}$ -Verhältnis der isolierten RNA  $\geq 2,0$  sein, um eine Proteinkontamination ausschließen zu können (J. A. Glasel 1995).

#### 2.2.3.4. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Beurteilung der Qualität der isolierten RNA wurde eine RNA-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde zuerst ein 1 % Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurden 0,3 g Agarose mit 30 ml TAE-Puffer (1X) in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgekocht, sodass eine klare, schlierenfreie Lösung entstand. Nach Abkühlen auf circa 60 °C, wurden 1,2  $\mu\text{l}$  GelRed™ zugegeben und in die Elektrophoresekammer zum Aushärten gegossen. Von den zu untersuchenden Proben wurden anschließend 5  $\mu\text{l}$  RNA 1:1 mit LB®-Puffer (2X) verdünnt und in die Taschen transferiert. Das Gel lief 30 min bei einer Spannung von 70 V. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (1X) verwendet. Zum Auswerten des Gels, wurde es auf einem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet. Bei intakter, weder denaturierter, noch mit DNA verunreinigter RNA, sollten die 28S und 18S rRNA als zwei scharfe Banden deutlich zu erkennen sein (P. S. Aranda, D. M. LaJoie et al. 2012).

#### 2.2.3.5. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription, die Übersetzung einer RNA in die komplementäre cDNA, wurde durch Gebrauch des High-Capacity Reverse Transkription Kits der Firma Thermo Fisher Scientific realisiert. Die cDNA-Synthese erfolgte dabei gemäß Herstellerangaben. Insgesamt wurden 0,5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA umgesetzt. Hierzu wurde zu Beginn in Abhängigkeit der RNA-Konzentration ein dementsprechendes Volumen der isolierten RNA mit RNase-freiem  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 10,5  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde anschließend durch Zugabe des 2X RT Master Mix (vgl. Tab. 2.3) komplementiert und in

einem Thermocycler (peqSTAR 96X, Peqlab Biotechnologie) unter Ausführung des RT-Programmes (vgl. Tab. 2.4) in cDNA umgewandelt. Nach Ablauf des Programmes und Abkühlen des Thermocyclers auf circa 40 °C wurden je 10 µl gewonnene cDNA 1:3 mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.3. Ansatz des 2X RT Master Mix

Reagenzien	Volumen (µl)/ Reaktion
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primers	2,0
Multiscribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
RNase-freies dH <sub>2</sub> O	3,2

Tabelle 2.4. Programm der Reversen Transkription

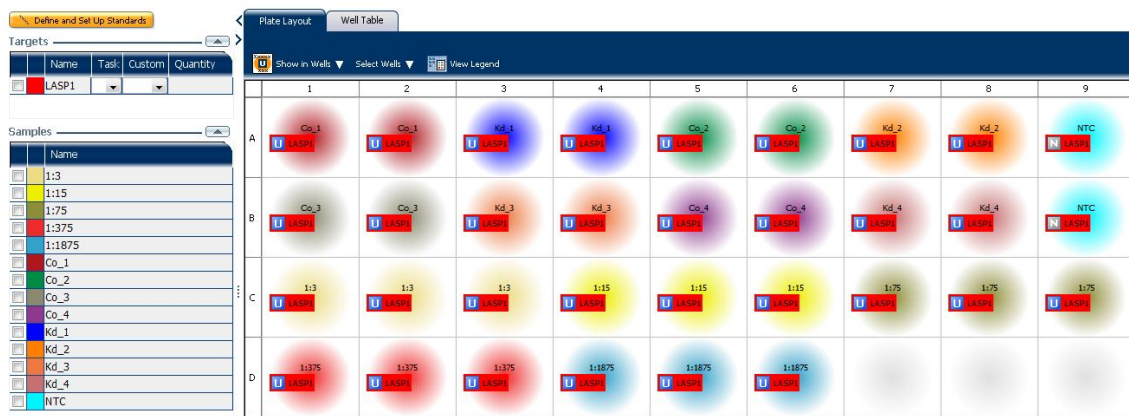
	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

### 2.2.3.6. Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR)

Die Real-Time PCR erfolgte am ViiA™ 7 (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des SYBR® Select Master Mix gemäß Protokoll des Herstellers.

Zu Beginn wurde der frisch angesetzte Master Mix (vgl. Tab. 2.5) auf die 384-Well-Platte pipettiert (9µl/ 384-Well). Die aliquotierten cDNA Proben wurden auf Eis aufgetaut und à 1 µl/ 384-Well dem Master Mix zugegeben. Die Proben wurden dabei zweifach aufgetragen. Um eine spezifische Standardkurve der zu untersuchenden Genen zu erhalten, wurde ferner eine 1:5-Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden 10 µl cDNA 1:3, 1:15, 1:75, 1:375 und 1:1875 mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurde je 1 µl der jeweiligen Verdünnung zu den 9 µl Master Mix pro 384-Well beigefügt. Jede Verdünnung wurde als Triplett aufgetragen. Zusätzlich wurden zwei Wells mit 1 µl RNase-

freiem dH<sub>2</sub>O und 9 µl Mastermix befüllt. Diese wurden als NTCs (non-template control) benutzt. Ein Versuchsansatz, zur Genexpression eines bestimmten Gens, bestand somit aus einer Verdünnungsreihe, zwei NTCs und den cDNA Proben (vgl. Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1. Pipettierungsschema einer RT-PCR zur Genexpressionsanalyse von LASP1**

Nachdem die Ansätze präpariert waren, wurde die 384-Well-Platte unter Applikation des MicroAmp® Optical Adhesive Films (Life Technologies) luftdicht verschlossen, 10 s bei 900 x g zentrifugiert und in den vorprogrammierten PCR Thermocycler (vgl. Tab. 2.6) gestellt. Das Programm lief insgesamt 1,5 h. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ViiA™ 7 Software. Zur Analyse der relativen Genexpression wurde die  $\Delta\Delta CT$ -Methode verwendet (K. J. Livak and T. D. Schmittgen 2001). Die aus der Verdünnungsreihe generierte Standardkurve erlaubte die Errechnung der Primereffizienz, sowie der absoluten Genexpression. Darüber hinaus konnten die Ergebnisse der  $\Delta\Delta CT$ -Methode verifiziert werden (A. Larionov, A. Krause et al. 2005).

Tabelle 2.5. Ansatz des RT-PCR Master Mix

Reagenzien	Volumen (µl)/ Reaktion
RNase-freies dH <sub>2</sub> O	3,0
SYBR® Select Master Mix	5,0
Forward Primer (5 µM)	0,5
Reverse Primer (5 µM)	0,5

Tabelle 2.6. Programm der RT-PCR

Schritt	Temperatur **	Dauer	Cycles
Hold Stage → UDG-Aktivierung	50 °C	2 min	Hold
PCR Stage → AmpliTaq® Polymerase-/ UP-Aktivierung	95 °C *	2 min	Hold
→ Denaturierung	95 °C *	1 s	40
→ Annealing/ Extending	60 °C *	30 s	40
Melt Curve Stage → Primerspezifität	95 °C *	15 s	Hold
	60 °C *	60 s	Hold
	95 °C *	15s	Hold

Wichtig: Zwischen den Schritten \* betrug  $\Delta T$ : +/- 1,60 °C/ s  
 Zwischen den Schritten \* betrug  $\Delta T$ : +/- 0,05 °C/ s

### 2.2.3.7. DNA-Mikroarray & „Functional Enrichment Analysis“

Der DNA-Mikroarray ist eine biochemische, bioinformatische Technik, die ähnlich wie die Real-Time PCR zur Untersuchung der Genexpression verwendet wird (R. N. Nazar, P. Chen et al. 2010). Hierbei werden die zu untersuchenden Proben, nachdem sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, auf die einzelnen Testfelder der Mikroarrays, i.d.R. Siliziumchips, aufgebracht. Da die Testfelder wiederum mit diversen, fluoreszenzmarkierten DNA Einzelsträngen beschichtet sind, entsteht im Falle einer Komplementarität beider Nukleotidsequenzen eine Mischfarbe, die durch eine Laserkamera detektiert, analysiert und ausgewertet wird (T. G. Grunewald, S. M. Pasedag et al. 2009).

Die resultierenden Daten können anschließend mit Hilfe einer „Functional Enrichment Analyse“ durch die Software „FunRich“ bzgl. signifikanter Abnahmen bzw. Zunahmen einzelner Gene, Proteine, sowie „Response Elements“ der jeweiligen Promotoren auf der DNA untersucht werden (M. Pathan, S. Keerthikumar et al. 2015).

#### **2.2.4. Etablierung eines Matrix-Degradations-Assays**

Der Matrix-Degradations-Assay ermöglicht die Visualisierung der Invadopodienaktivität humaner Brustkrebszellen (MDA-MB-231) *in vitro* (V. V. Artym, K. M. Yamada et al. 2009).

Hierfür bedarf es primär der Präparation einer Gelatinelösung, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff NHS-Rhodamin zu markieren ist. Dazu wurden 0,18 g Natriumchlorid und 100 mg Gelatine in einem Becherglas mit 50 ml Natriumborat-Puffer gegeben. Zur Lösung der Gelatine wurde der Ansatz in der Mikrowelle erhitzt, bis sich eine klare Lösung ergab. Die erkaltete Lösung wurde anschließend mit 1,8 mg NHS-Rhodamin versetzt und für 2 h abgedunkelt bei RT magnetisch gerührt. Das Gemisch wurde nachfolgend unter Verwendung der Slide-A-Lyzer™ Dialyse-Kassette unter langsamen Rühren bei 4 °C in 1 l PBS über einen Zeitraum von 24 h dialysiert. Zur Equilibration wurde diese vor Gebrauch für 1 min in PBS getaucht. Mit Hilfe einer Einmalspritze wurde die Kassette nachfolgend mit 3 ml NHS-Rhodamin-Gelatine befüllt. Der PBS-Dialysepuffer wurde hierbei in den ersten 4 h nach je 2 h erneuert. Abschließend wurde die NHS-Rhodamin-Gelatine in 0,5 ml-Aliquots abgefüllt und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Zum Beschichten der 15 mm-Coverslips mit NHS-Rhodamin-Gelatine, wurden diese in einem ersten Schritt in eine 12-Well-Platte (1 Coverslip/ Well) platziert und für 15 min auf Eis mit je 1 ml 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung inkubiert. Alle darauffolgenden Schritte wurden zum Schutz des Fluoreszenzfarbstoffes NHS-Rhodamin mit einer Alufolie abgedunkelt durchgeführt. Nach Absaugen der Lösung wurden je Coverslip 150 µl Sucrose-Gelatine-Mischung, bestehend aus 147 µl NHS-Rhodamin-Gelatine und 3 µl erwärmter Sucroselösung, pipettiert. Die 12-Well-Platte wurde 15 min bei RT inkubiert. Die Coverslips wurden danach 3-mal mit je 1 ml PBS gewaschen, in 1 ml 70 % Ethanol für 15 min bei RT und in 1 ml FBS-freiem RPMI1640 Medium für weitere 15 min bei 38 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Der letzte Schritt wurde mit serumhaltigem Medium zweimal wiederholt.

Bevor die Zellen mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät wurden, wurden die beschichteten Coverslips in neue mit je 1 ml RPMI1640 Medium befüllte 12-Wells transferiert.

Nach Inkubation von 20 h - 24 h bei 38 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank, wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, mit 0,8 ml 4 % PFA/ PBS fixiert (10 min auf Eis), 5-mal wiederum mit je 1 ml PBS gewaschen, mit 1 ml NH<sub>4</sub>Cl überschichtet (10 min bei RT) und vor dem Blocken mit 0,8 ml 5 % Goat-Serum/ PBS (30 min bei RT) mit 1 ml 0,1 % Triton™ X-100/ PBS permeabilisiert (10 min bei RT).

Zum Einfärben der Aktinstrukturen wurden die Deckgläschen mit 300 µl in Goat-Serum verdünntem Oregon Green® 488 Phalloidin (1:20) für 1h bei RT bedeckt (J. Small, K. Rottner et al. 1999). Die Coverslips wurden anschließend 3-mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Um die Zellkerne mikroskopisch darzustellen, wurde im letzten Waschschrift DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; 1:1000) in PBS direkt pipettiert und 1 min bei RT inkubiert (B. Chazotte 2011). Zum Schluss wurden die Coverslips in destilliertes Wasser getaucht und mit 10 µl Mowiol auf dem Objektträger fixiert. Die präparierten Deckgläschen wurden lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Die omnifokale Mikroskopie erfolgte an einem Zeiss BZ 9000 Fluoreszenzmikroskop der Hepatologie des Universitätsklinikums Würzburg. Die Bilder wurden mit der Software BZ-II Viewer analysiert.

### **2.2.5. Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung von Microsoft Excel. Die in der vorliegenden Arbeit abgebildeten Grafiken wurden unter Berechnung der Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens 4 unabhängigen Werten jeweils erstellt. Die mathematische Signifikanz wurde mittels „Unpaired Student's t-Test“ bestimmt. Bei p-Werten < 0,05 wurde das Resultat als statistisch signifikant bezeichnet und mit einem Stern (\*) in der dementsprechenden Grafik gekennzeichnet. Ergebnisse mit p-Werten < 0,01 sind hoch signifikant und mit zwei Sternen (\*\*) markiert, während p-Werte < 0,001 (\*\*\*) einer Überschreitungswahrscheinlichkeit, die als höchst signifikant definiert ist, entsprechen.

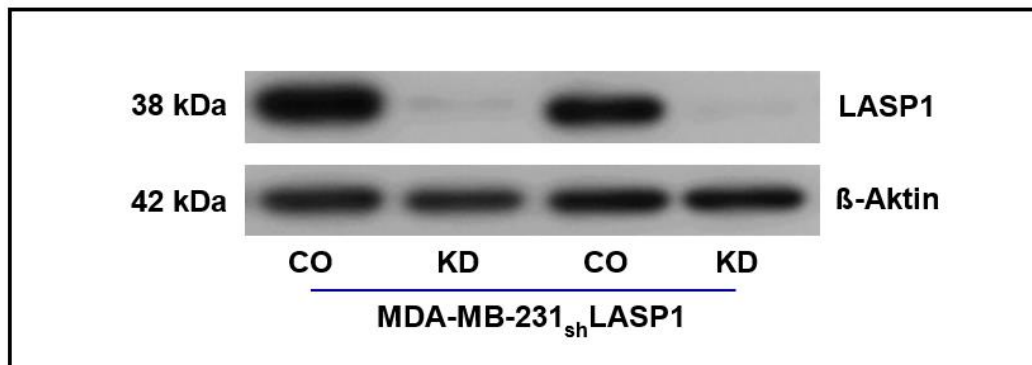
### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. EINFLUSS VON LASP1 AUF DIE MATRIXDEGRADATION IN INVADOPODIEN HUMANER BRUSTKREBSZELLEN (MDA-MB-231)**

Bereits bekannt ist, dass der Knockdown von LASP1 in humanen Makrophagen die Matrixdegradation und somit das gesamt-invasive Potential der Zellen mindert, während die Bildung der Podosomen selbst nicht beeinflusst wird (M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012). LASP1 ist allerdings nicht nur in Makrophagen vorzufinden, sondern wird in vielen Tumorentitäten überexprimiert - unter anderem auch in Brustkrebszellen und Zelllinien (BT20, MCF-7, MDA-MB-231) (I. Bieche, C. Tomasetto et al. 1996). Neben einer nukleären sowie perinukleären Lokalisation, ist LASP1 dort an Fokalkontakten lokalisiert (T. G. Grunewald, U. Kammerer et al. 2007). In diesen Bereichen befinden sich wiederum Podosomen-ähnliche Gebilde, sogenannte Invadopodien (D. A. Murphy and S. A. Courtneidge 2011). Dies legt die Vermutung nahe, dass LASP1, neben der Regulation der Matrixdegradation in Podosomen, zusätzlich die Invadopodienaktivität humaner Brustkrebszellen beeinflusst. Für weitere Untersuchungen wurden daher die stabil mit shLASP1 transfizierte und invasive Brustkrebszelllinie MDA-MB-231<sub>shLASP1</sub> eingesetzt (R. Perera 2010)

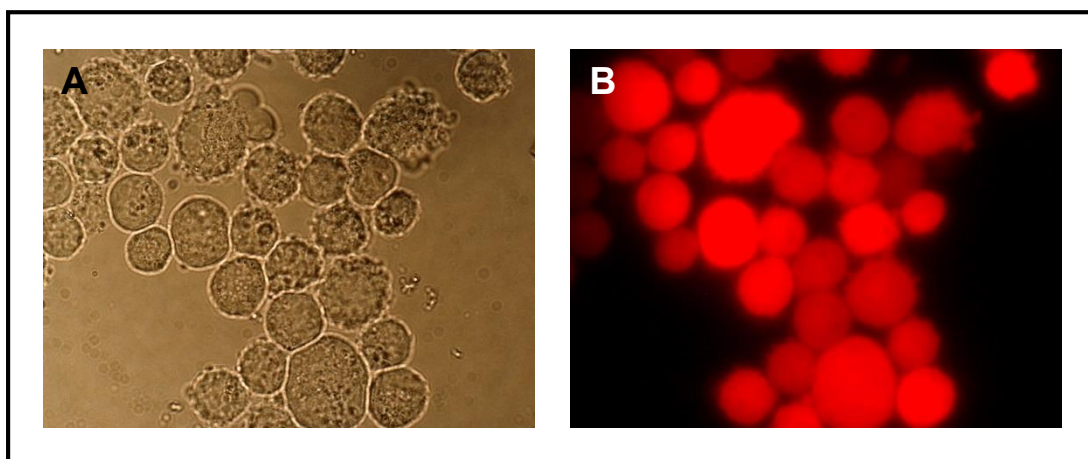
##### **3.1.1. Stabiler LASP1 Knockdown in MDA-MB-231 Zellen**

Für die Knockdown Vorversuche wurden die in der Arbeitsgruppe generierten MDA-MB-231<sub>shLASP1</sub> Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 70–80 % in verschiedenen Zelldichten ( $5 \times 10^4$  Zellen/ml,  $8 \times 10^4$  Zellen/ml und  $2 \times 10^5$  Zellen/ml) ausgesät und mit unterschiedlichen Doxycyclinkonzentrationen (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml) für 72 h, 96 h bzw. 120 h behandelt. Ein Vergleich zwischen Kontrollzellen (CO) und Knockdownzellen (KD) im Western Blot zeigte, dass LASP1  $\geq 90$  % herunterreguliert wurde, sofern die Zellen bei einer Anfangskonzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml für 96 h in 0,5 µg/ml Doxycyclin-haltigem Medium inkubiert wurden (vgl. Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1. Western Blot stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen.** Nach 96 h Inkubation in 0,5 µg/ml Doxycyclin-haltigem Medium wurde LASP1 ≥ 90 % herunterreguliert. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Durch die Gabe von Doxycyclin wird zusätzlich zur LASP1 shRNA, das im Vektor eingebaute rot fluoreszierende Protein TurboRFP aktiviert. Dies ermöglicht, neben der Kontrolle der Induktion der LASP1 shRNA, die Evaluation der Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop (B. J. Naughton, D. D. Han et al. 2011). Dazu wurden 10 µl des Resuspensats der vorbehandelten Zellen zur mikroskopischen Auswertung auf Coverslips pipettiert. Alle Zellen fluoreszierten rot (vgl. Abb. 3.2). Die Transfektionseffizienz lag somit bei nahezu 100 %. Konsekutiv wurde LASP1 shRNA in allen Zellen exprimiert.



**Abbildung 3.2. Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie.** Die Gegenüberstellung der Brightfield-Aufnahme (A) stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen nach Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxycyclin mit der korrespondierenden Immunfluoreszenz-Aufnahme (B) bei 40-facher Vergrößerung zeigt, dass sämtliche Zellen via TurboRFP Induktion rot fluoreszieren und somit shLASP1 exprimieren.



### **3.1.2. Degradationsverhalten von Invadopodien humaner Brustkrebszellen mit bzw. ohne stabilem LASP1 Knockdown**

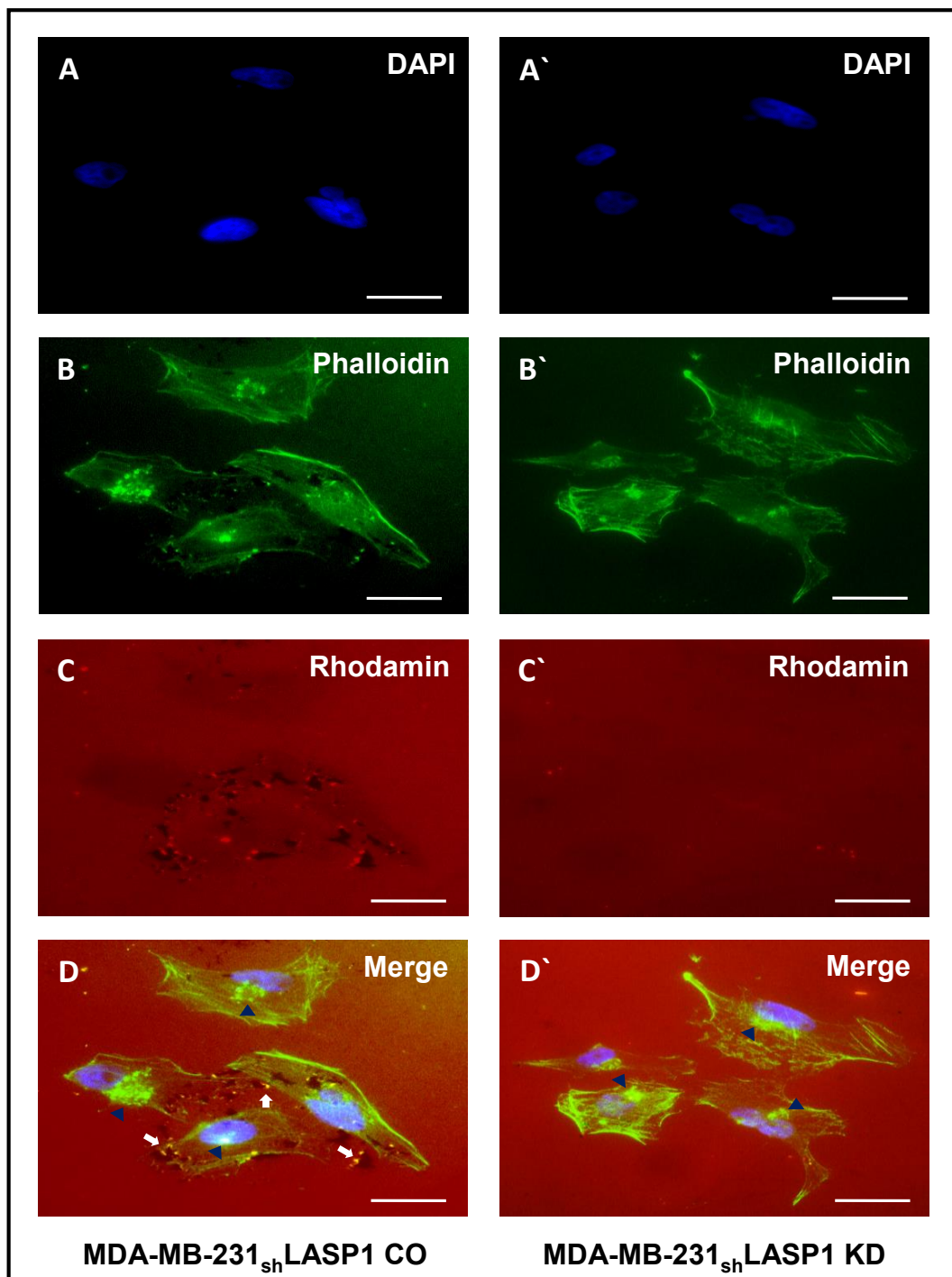
Nachdem die Bedingungen zum Erhalt eines stabilen LASP1 Knockdowns ( $\geq 90\%$ ) optimiert wurden, konnte mit Hilfe des Matrix-Degradations-Assays das invasive Potential von Invadopodien stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen mit und ohne Doxycyclin Induktion verglichen werden.

Die Zellen wurde dabei 96 h in 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert, bevor diese zur Visualisierung der Invadopodienaktivität auf NHS-Rhodamin-Gelatine ausgesät, 20 h später fixiert und mit DAPI sowie Phalloidin eingefärbt wurden. In gleicher Weise wurde mit den Kontrollzellen verfahren. Die resultierenden Coverslips wurden unter Verwendung des Keyence BZ 9000 bei 60-facher Vergrößerung verglichen.

In Abbildung 3.3 sind stabil transfizierte MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 vor und nach Doxycyclin-Behandlung gegenübergestellt. Die Zellkerne erscheinen durch eine DAPI Färbung blau, während das Aktinskelett grün gefärbt wurde (vgl. Abb. 3.3 A-B). Der Abbau der Gelatine durch Invadopodien-assoziierte Proteasen (v.a. MMPs) führt zu Fluoreszenz-negativen Stellen, die als schwarze Fraßlöcher in der NHS-Rhodamine-Gelatine zu sehen sind. Ein Vergleich der Gelatine der Kontrollzellen (CO) und Knockdownzellen (KD) zeigt, dass nach Herunterregulation von LASP1 die Anzahl an Fraßlöcher, sowie deren Durchmesser deutlich vermindert ist (vgl. Abb. 3.3 C+C'). Dies deutet auf eine Abnahme der Invadopodienaktivität in Folge des LASP1 Knockdowns hin.

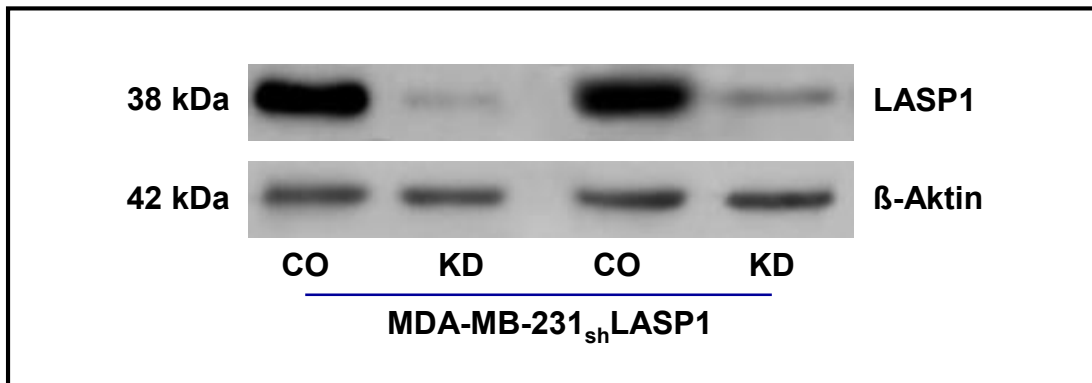
Durch das Einfärben der Aktinstrukturen mit Phalloidin werden nicht nur zelluläre Umriss dargestellt, sondern zugleich Konzentrationspunkte invadopodialer Strukturen (blaue Pfeilspitze) sichtbar. Die orange-gelben Punkte (weiße Pfeile) stellen hingegen aktiv degradierende Invadopodien dar (vgl. Abb. 3.3 D+D').

Die Gegenüberstellung der Überlagerungsaufnahmen vor bzw. nach Doxycyclin-Gabe gibt Aufschluss bzgl. eines regulierenden Effektes von LASP1 auf das invasive Potential humaner Brustkrebszellen. Der Knockdown von LASP1 inhibiert die Bildung der Invadopodien nicht, reduziert allerdings deren Matrixdegradationskapazität signifikant (vgl. Abb. 3.3 D+D').



**Abbildung 3.3. Die Matrixdegradation in Invadopodien humaner Brustkrebszellen wird durch einen LASP1 Knockdown beeinträchtigt.** Detektion der Invadopodienaktivität stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen mittels omnifokaler Fluoreszenzmikroskopie. Kontrollzellen (CO) und Knockdownzellen (KD) wurden auf NHS-Rhodamin-Gelatine ausgesät und nach 20 h fixiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau, das Zytoskelett mit Phalloidin grün gefärbt. Die Matrixdegradation ist als schwarze Fressstelle im Gelatinefilm sichtbar. Während in der Überlagerung die grünen, zirkulären Ansammlungen inaktive Invadopodien repräsentieren (blaue Pfeispitze), stellen die orange-gelben Punkte (angedeutet durch weiße Pfeile) aktiv degradierende Invadopodien zum Zeitpunkt der Fixation dar. Größenbalken: 20  $\mu$ m.

Zuletzt wurde der LASP1 Knockdown im Western Blot verifiziert. Unter Verwendung von  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle ist erkennbar, dass LASP1 um  $\approx 90\%$  nach 96 h Inkubation mit  $0,5\ \mu\text{g/ml}$  Doxycyclin herunterreguliert wurde (vgl. Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4.** Western Blot stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen ohne (CO) bzw. mit  $0,5\ \mu\text{g/ml}$  Doxycyclin (KD) im Medium. LASP1 ist nach 96 h Inkubation mit Doxycyclin deutlich herunterreguliert.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

---

### 3.2. REGULATION DER GENEXPRESSION DER MATRIX-METALLOPROTEASEN DURCH LASP1

Wie den vorigen Ergebnissen zu entnehmen ist, beeinflusst LASP1 nicht nur die Matrixdegradation in Podosomen, sondern auch die Invadopodienaktivität humaner Brustkrebszellen. Nachfolgend wurde daher der zugrundeliegende Mechanismus näher untersucht.

Hierbei ist zu berücksichtigen, dass der zur Zellmigration notwendige Abbau der Extrazellulärmatrix vorwiegend durch Matrix-Metalloproteasen geschieht (C. Gialeli, A. D. Theocharis et al. 2011).

Jüngste Untersuchungen von Duvall-Noelle in Brustkrebszellen beschreiben einen transkriptionellen Effekt von LASP1 auf diverse Gene der Zelladhäsion (N. Duvall-Noelle, A. Karwandyar et al. 2015). In den hinterlegten Mikroarraydaten findet man allerdings auch die Regulation von MMP1 und MMP9.

Mikroarraydaten nach LASP1 Knockdown in den MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen, die am Institut durch Prof. Dr. Elke Butt erhoben und mir zur Verfügung gestellt wurden, zeigten zudem erniedrigte Werte für die Matrix-Metalloproteasen MMP1 und MMP3 (vgl. Anhang der Mikroarraydaten; S. 101).

Zum Nachweis einer evtl. Regulation der Genexpression durch LASP1, welche das invasive Potential humaner MDA-MB-231 Zellen nachhaltig beeinflusst, wurden die obig- genannten Mikroarraydaten, zusammen mit weiteren Genen, die an der Matrixdegradation beteiligt sind, mittels Real-Time PCR (RT-PCR) untersucht bzw. verifiziert.

Neben MMP1, MMP3 und MMP9, wurde die Genexpression von MMP2, als sekundäre Gelatinase, getestet (J. F. Woessner, Jr. 2002). Zusätzlich wurde die membranständige MMP14 überprüft (H. Sato, T. Takino et al. 1994). Somit wurde aus jeder der insgesamt 4 Gruppen der Matrix-Metalloproteasen ein Vertreter ausgewählt und bzgl. einer transkriptionellen Regulation durch LASP1 untersucht (M. Polette, B. Nawrocki-Raby et al. 2004).

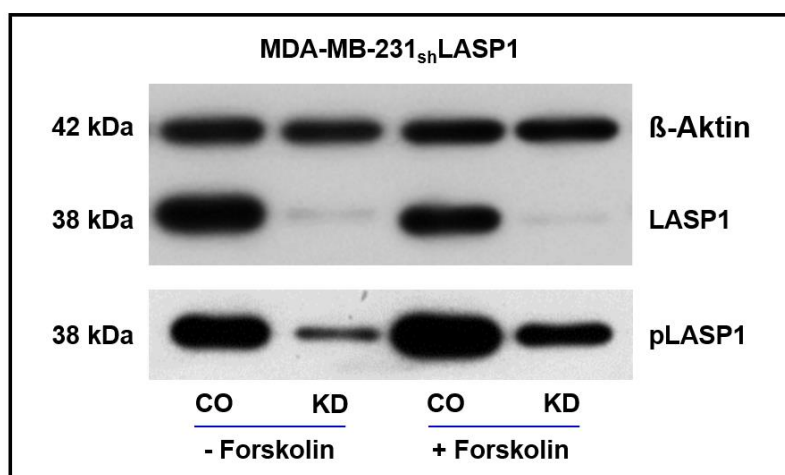
Das Protein TFB1M (Transcription Factor B1, mitochondrial) wurde als zusätzliche interne Kontrollle mit in die qRT-PCR Analyse aufgenommen, da die mRNA ebenfalls stark durch LASP1 herunterreguliert wurde (vgl. Anhang der Mikroarraydaten; S. 101).

### 3.2.1. Stimulation stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Kontroll- und Knockdownzellen mit Forskolin

Zur Verifizierung der in den Mikroarrays beobachteten Regulation einzelner Matrix-Metalloproteasen sollten qRT-PCRs durchgeführt werden.

Dazu wurde in einem ersten Schritt LASP1 unter Applikation von Doxycyclin in stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen herunterreguliert. Ferner wurden Kontroll- und Knockdownzellen unmittelbar vor der Lyse für 30 min mit je 10 µM Forskolin stimuliert, um eine phosphorylierungs-abhängige Anreicherung von LASP1 im Nukleus zu erzielen (S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013).

Der Knockdown, sowie die Phosphorylierung von LASP1 wurden anschließend im Immunblot evaluiert. Neben einer Reduktion der LASP1 Proteinexpression um durchschnittlich 80 – 90 %, konnte auch ein erhöhter Anteil an phospho-LASP1 (pLASP1) nach Stimulation mit Forskolin, sowohl in den Kontrollzellen (CO) als auch in den Knockdownzellen (KD) konstatiert werden (vgl. Abb. 3.5).



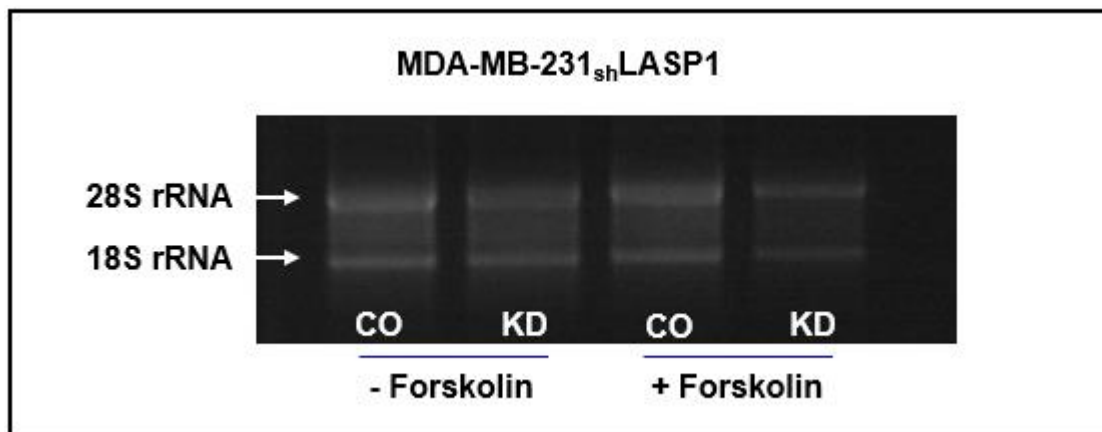
**Abbildung 3.5. Anstieg an pLASP1 nach Forskolin-Stimulation stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen.** Während LASP1 nach 96 h Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxycyclin um durchschnittlich 80 – 90 % herunterreguliert wurde, ist nach 30 min Stimulation mit 10 µM Forskolin eine zusätzliche Zunahme an pLASP1 in Kontrollzellen (CO) sowie Knockdownzellen (KD) sichtbar.

### 3.2.2. Qualität und Quantität der isolierten RNA

Die Lysate wurden sodann unter Verwendung des peqGOLD Total RNA Kits (Peqlab Biotechnologie, Deutschland) für eine RNA-Isolation aufbereitet.

Photometrische Messungen ergaben ein mittleres  $A_{260}/_{280}$ -Verhältnis von  $2,2 \pm 0,2$ . Eine Proteinkontamination konnte damit ausgeschlossen werden (J. A. Glasel 1995). Des Weiteren belegt die Detektion der 28S und 18S rRNA in Form von zwei scharfen Banden in der RNA-Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Abb. 3.6), dass diese weder denaturiert, noch mit DNA verunreinigt sind (P. S. Aranda, D. M. LaJoie et al. 2012).

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde wiederum durch mathematische Verwertung der Absorptionwerte bei 260 nm errechnet. Diese lag durchschnittlich bei  $120 \pm 25 \mu\text{g/ml}$ , sodass bei einem maximalen RNA-Volumen von  $10,5 \mu\text{l}$ /Reaktionsansatz insgesamt  $0,5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden konnte.



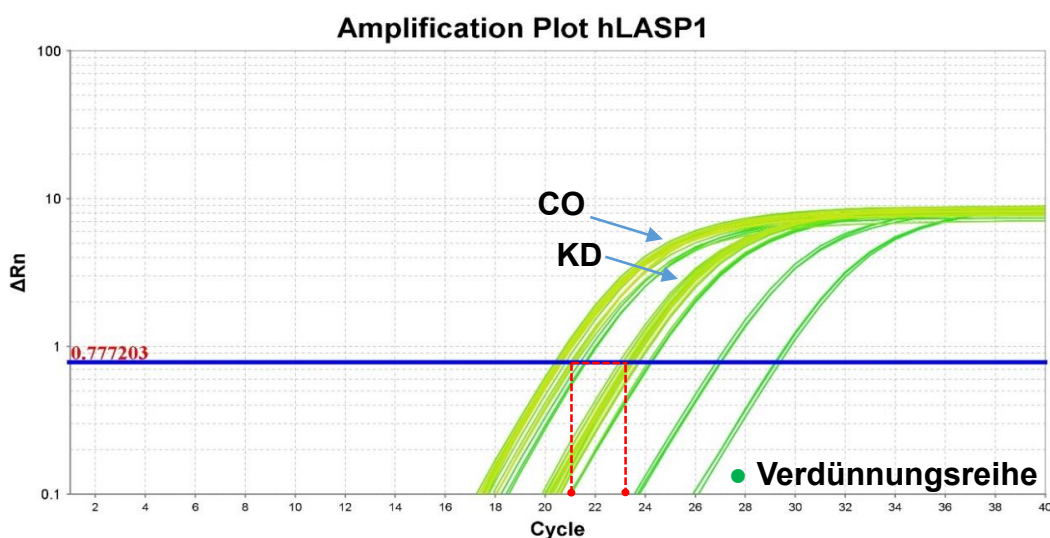
**Abbildung 3.6. RNA-Agarose-Gelelektrophorese zur Qualitätsbestimmung der extrahierten RNA.** Auf dem Gel wurde die isolierte RNA stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Kontroll- (CO) und Knockdownzellen (KD) mit bzw. ohne Forskolin-Stimulation aufgetragen. In allen Proben sind zwei scharfe Banden zu erkennen, die die ribosomale 28S und 18S rRNA repräsentieren.

### 3.2.3. RT-PCR: Spezifität und Effizienz der designten Primer

Folgende Gene wurden analysiert; die entsprechenden Primersequenzen sind im Methodenteil (vgl. 2.1.4) aufgeführt:

Name des Primers	Verwendung
RPLP0 (Ribosomal Protein, Large, P0)	Referenzgen
LASP1 (LIM And SH3 Protein 1)	interne Kontrolle
TFB1M (Transcription Factor B1, mitochondrial)	interne Kontrolle
MMP1 (Matrix-Metalloproteinase 1)	
MMP2 (Matrix-Metalloproteinase 2)	
MMP3 (Matrix-Metalloproteinase 3)	
MMP9 (Matrix-Metalloproteinase 9)	
MMP14 (Matrix-Metalloproteinase 14)	

Zur Aufklärung eines regulatorischen Effektes von LASP1 auf die Genexpressionsrate wurden für jeden Primer determinierte Abschnitte der zuvor hergestellten cDNA (vgl. 3.2.2) am ViiA™ 7 PCR System amplifiziert. Die resultierenden Amplifikationsplots (vgl. Abb. 3.7) wurden anschließend durch die ViiA™ 7 PCR System Software ausgewertet.



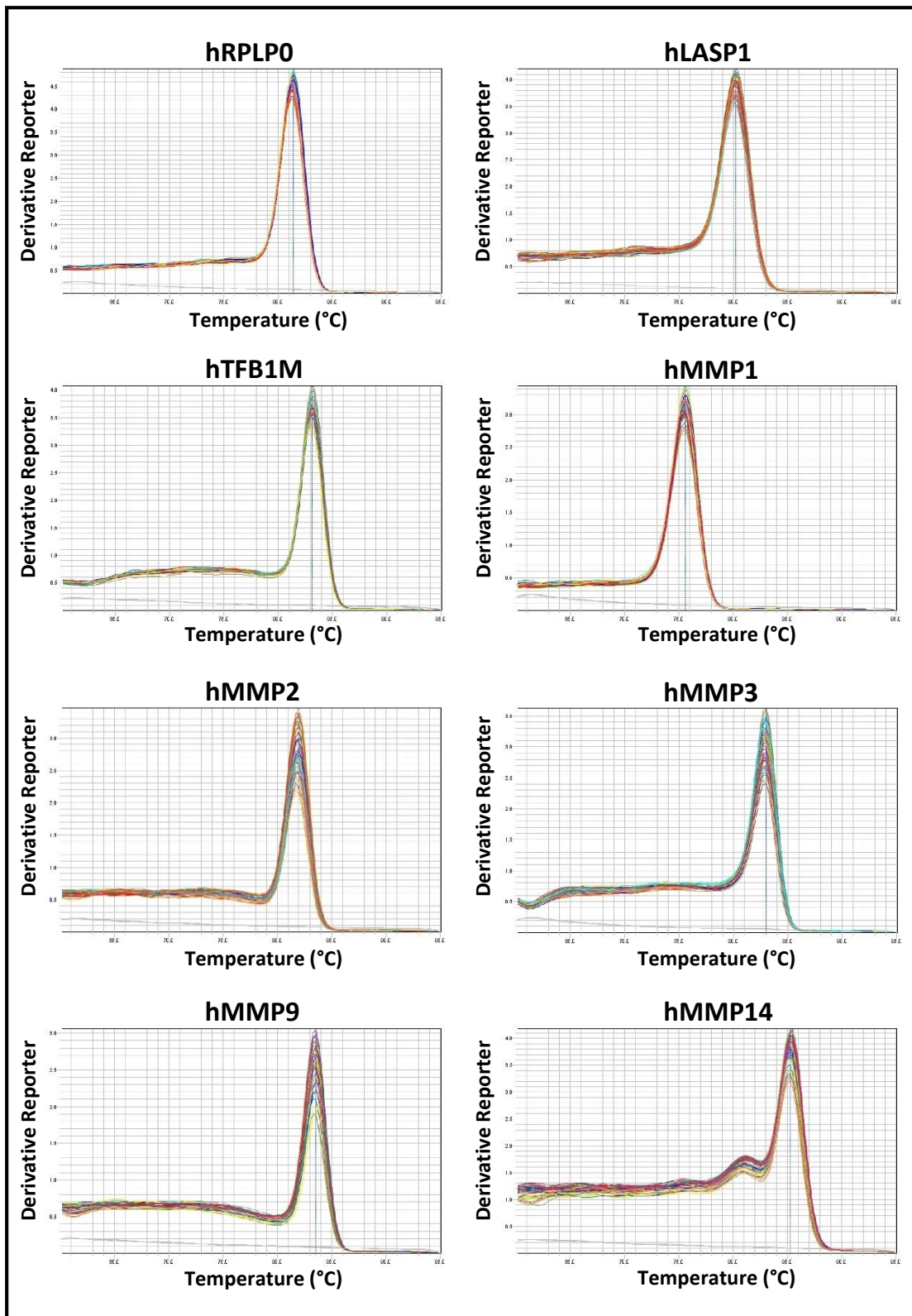
**Abbildung 3.7. Darstellung eines Amplifikationsplots zur Genexpressionsanalyse am Beispiel von LASP1.** Durch die Behandlung mit 0,5 µg/ml Doxycyclin steigt der CT (cycle threshold)-Wert von ≈ 21 auf ≈ 23,5 (●). Da  $1 \text{ CT} \triangleq 2^n$ , ergibt sich eine Abnahme der Genexpression von LASP1 um den Faktor 5,5 nach dessen Knockdown. Die 1:5-Verdünnungsreihe ist grün (●) dargestellt.

Bevor die generierten Daten zur quantitativen Analyse per  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode in Excel exportiert wurden, sollte die Spezifität und Effizienz der designten Primer bestimmt werden.

Der Nachweis der Primerspezifität erfolgte unter Etablierung eines „Melt Curve Stages“ unmittelbar nach dem PCR-Lauf. Dabei wurde die DNA durch kontinuierliche Temperatursteigerung um  $0,05\text{ }^{\circ}\text{C/s}$  aufgeschmolzen. Aufgrund differenter Wasserstoffbrückenbindungen der Guanin-Cytosin bzw. Adenin-Thymin Basenpaare und deren Anordnung innerhalb der DNA-Fragmente, ergeben sich spezifische Schmelztemperaturen der Amplicons. Dies ermöglicht deren Unterscheidung im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse. Dabei sollte ein eindeutiger, scharfer Peak zu beobachten sein (Bianca Holzapfel and Lucia Wickert 2007).

Wie in Abbildung 3.8 zu erkennen ist, zeichnet sich bei allen designten Primer ein dementsprechender Peak ab. Dadurch wurde sichergestellt, dass gezielt nur einzelne Gene amplifiziert wurden. Unspezifische DNA-Stränge wurden nicht kodiert (vgl. Abb. 3.8).





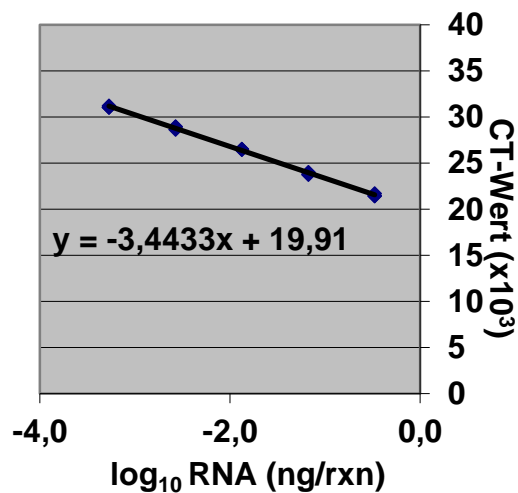
**Abbildung 3.8. Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Primerspezifität.** Der solitäre, scharfe Peak in den Schmelzkurven der Primer manifestiert deren hohe Spezifität.

Die Primereffizienz (E) wurde mit Hilfe einer Standardkurve berechnet (vgl. Abb. 3.9). Diese wurde über die CT-Werte der jeweiligen Verdünnungsreihe grafisch erstellt. Mit einer Regressionsgeraden durch die Kurve und der Steigung -m ergibt sich für die Primereffizienz (E):  $E = 10^{-1/m} - 1$ . Eine Steigung m von -3,32 entspricht dabei einer Effizienz von 1 ( $\cong 100\%$ ) (Christine S. Booth, Elsje Pienaar et al. 2010).

Dadurch ergibt sich für die in der quantitativen RT-PCR verwendeten Primer eine Effizienzspanne von 85–120%. Die einzelnen Werte wurden in Tabelle 3.1 aufgeführt.

**Tabelle 3.1. Primereffizienz (E)**

Primer Name	Primereffizienz (%)
hRPLP0	92,0
hLASP1	95,2
hTFB1M	110,0
hMMP1	89,9
hMMP2	99,9
hMMP3	91,6
hMMP9	120,3
hMMP14	86,0



*Abbildung 3.9. Darstellung einer typischen Standardkurve zur Berechnung der Primereffizienz am Beispiel von LASP1.*

### 3.2.4. Relative Genexpressionsanalyse mittels $\Delta\Delta$ CT-Methode

Nachdem die Primerspezifität und -effizienz ermittelt wurde, konnte eine quantitative Genexpressionsanalyse zur Feststellung eines transkriptionellen Effektes von LASP1 durchgeführt werden. Dies geschah unter Anwendung der  $\Delta\Delta$ CT-Methode (K. J. Livak and T. D. Schmittgen 2001). Als Referenzgen wurde RPLP0 verwendet. Der Versuch bestand aus 4 Ansätzen à 4 Proben (n=4) und wurde zweimal wiederholt.

Abbildung 3.10 zeigt, dass tatsächlich eine Regulation der Genexpression in Folge des LASP1 Knockdowns zu beobachten ist. Die Herunterregulation von LASP1 (vgl. Abb. 3.10 A) führte, wie zuvor in den Mikroarrays beobachtet, auch in der RT-PCR zu einer signifikanten Abnahme der Genexpression der Matrix-Metalloproteasen MMP1,

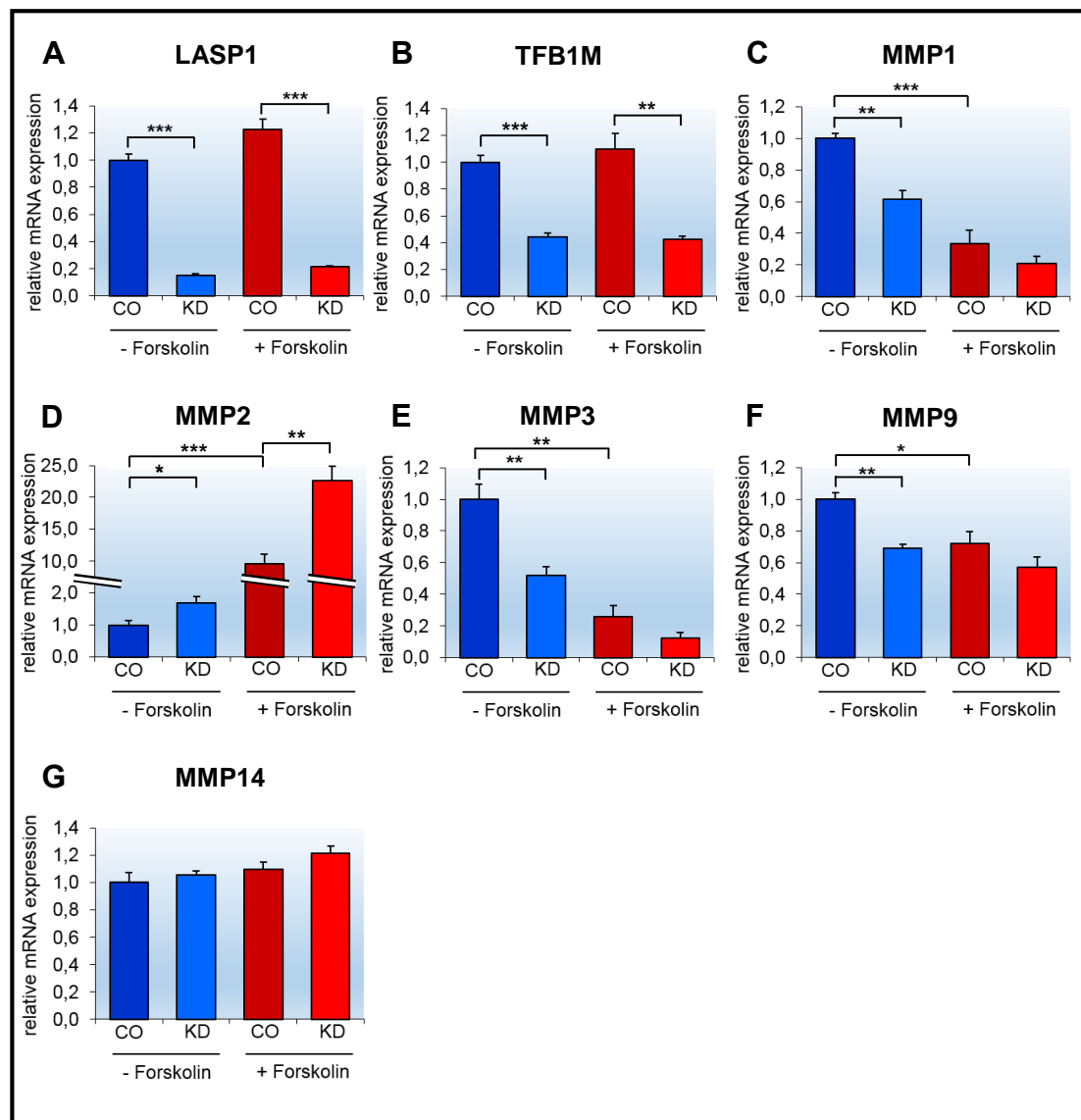
-3 und -9, sowie des Kontrollproteins TFB1M (vgl. Abb. 3.10 B-C, E-F). MMP2, die als sekundäre Gelatinase überprüft werden sollte, wurde nach dem stabilen Knockdown hochreguliert (vgl. Abb. 3.10 D). Der LASP1 Knockdown hatte keinen Effekt auf die membranständige MMP14 (vgl. Abb. 3.10 G).

Die Stimulation mit Forskolin hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die relativen LASP1-induzierten Expressionseffekte der untersuchten Gene (vgl. Tab. 3.2). In Abbildung 3.10 ist allerdings zu erkennen, dass Forskolin selbst die Transkription zu regulieren vermag. Während die relative mRNA Expression von MMP2 nach Inkubation mit Forskolin, um den Faktor 11,2 zunimmt (vgl. Abb. 3.10 D), wird die Genexpression von MMP1 und MMP3 um den Faktor 3,1 bzw. 3,8 reduziert (vgl. Abb. 3.10 C+E). In den Folgeexperimenten wurde daher auf die Forskolinstimulation verzichtet.

Zusammenfassend konnte durch relative Quantifizierung per  $\Delta\Delta$ CT-Methode ein transkriptioneller Effekt von LASP1 auf Matrix-Metalloproteasen nachgewiesen werden. Während die relative mRNA-Expression von MMP1, MMP3 und MMP9 durch LASP1 hochreguliert wird, wird die Genexpression von MMP2 herunterreguliert.

**Tabelle 3.2. „Fold-Change“ der mRNA-Transkription nach Doxycyclin-Behandlung (ohne & mit zusätzlicher Forskolin-Inkubation)**

	<b>Doxycycline (- Forskolin)</b>	<b>Doxycyclin (+ Forskolin)</b>
<b>LASP1</b>	- 6,59	- 5,77
<b>TFB1M</b>	- 2,27	- 2,58
<b>MMP1</b>	- 1,62	- 1,55
<b>MMP2</b>	+ 1,70	+ 1,89
<b>MMP3</b>	- 1,93	- 2,09
<b>MMP9</b>	- 1,45	- 1,26
<b>MMP14</b>	+ 1,06	+ 1,11



**Abbildung 3.10. Relative Genexpressionsanalyse zum Nachweis eines transkriptionellen Effektes von LASP1 auf Matrix-Metalloproteasen.** Während der Knockdown von LASP1 (A) eine Abnahme der relativen mRNA-Expression von MMP1, MMP3 und MMP9 (C, E-F), sowie von TFB1M (B) zur Folge hatte, wurde die Genexpression von MMP2 (D) hochreguliert. Ein transkriptioneller Einfluss auf MMP14 wurde nicht beobachtet (G). Die Stimulation mit Forskolin hatte zwar keine größeren Effekte auf die LASP1-abhängige Genregulation, beeinflusste allerdings selbst die Transkription mitunter signifikant (C-F).

### 3.2.5. Absolute Genexpressionsanalyse unter Etablierung einer Standardkurve

Die grafische Erstellung einer Gen-spezifischen Standardkurve aus den CT-Werten der jeweiligen Verdünnungsreihe ermöglichte, neben Bestimmung der Primereffizienz (E), die absolute Quantifizierung der RT-PCR Daten (S. A. Bustin 2000).

Dabei wurde die Konzentration der Zielgene in Relation zum stabilen „Housekeeping-Gen“ RPLP0 gesetzt. Nachdem diesem der Wert 1 zugeordnet wurde, konnten die synthetisierte mRNA-Menge der einzelnen Gene im Verhältnis zu RPLP0 ausgedrückt werden. Das bedeutet im Falle von LASP1, dass die Gesamt-transkribierte mRNA von LASP1 um den Faktor 5 geringer ist als die des Referenzgens RPLP0. Die errechneten Absolutwerte sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

**Tabelle 3.3. Absolutwerte der Zielgene**

<b>Gen</b>	<b>Absolutwert (relativ zu RPLP0)</b>
RPLP0	1
LASP1	1 : 5
TFB1M	1 : 15
MMP1	1 : 500
MMP2	1 : 8000
MMP3	1 : 50000
MMP9	1 : 625
MMP14	1 : 160

**3.3. KORRELATION ZWISCHEN ΔPROTEINEXPRESSION UND ΔGENEXPRESSION  
DER MATRIX-METALLOPROTEASEN NACH LASP1 KNOCKDOWN**

**3.3.1. Western Blot Analyse der MMP-Proteinexpression in stabil transfizierten  
MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen vor bzw. nach stabilem LASP1 Knockdown**

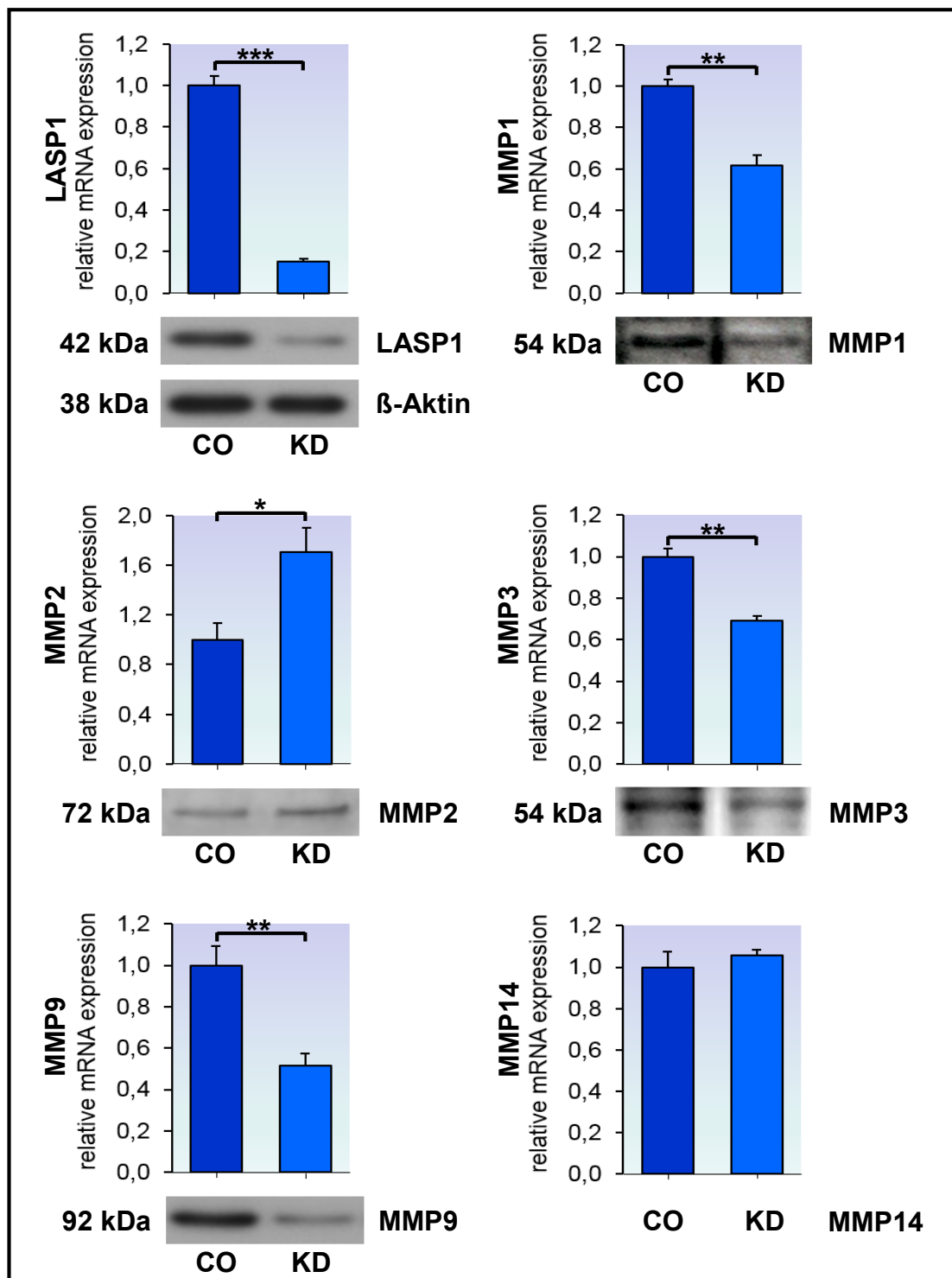
Durch relative Quantifizierung der RT-PCR Daten konnte gezeigt werden, dass LASP1 die mRNA-Expression der Matrix-Metalloproteasen beeinflusst (vgl. 3.2.4). Da die mRNA das Ausgangsprodukt der Proteinbiosynthese ist, sollte der transkriptionelle Effekt eine nachweisliche Änderung auf Proteinebene zur Folge haben (Y. Guo, P. Xiao et al. 2008). Um dies zu verifizieren wurde die Proteinexpression von MMP1, MMP2, MMP3 und MMP9 in stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Kontroll- und Knockdownzellen per Immunblot untersucht.

Insgesamt wurden 5 Proben pro Ansatz (n = 5) evaluiert. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Dabei konnte bestätigt werden, dass die Änderung der Genexpression der Matrix-Metalloproteasen durch LASP1 eine entsprechende Ab- bzw. Zunahme der Proteinkonzentration nach sich zieht (vgl. Abb. 3.11). Im Falle von MMP1, MMP3 und MMP9 war der resultierende Effekt auf Proteinebene signifikant (p < 0,05) (vgl. Tab. 3.4). Der vorher auf PCR-Ebene beobachtete Anstieg der MMP2 war auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar.

**Tabelle 3.4. Vergleich der Konzentration der Matrix-Metalloproteasen in MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Kontrollzellen (CO) und Knockdownzellen (KD).** Die einzelnen Werte (n = 4) der Matrix-Metalloproteasen (MMP1, -2, -3 und -9) in Kontroll- (CO) und Knockdownzellen (KD) wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ erfasst und mittels t-Test für Mittelwertsgleichheit ausgewertet. Die errechneten Signifikanzen lagen mit Ausnahme von MMP2 unter 0,05. Damit unterscheiden sich die Werte von MMP1, -3 und -9 zwischen den Kontroll- und Knockdownzellen signifikant.

		Werte					Mittelwert	Signifikanz p
<b>MMP1</b>	CO	0,86	0,93	0,95	0,93	0,88	0,91	0,022
	KD	0,67	0,92	0,54	0,79	0,71	0,73	
<b>MMP2</b>	CO	0,62	0,67	0,76	0,74	0,82	0,72	0,075
	KD	0,74	0,74	0,87	0,88	0,83	0,81	
<b>MMP3</b>	CO	0,89	0,92	0,91	0,87	0,88	0,89	0,008
	KD	0,41	0,84	0,54	0,74	0,42	0,59	
<b>MMP9</b>	CO	0,98	0,84	0,97	0,97	0,98	0,95	0,014
	KD	0,82	0,84	0,74	0,66	0,43	0,70	

Durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen  $\Delta$ Protein- und  $\Delta$ Genexpression konnte ferner ein positiv linearer Zusammenhang zwischen der mRNA Konzentration und der resultierenden Proteintranskription konstatiert werden. Mit den Werten 0,94 für MMP1; 0,90 für MMP2; 0,82 für MMP3 und 0,95 für MMP9 lag in allen Fällen eine hohe Korrelation vor.



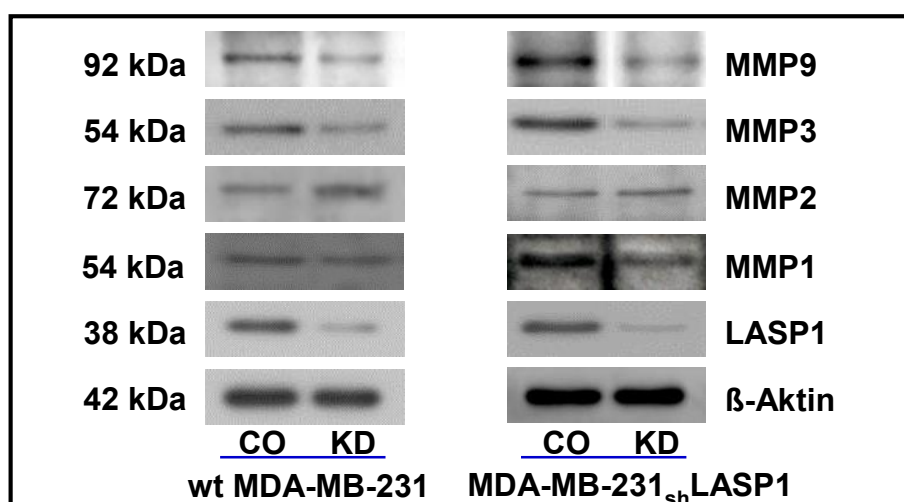
**Abbildung 3.11. Gegenüberstellung der Matrix-Metalloproteasen mRNA Expression und der korrespondierenden Proteintranskription in MDA-MB-231<sub>shLASP</sub> Kontroll- (CO) und Knock-downzellen (KD).** Während eine korrespondierende Abnahme der Gen- sowie Proteinexpression von MMP1, MMP3 und MMP9 nach dem LASP1 Knockdown zu beobachten ist, lässt sich die erhöhte mRNA Konzentration für MMP2 auf Proteinebene nicht bestätigen. MMP14 zeigt keinerlei Veränderung.



### 3.3.2. Western Blot Analyse der MMP-Proteinexpression in wt MDA-MB-231 Zellen vor bzw. nach transientem LASP1 Knockdown

Wie zuvor beschrieben (vgl. 2.1.1), wurden die MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen zur Produktion eines stabilen LASP1 Knockdowns per lentiviraler Infektion generiert. Bekanntermaßen besteht im Rahmen dieser Methode die Möglichkeit der Induktion sog. „Off-target“ Effekte. Es kann zu einem Mismatch zwischen shRNA und Ziel-mRNA (A. L. Jackson, S. R. Bartz et al. 2003) bzw. zu einer unbeabsichtigten Aktivierung des Interferon-Systems kommen (C. A. Sledz, M. Holko et al. 2003). Dies könnte die Ergebnisse verfälschen. Um derartige unspezifische Effekte auszuschließen, wurden die Knockdown Experimente (vgl. 3.3.1) an Wildtyp (wt) MDA-MB-231 Zellen wiederholt. Unter Einsatz des Transfektionsreagenzes Metafectene® wurde eine LASP1 spezifische siRNA inkorporiert (vgl. 2.2.1.6), um einen transienten LASP1 Knockdown zu erreichen.

Der resultierenden Knockdown Effekt von LASP1 in wt MDA-MB-231 Zellen auf die Proteinexpression der Matrix-Metalloproteasen war äquivalent zu den Resultaten in den stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen. MMP1, MMP3 und MMP9 wurden jeweils herunterreguliert. Im Gegensatz dazu wurde MMP2 hochreguliert (vgl. Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12. Immunblot zur Analyse verschiedener MMPs in Wildtyp (wt) MDA-MB-231 und stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen nach LASP1 Knockdown.** Die LASP1 induzierten Änderungen auf Proteinebene sind in beiden Zelltypen gleich. CO: Kontrollzellen; KD: Knockdownzellen.

### 3.4. REGULATION DER MMP-SEKRETION IN DIE EXTRAZELLULÄRMATRIX DURCH LASP1

Als nukleozytoplasmatisches Gerüstprotein ist LASP1 nicht nur an der Genregulation beteiligt (N. Duvall-Noelle, A. Karwandyar et al. 2015), sondern zugleich in sekretorische Prozesse involviert. So reguliert LASP1 z.B. in Parietalzellen den Transport und die Aktivierung der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Vesikel (C. S. Chew, X. Chen et al. 2008). In Melanozyten ist das Protein an der Exozytose Melanin-beladener Melanosome beteiligt (V. S. A. Vaman, H. Poppe et al. 2015). Da LASP1 auch in Invadopodien, den Sekretionsorten der MMPs, lokalisiert ist, wurde eine mögliche Beteiligung des Proteins an der Freisetzung der Zymogene analysiert.

Dazu wurde die Proteinkonzentration der Matrix-Metalloproteasen im Zelllysat und dem konditioniertem Medium stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen vor und nach dem LASP1 Knockdown per Immunblot bestimmt. Die Analyse der MMPs im konditionierten Medium erforderte dafür eine vorige Aufkonzentration am Concentrator plus um den Faktor 10 (vgl. 2.2.1.3).

Der Versuch wurde mit insgesamt 5 Proben je Ansatz (n = 5) zweimal wiederholt. Der LASP1 Knockdown lag im Durchschnitt bei  $\approx 80\%$  (vgl. Abb. 3.13 A). Verglichen wurden die LASP1-induzierten Änderungen der Proteinkonzentration von MMP1, -2, -3 und -9 zwischen Zytosol und dem konditionierten Medium.

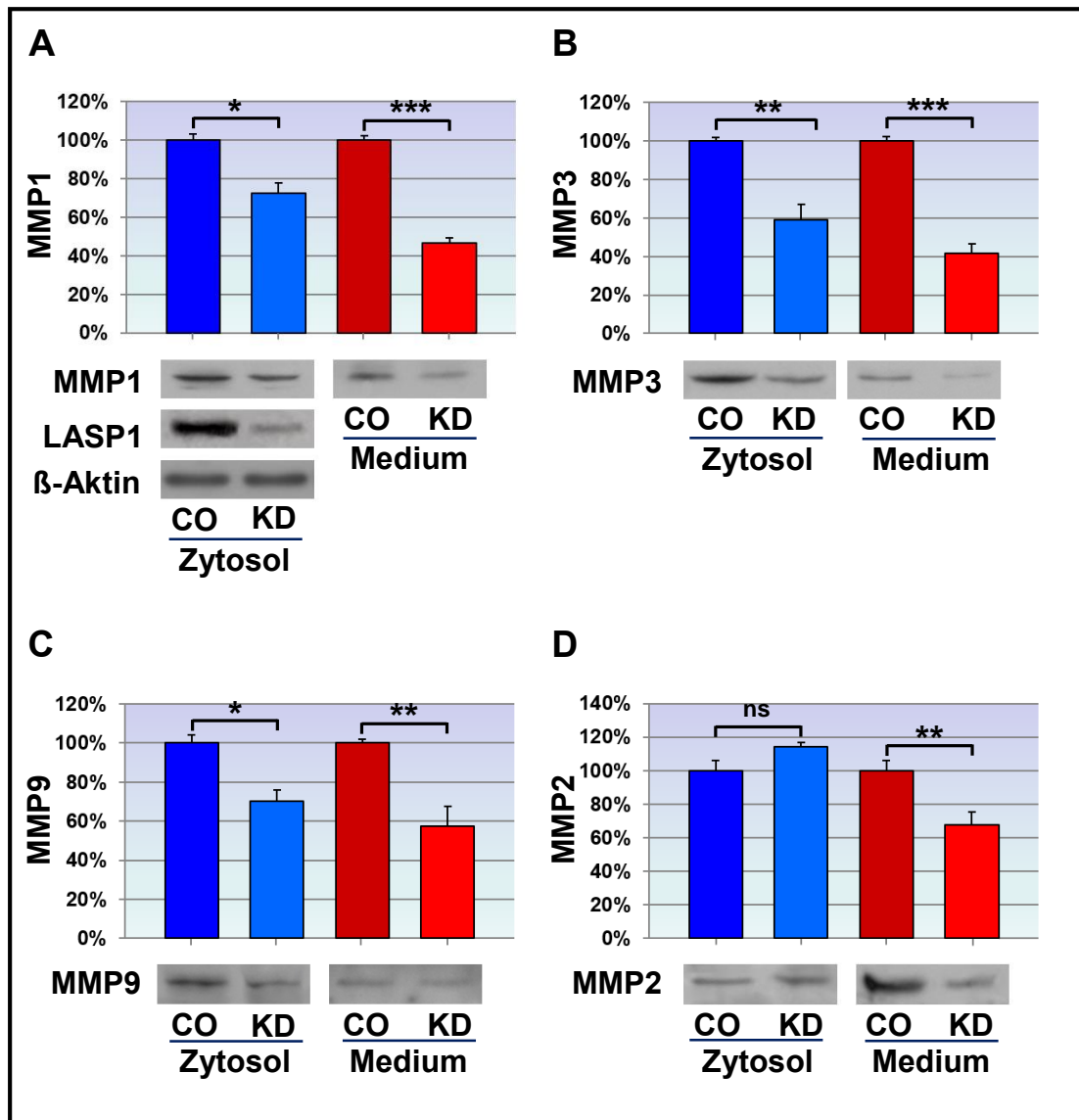
Die durch LASP1 Knockdown resultierende MMP1-Konzentrationsabnahme in der Zelle beträgt  $27,4 \pm 5,0\%$ . Beim Vergleich der Veränderung der MMP1-Konzentration nach Herunterregulation von LASP1 zwischen Zytosol und dem konditionierten Medium ist eine zusätzliche Reduktion im konditionierten Medium um  $\emptyset 25,6\%$  auf  $46,6 \pm 2,5\%$  zu beobachten (vgl. Abb.3.13 A). Die Verringerung des Gesamt-sezernierten MMP1 Anteils ist höchst signifikant ( $p < 0,001$ ). Äquivalente Ergebnisse wurden für MMP3 und MMP9 gemessen (vgl. Abb. 3.13 B+C). Mit einer Restkonzentration von  $41,8 \pm 4,8\%$  ( $p < 0,001$ ) nach stabilem Knockdown im konditionierten Medium, wird MMP3 durch den additiven LASP1-Effekt auf die Sekretion um weitere  $\emptyset 17,2\%$  im Vergleich zum Zytosol ( $59,0 \pm 0,1\%$ ;  $p < 0,1$ ) herunterreguliert (vgl. Abb. 3.13 B). Bei MMP9 beträgt die

---

Differenz der Proteinkonzentration zwischen Kontroll- und Knockdownzellen im Zytosol  $29,9 \pm 6,1$  %, während die Differenz im konditionierten Medium bei  $42,5 \pm 10,3$  % liegt. Dies entspricht einer zusätzlichen Abnahme von  $\emptyset 12,6$  % ( $p < 0,05$ ) (vgl. Abb. 3.13 C).

Im markantesten waren die Ergebnisse für MMP2. Obwohl die MMP2 Proteinkonzentration sich in den Zellen nach LASP1 Knockdown nicht veränderte, wurde eine Abnahme der MMP2-Konzentration im konditionierten Medium um  $32,2 \pm 7,4$  % ( $p < 0,01$ ) festgestellt (vgl. Abb. 3.13 D). Dies impliziert einen regulatorischen Effekt von LASP1 auf die MMP2-Freisetzung.

Unter Berücksichtigung aller untersuchten Proben ( $n = 15$ ) war durchschnittlich eine zusätzliche, nicht-transkriptionell bedingte Abnahme der MMP-Konzentration im konditionierten Medium um  $25,2 \pm 8,9$  % ( $p < 0,05$ ) zu beobachten. Insofern ist von einer LASP1-Beteiligung an der Sekretion der Zymogene in die Extrazellulärmatrix auszugehen.



**Abbildung 3.13. Regulation der Matrix-Metalloproteasen Sekretion in die Extrazellulärmatrix durch LASP1.** Die Quantifizierung der Proteinkonzentration der Matrix-Metalloproteasen im Zelllysat (Zytosol) und dem konditionierten Medium stabil transfizierter MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen vor (CO) und nach (KD) LASP1 Knockdown per Western Blot weist auf eine regulatorische Beteiligung von LASP1 an den Sekretionsprozessen der Zymogene (pro-MMPs) hin.

---

### 3.5. AKTIVITÄTSVERHALTEN DER MATRIX-METALLOPROTEASEN IN MDA-MB-231<sub>sh</sub>ZELLEN MIT STABILEM LASP1 KNOCKDOWN

In den bisherigen Experimenten konnten zwei-regulatorische Mechanismen von LASP1 auf Matrix-Metalloproteasen, die einen nachweislichen Effekt auf das invasive Potential von Invadopodien humaner Brustkrebszellen ausüben, beobachtet werden.

Bis dato wurde allerdings die Aktivität der MMPs selbst nicht weiter betrachtet. Bekanntermaßen werden MMPs in vivo zur räumlichen und zeitlichen Kontrolle als inaktive Zymogene, sog. pro-MMPs, gebildet (R. Visse and H. Nagase 2003). Eine mögliche Interaktion zwischen LASP1 und der Aktivierung der pro-MMPs bzw. eine kompensatorischen Steigerung der Aktivität sollte daher im Folgenden untersucht werden.

Dazu wurden native Gele, sog. Zymogramme, eingesetzt. Die zu untersuchenden Proteingemische werden hierbei unter nicht-reduzierenden und denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das SDS durch Zugabe einer Triton X-100-Lösung zugunsten einer partiellen Renaturierung und Aktivitätszunahme der Proteasen extrahiert. Bei Anwesenheit spezifischer Substrate (z.B. Casein, Gelatin) degradieren nunmehr aktive Proteasen (MMPs) die Gele im Bereich ihres Molekulargewichts. Der Abbau des Substrates erscheint nach Färbung mit Coomassie als weißer Balken. Während die Proteasen anhand ihres Molekulargewichts über Proteinstandards bestimmt werden, gibt die Stärke und Ausprägung der weißen Balken Aufschluss bzgl. deren Aktivität (P. A. Snoek-van Beurden and J. W. Von den Hoff 2005).

Für die Versuche wurden stabil transfizierte MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Kontroll- und Knockdownzellen, nach Erreichen einer Konfluenz von > 80 %, für weitere 24h in serumfreiem RPMI1640 Medium inkubiert, bevor sie in RIPA-Puffer lysiert wurden (vgl. 2.2.2.4). Das konditionierte Medium wurde im Concentrator plus um den Faktor 5 aufkonzentriert (vgl. 2.2.1.3). Die Proben wurden anschließend zur späteren Analyse in die Taschen der einzelnen Proteingele pipettiert (vgl. 2.2.2.4). Als interne MMP-Kontrolle wurden HUF Zellen („Human Uterine Fibroblasts“) verwendet.

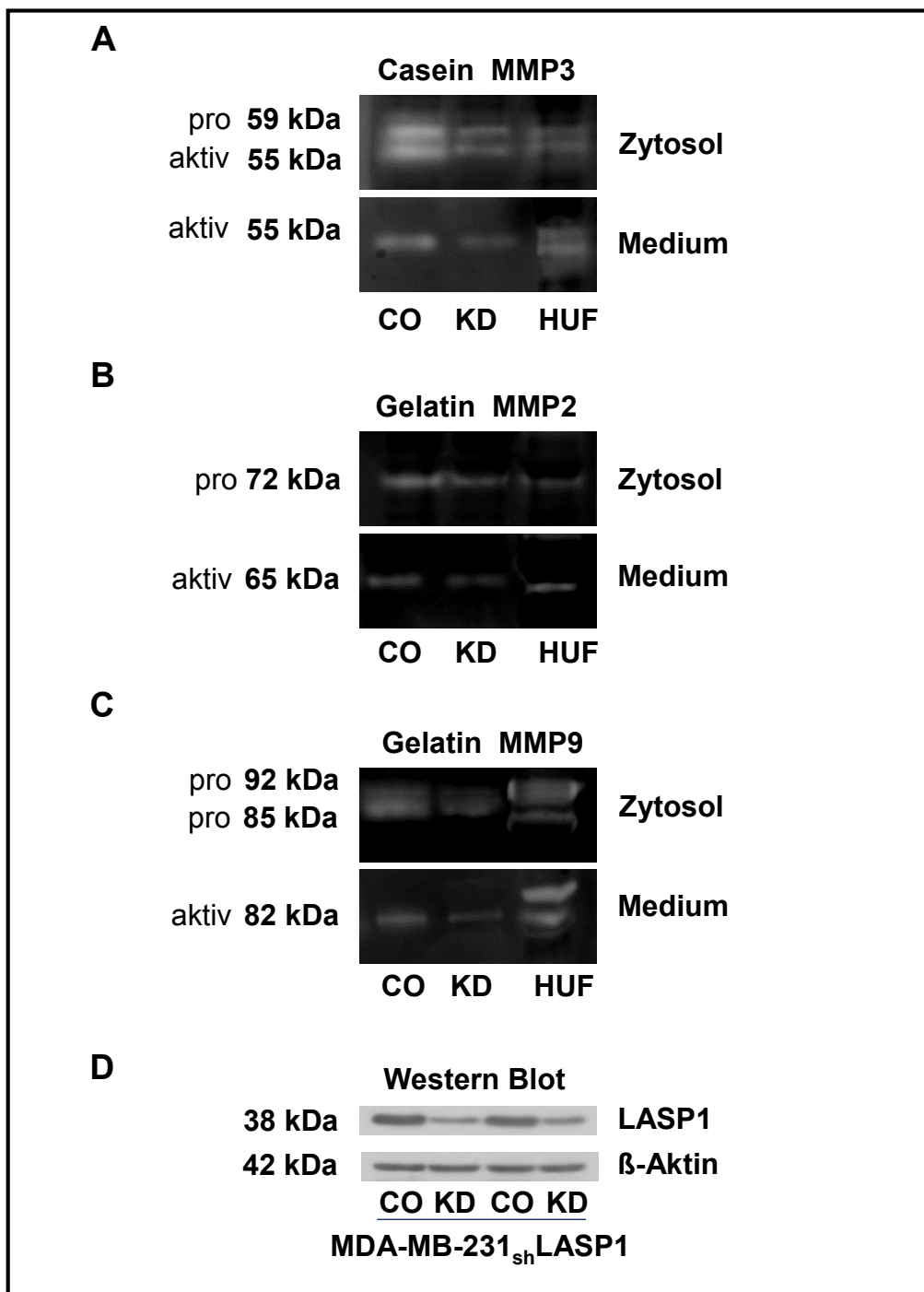
Während MMP3 in den 12 % Casein-Gelen am besten zu detektieren ist, sind 10 % Gelatin-Gele die Standardwahl zur Detektion von MMP2 und MMP9. MMP1 sollte in beiden Gelen in abgeschwächter Form nachweisbar sein (K. Kupai 2011)

Abbildung 3.14 A zeigt die Ergebnisse aus den Casein-Gelen. Aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts der aktiven (59 kDa) und der Pro-Form (55 kDa) von MMP3 konnten in den Zellsysaten beide Formen unterschieden und nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, liegt im konditionierten Medium lediglich die aktive Form vor.

Ähnliche Resultate wurden bei MMP2 und MMP9 beobachtet. In den Gelatin-Gelen konnte bei beiden MMPs im Zytosol sowohl die inaktive (pro-MMP2  $\cong$  72 kDa; pro-MMP9  $\cong$  92 kDa), als auch die aktive Form (MMP2  $\cong$  65 kDa; MMP9  $\cong$  82 kDa) detektiert werden. Ferner wurde im Fall von MMP9 eine zweite Pro-Form mit einem Molekulargewicht von 85 kDa registriert. Dies entspricht der deglycosylierten inaktiven Form (M. Toth, D. C. Gervasi et al. 1997). Im Medium hingegen sind wieder nur die aktiven Formen nachweisbar (vgl. Abb. 3.14 B+C).

Die Detektion von MMP1 bei 54 kDa (Pro-Form) bzw. 44/41 kDa (aktive Form) konnte nicht eindeutig belegt werden. Deren Pro-Form überlagert sich wegen des Molekulargewichts mit der aktiven Form von MMP3 (vgl. Abb. 3.14 A). Ferner ist weder Casein noch Gelatin ein favorisiertes Substrat von MMP1. Demzufolge sind die resultierenden Signale für eine aussagekräftige Illustration zu schwach.

In allen Gelen ist aufgrund der Reduktion der MMP-Konzentration durch den LASP1 Knockdown (vgl. Abb. 3.14 D) die Gesamt-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert. Ein direkter inhibitorischer Effekt von LASP1 auf die Aktivierung der Zymogene bzw. eine kompensatorische Aktivitätszunahme konnte somit ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.14. Aktivität der Matrix-Metalloproteasen in MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen vor (CO) bzw. nach (KD) LASP1 Knockdown.** (A-C) Im Gegensatz zur interstitiellen Kollagenase MMP1, wurden das Stromelysin MMP3, sowie die Gelatinasen MMP2 und MMP9 im Zytosol und konditioniertem Medium per Zymographie detektiert. Die enzymatische Gesamtaktivität der MMPs ist aufgrund der reduzierten MMP-Konzentration durch den LASP1 Knockdown vermindert. Ein LASP1-inhibitorischer Effekt auf die Aktivierung der Zymogene bzw. eine Gegenregulation durch Aktivitätszunahme kann ausgeschlossen werden. Die HUF Zellen wurden als interne MMP-Kontrolle verwendet. (D) Der stabile LASP1 Knockdown wurde per Western Blot verifiziert. Dieser lag durchschnittlichen bei 70 – 80 %.  $\beta$ -Aktin diene als Ladekontrolle.

---

#### **4. DISKUSSION**

90 % aller Krebspatienten versterben in Folge der Metastasierung der malignen Krebszellen in entlegene Organe. Diesem invasivem Prozess liegt die Degradation der Extrazellulärmatrix des Tumorstromas, der Basalmembran sowie der Blut- und Lymphgefäße zugrunde (P. Mehlen and A. Puisieux 2006). Die Tumor-induzierte Bildung invadopodialer Strukturen und damit implizierte Sekretion proteolytischer Endopeptidasen, sog. Matrix-Metalloproteasen, ist Grundvoraussetzung für einen derartigen Prozess (H. Yamaguchi and T. Oikawa 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein neues regulatorisches Gerüstprotein in Invadopodien humaner Brustkrebszellen identifiziert – das LIM und SH3 Domänen Protein 1 (LASP1). LASP1 wird in diversen Tumorentitäten überexprimiert und korreliert dabei u.a. mit Tumorgröße und Aggressivität (M. F. Orth, A. Cazes et al. 2015).

Die gewonnenen Daten liefern erste Erklärungen hinsichtlich des zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismus von LASP1 auf die Regulation der für die EZM-Degradation, und damit für die Metastasierung, wichtigen Matrix-Metalloproteasen in einer malignen, invasiven, adenokarzinösen Brustkrebszelllinie.

Matrix-Metalloproteasen werden generell auf mehreren Ebenen zugleich kontrolliert und reguliert, sodass die aufeinanderfolgenden Schritte wie Translation, Proteintranskription, Sekretion und Aktivierung der Zymogene (pro-MMPs) jederzeit moduliert werden können (S. Chakraborti, M. Mandal et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmalig auf, dass die Herunterregulation von LASP1, sowohl die Genexpression als auch die Freisetzung der Matrix-Metalloproteasen in die Extrazellulärmatrix maßgeblich beeinträchtigt (vgl. Abb. 3.11).

Der Effekt von LASP1 auf die Sekretion der Zymogene ist bei MMP2 am prägnantesten (vgl. Abb. 3.13 D). MMP2 ist als primäre Gelatinase, durch den Abbau von Gelatin, Laminin und Kollagen Typ IV, in der Tumorzellproliferation, der Migration, sowie der Degradation der Basallamina involviert. Darüber hinaus fördert MMP2 die Tumor-Angiogenese, induziert die Epithel-mesenchymale Transition (EMT) und unterdrückt die



---

aktive T-Zellantwort gegen die Tumorzellen (C. Gialeli, A. D. Theocharis et al. 2011). Jezierska und Motyl konnten ferner eine direkte Korrelation zwischen MMP2 und der Tumorinvasion sowie Metastasierung in humanen Brustkrebszellen nachweisen (A. Jezierska and T. Motyl 2009).

Für MMP2 wurde in dieser Arbeit eine signifikante Abnahme ( $p < 0,01$ ) der Freisetzung von proMMP2 aus humanen Brustkrebszellen nach LASP1 Knockdown um  $32,2 \pm 7,4$  % festgestellt (vgl. Abb. 3.13 D). Vergleichbare Ergebnisse, wenn auch mit leicht geringerer Sekretionsrate, wurden ebenfalls für MMP1, -3 und -9 beobachtet (vgl. Abb. 3.13 A-C).

MMP2 und MMP9 werden, nachdem sie unter Abspaltung der Prädomäne zum Golgi-Apparat transportiert wurden (S. Zucker and W.-T. Chen 2003), am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in VAMP4- und Rab40b-haltige Exportvesikel gepackt, um nachfolgend mit Hilfe des Motorproteins Kinesin entlang der Mikrotubuli Richtung Podosomen/Invadopodien weitergeleitet zu werden (A. Jacob, J. Jing et al. 2013). Dort werden sie sehr wahrscheinlich gemäß des „Kiss and Run“-Mechanismus unter Einbeziehung der Proteine Clathrin, Aktin und Dynamin exozytiert (E. M. Schnaeker, R. Ossig et al. 2004, J. K. Jaiswal, V. M. Rivera et al. 2009).

Für MMP1 und MMP3 wird, trotz fehlender Daten ein ähnlicher Sekretionsmechanismus diskutiert (A. Lauzier, M. Charbonneau et al. 2011, N. Garamszegi, S. P. Garamszegi et al. 2012).

Dieser Sekretionsprozess ist mit der kürzlich identifizierten LASP1-abhängigen Freisetzung der Melanosomvesikel in Melanozyten vergleichbar (V. S. A. Vaman, H. Poppe et al. 2015), wobei LASP1 als Bindungspartner und Mediator von Dynamin für dessen Rekrutierung und Positionierung am Sekretionsort der Melanosome verantwortlich ist (V. S. A. Vaman, H. Poppe et al. 2015). Dort bildet die GTPase Dynamin eine abschnürende, spiralförmige Struktur, die in Folge der Hydrolyse von GTP zu GDP, die Melanosom-beladenen Vesikel freisetzt (S. L. Schmid and V. A. Frolov 2011, V. S. A. Vaman 2015). Die hierfür notwendige Energie liefert Dynamin durch Selbstassemblierung an der Lipid-reichen Plasmamembran (J. E. Hinshaw and S. L. Schmid 1995, B. Barylko, D. Binns et al. 1998, M. H. Stowell, B. Marks et al. 1999).

---

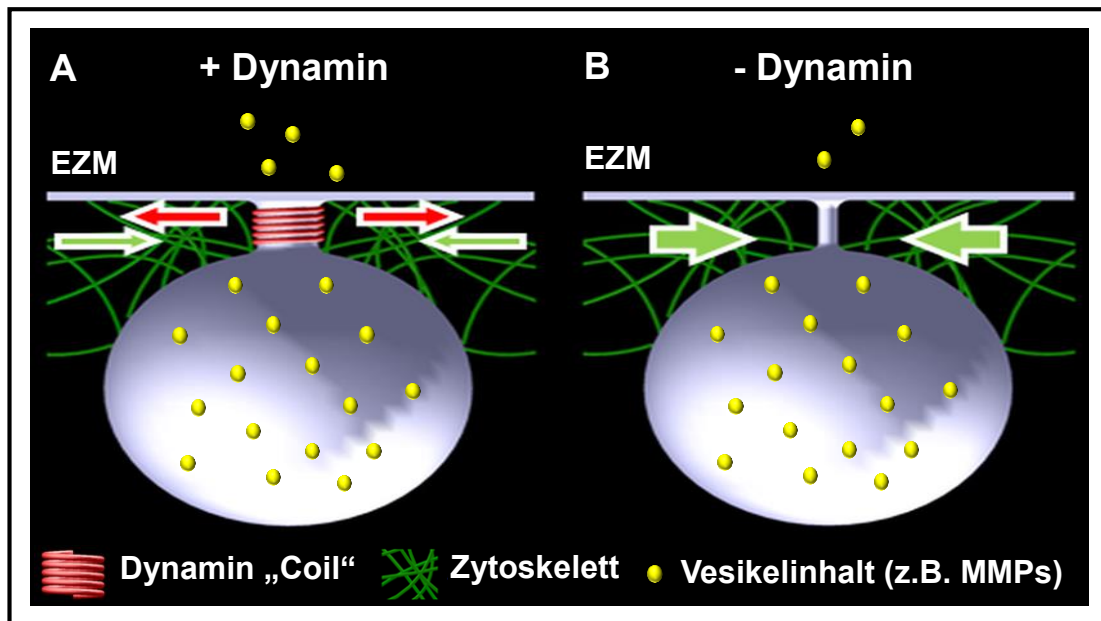
Ein äquivalenter LASP1-abhängiger Mechanismus wird ebenfalls in Hinblick auf Sekretion und Aktivierung der H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-haltigen Vesikel in Parietalzellen diskutiert (C. S. Chew, X. Chen et al. 2008).

Die Annahme, dass LASP1 in die Freisetzung der Matrix-Metalloproteasen involviert ist, wird durch die nachweisliche Interaktion zwischen LASP1, Dynamin und F-Aktin (S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013), sowie der Kolo-kalisation von Dynamin und LASP1 in podosomalen/invadopodialen Strukturen (M. Baldassarre, A. Pompeo et al. 2003, M. Stölting, C. Wiesner et al. 2012), bestärkt.

Wir gehen demzufolge davon aus, dass LASP1 aufgrund seiner Bindungsaffinität zu Dynamin, ähnlich wie im Falle der Melanosomsekretion (V. S. A. Vaman 2015), die Rekrutierung und Positionierung dieser GTPase vermittelt. Ungleich dessen werden die Vesikel der Matrix-Metalloproteasen nicht abgeschnürt, sondern bilden vermutlich, gemäß der „Kiss and Run“-Exozytose (A. A. Alabi and R. W. Tsien 2013), eine Sekretionspore, unter Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran. Infolgedessen werden die Matrix-Metalloproteasen in die Extrazellulärmatrix entleert (E. M. Schnaeker, R. Ossig et al. 2004, J. K. Jaiswal, V. M. Rivera et al. 2009).

Studien von Trouillon und Ewing beweisen ferner, dass die mechanochemische GTPase-Aktivität von Dynamin den Prozess der „Kiss and Run“-Exozytose prolongiert (Raphaël Trouillon and Andrew G. Ewing 2013). Dynamin bildet dabei einen „Coil“ um die Fusionsporen, sodass deren Radius und Beständigkeit zunimmt. Insgesamt wird somit eine erhöhte Substratmenge freigesetzt (vgl. Abb. 4.1) (A. Anantharam, M. A. Bittner et al. 2011, Raphaël Trouillon and Andrew G. Ewing 2013).

Dementsprechend würde die erhöhte LASP1-Expression in den Invadopodien der Brustkrebszellen über eine vermehrte Rekrutierung von Dynamin zu einer gesteigerten MMP-Vesikelentleerung und nachfolgend einem aggressiverem Tumorverhalten führen.



**Abbildung 4.1. Schematische Darstellung des regulatorischen Effektes von Dynamin auf die „Kiss and Run“-Exozytose.** Während die Vesikelentleerung mittels Dynamin, unter Ausbildung einer „Coil“-Struktur an der Fusionspore, prolongiert und begünstigt wird (A), ist bei Dynamin-negativen Vesikeln die Sekretionsrate reduziert (B), sodass der Vesikelinhalt (gelben Punkte) in geringerem Maße in die Extrazellulärmatrize (EZM) sezerniert wird (modifiziert nach R. Trouillon and A. G. Ewing 2014).

Der proteomische Effekt von LASP1, auf die Sekretion der Matrix-Metalloproteasen in humanen Brustkrebszellen, könnte allerdings bereits am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) entspringen. Während LASP1 in Melanozyten lediglich in der Zellperipherie nachgewiesen werden konnte (V. S. A. Vaman, H. Poppe et al. 2015), ist das Protein in humanen Brustkrebszellen sowohl an der Plasmamembran, als auch im Nukleus sowie perinukleär vorzufinden (T. G. Grunewald, U. Kammerer et al. 2007). Im perinukleären Raum befindet sich wiederum der Golgi-Apparat, einschließlich des TGNs (Mironov A. and M. Pavelka 2008). Meier et al. konnten nachweisen, dass die GTPase Dynamin, neben der Lokalisation in Invadopodien (M. Baldassarre, A. Pompeo et al. 2003), ebenfalls am Verteilungsort der vesikulär-verpackten Proteine, dem trans-Golgi-Netzwerk, vorliegt (O. Maier, M. Knoblich et al. 1996). Weitere Studien belegen, dass Dynamin dort die Vesikelfreisetzung, vermutlich via Interaktion mit SNARE-Proteinen, beeinflusst (B. Antony 2004, J. K. Jaiswal, V. M. Rivera et al. 2009). Dieser Mechanismus wurde bereits bei Vps1p, einem Dynamin-homologen Protein, in Hefezellen beobachtet (C. Peters, T. L. Baars et al. 2004). Cao et al. stellte darüber hinaus fest, dass in BHK-21

---

(Baby Hamster Kidney Fibroblasts) Zellen mit Dynamin Knockdown die Retention von GFP-tagged VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus G-Protein) am TGN um den Faktor 8-11 höher ist als in Kontrollzellen (H. Cao, H. M. Thompson et al. 2000).

Dies suggeriert, dass nach Herunterregulation von LASP1 in humanen Brustkrebszellen, möglicherweise auch Dynamin verringert am TGN vorliegt, da LASP1 als Mediator partiell fehlt, sodass die Vesikelbildung insgesamt abgeschwächt ist.

Insofern würde ebenfalls ein geringerer Anteil an MMP-haltigen Vesikeln die Invadopodien erreichen und fortfolgend in einer reduzierten MMP-Konzentration in der Extrazellulärmatrix nach LASP1 Knockdown resultieren. Diese Hypothese wurde jedoch nicht weiter überprüft.

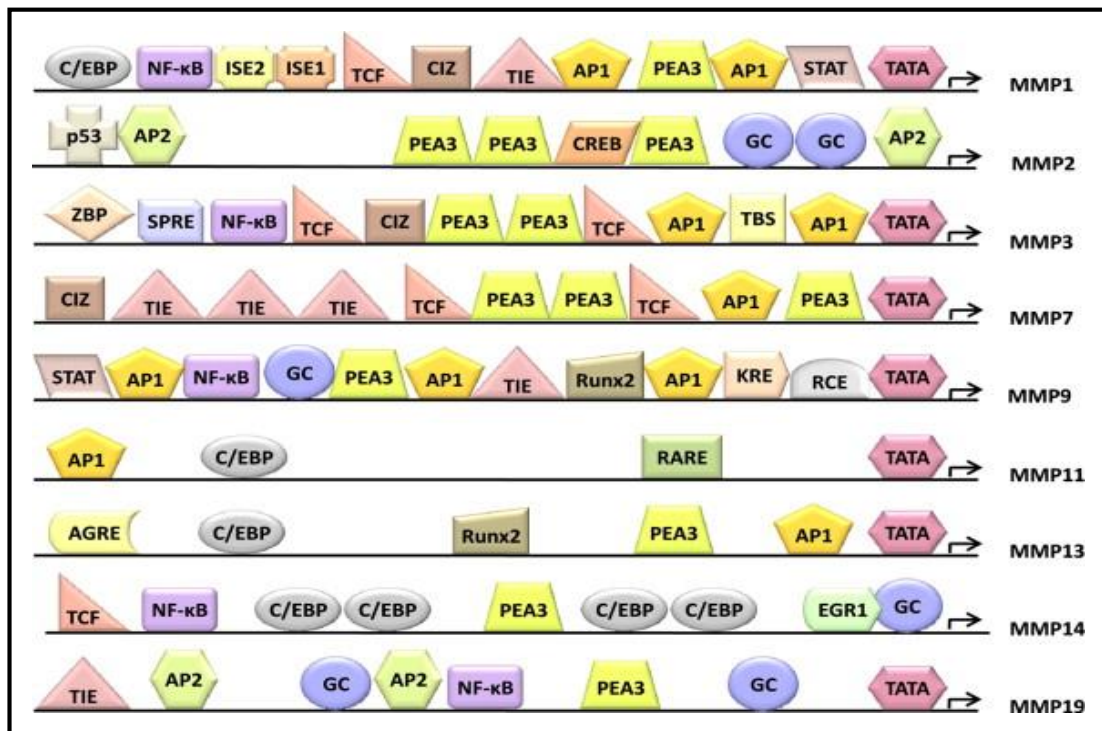
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir, neben eines LASP1-regulatorischen Effektes auf Sekretionsebene, eine zusätzliche Beeinflussung der Matrix-Metalloproteasen auf Transkriptionsebene beobachten. Analysen der qRT-PCR und Western Blot Daten belegen eine Beeinträchtigung der Genexpression von MMP1, -3 und -9 in humanen Brustkrebszellen (MDA-MB-231) nach LASP1 Knockdown, die mit einer korrespondierender Proteintranslation einhergeht (vgl. Abb. 3.11). Ein zuvor auf PCR-Ebene konstatiertes Anstieg der MMP2-Genexpression war hingegen auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar (vgl. Abb. 3.11).

Die inaktive Gelatinase proMMP2 bildet nachdem sie sezerniert wird, mit MMP14 und TIMP2 (Tissue Inhibitor of Metallo-proteinases 2) einen ternären Komplex (A. Y. Strongin, I. Collier et al. 1995), der anschließend unter Abspaltung der Prodomäne aktiviert wird (Y. Itoh, A. Takamura et al. 2001, K. Lehti, J. Lohi et al. 2002). Die durchgeführten Zymogramme zeigen jedoch keine erhöhte Aktivierung der MMP2 (vgl. Abb. 3.14 B). Dies wird durch die Mikroarraydaten, die am Institut durch Prof. Dr. Elke Butt erhoben und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, unterstützt. Der LASP1 Knockdown beeinflusst, weder die Genexpression von MMP14 noch von TIMP2.

Die Genexpression der Matrix-Metalloproteasen wird durch die Assoziation diverser Transkriptionsfaktoren, wie p53, CREB1 (cAMP-resopnsive Element-binding Protein 1), PEA3 (Polyomavirus Enhancer Activator 3), AP-1 (Activator Protein 1), C/EBP

(CCAAT/Enhancer-binding Protein 1) und SP1 (Specificity Protein 1) an cis-regulatorische Elemente der Promotor-Region, initiiert (M. Fanjul-Fernandez, A. R. Folgueras et al. 2010).

Während die AP-1-Bindeseite in den cis-Promotoren von MMP2, -7, -11, -13, -14 und -19 fehlt bzw. nur einfach vorliegt, kommt sie innerhalb der von LASP1 transkriptionell-regulierten Matrix-Metalloproteasen (MMP1, -3 und -9) nahe der TATA-Box gleich 2-3 mal vor (vgl. Abb. 4.2) (M. Fanjul-Fernandez, A. R. Folgueras et al. 2010). Wir vermuten daher einen regulatorischen Einfluss von LASP1 auf den AP-1-Transkriptionsfaktor.



**Abbildung 4.2. Cis-regulatorische Elemente der Promotor-Region von Matrix-Metalloproteasen.** Die AP-1-Bindeseite ist in der Promotor-Region, der durch LASP1 regulierten Matrix-Metalloproteasen 1, -3 und -9, zwei- bis dreimal, nahe der TATA-Box, exprimiert. Ungleich dessen, ist in den cis-Promotoren der Matrix-Metalloproteasen, deren Genexpression durch LASP1 nicht beeinflusst wurde, eine AP-1-Bindeseite fehlend (MMP2, -14, -19) bzw. lediglich einfach vorkommend (MMP7, -11, -13) (übernommen von M. Fanjul-Fernandez, A. R. Folgueras et al. 2010).

AP-1-Transkriptionsfaktoren setzen sich aus den bZIP-Domänen-Proteingruppen JUN (Jun Proto-Oncogene), FOS (FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog), ATF (Activating Transcription Factor) und MAF (Musculoaponeurotic Fibrosarcoma) zusammen (R. Eferl and E. F. Wagner 2003). AP-1 bindet, infolge einer vorhergehenden

---

Stimulation durch Zytokine, Wachstumsfaktoren bzw. Stressfaktoren (J. Hess, P. Angel et al. 2004) als dimerer Proteinkomplex (z.B JUN-JUN, JUN-FOS) an cis-Elemente der DNA und fördert bzw. inhibiert die Expression der demensprechenden Genabschnitte (P. W. Vesely, P. B. Staber et al. 2009).

Ferner ist bekannt, dass unter Bildung eines ternären Komplexes mit anderen Proteinen, u.a. PEA3 und SAF-1 (Secondary Wall- thickening Associated F-box Protein 1), die AP-1-induzierte Genexpression moduliert werden kann (J. P. Basuyaux, E. Ferreira et al. 1997, D. Kumar, A. Ray et al. 2009). Diefenbacher et al. konnten des Weiteren belegen, dass das LIM-Domänen Protein nTRIP6 (Nuclear Thyroid Receptor-interacting Protein 6) ebenfalls an den AP-1-Komplex, zugunsten einer Zunahme der Transkriptionsaktivität, zu binden vermag (M. E. Diefenbacher, D. Reich et al. 2014).

Unter diesen Gesichtspunkten könnte das LIM und SH3 Domänen Protein 1 (LASP1), aufgrund nukleärer Lokalisation und freier LIM-Domäne, mit AP-1 assoziieren und dabei die Genexpression von MMP1, -3 und -9 amplifizieren.

Dies Annahmen wird ferner durch eine „Functional Enrichment Analyse“ der Mikroarraydaten nach LASP1 Knockdown in den MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen, die am Institut erhoben und mir zur Verfügung gestellt wurden, bekräftigt. Die „Functional Enrichment Analyse“ wurde unter Verwendung der Software „FunRich“ durch Dr. Susanne Kneitz, aus dem Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Universität Würzburg, durchgeführt. Die resultierenden Daten zeigen, dass 20 % der durch LASP1 regulierten Proteine (25 von insgesamt 126) AP-1 als Transkriptionsfaktor aufweisen - darunter auch MMP1 und MMP3 (unpublished data).

Eine genauere Auswertung der mir zur Verfügung gestellten Mikroarraydaten zeigt allerdings auch, dass die Genexpression von c-Fos, ein proto-onkogener Vertreter der Familie der AP-1-Transkriptionsfaktoren, ebenfalls durch LASP1 reguliert wird (vgl. Anhang der Mikroarraydaten; S. 101).

Bekanntermaßen bindet c-Fos nach Dimerisierung mit c-Jun an die AP-1-Bindestelle der cis-Promotoren von MMP1, -3 und -9 und aktiviert deren Transkription (U. Benbow and C. E. Brinckerhoff 1997). Insofern könnte LASP1 durch obig-beschriebene Regulation die AP-1-abhängige MMP-Genexpression indirekt beeinflussen, woraus in humanen

---

Brustkrebszellen nach LASP1 Knockdown, wie in vorliegender Arbeit beobachtet (vgl. Abb. 3.10), eine Reduktion der mRNA-Expression von MMP1, -3 und -9 resultieren würde. Dieser Regulationsmechanismus kann wiederum direkt, durch Interaktion von LASP1 mit AP-1-aktivierenden Transkriptionsfaktoren, als auch indirekt, unter Beeinflussung der zugrundeliegenden Signalwege der Genexpression, begründet sein.

Beide Regulationsmechanismen werden momentan in der Arbeitsgruppe weiter untersucht.

Unter dem Gesichtspunkt der c-Fos Hochregulation ist ein erst kürzlich beschriebener neuer LASP1-Interaktionspartner interessant: Zonula Occludens 2 (ZO-2) (S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013). ZO-2 wird, ähnlich wie LASP1, in entarteten Brustkrebsgeweben verstärkt exprimiert (T. A. Martin, G. Watkins et al. 2004). Als zytosolisches Gerüstprotein reguliert ZO-2 die Etablierung der „Tight Junctions“ zur Bildung einer parazellulären Diffusionsbarriere (M. Itoh, K. Morita et al. 1999). Das Protein ist allerdings zugleich im Nukleus lokalisiert und interagiert dabei, u.a. mit SAFB (Scaffold Attachment Factor B), C/EBP, sowie den AP-1-Transkriptionsfaktoren FOS und JUN (A. Traweger, R. Fuchs et al. 2003, M. S. Balda and K. Matter 2009). Weitere Studien belegen, dass eine Überexpression von ZO-2, eine Abnahme der Transkriptionsaktivität von AP-1 zur Folge hat. ZO-2 bindet dabei primär mit seiner C-terminalen Domäne an den AP-1 Komplex (A. Betanzos, M. Huerta et al. 2004). Die Bindung von LASP1 an ZO-2 erfolgt ebenfalls über eine C-terminale Assoziation an Prolin 1106 unter Bildung eines stabilen, heterodimeren Komplexes (S. Mihlan, C. Reiss et al. 2013). Dementsprechend ist die C-terminale Domäne von ZO-2 durch LASP1 besetzt. Dies suggeriert eine LASP1-induzierte Abnahme des hemmenden Effektes von ZO-2 auf die AP-1-Transkriptionsfaktoren FOS und JUN zugunsten einer gesteigerten Genexpression der Matrix-Metalloproteasen.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit von LASP1 auf die MMP-Genexpression lässt sich anhand jüngster Untersuchungen von Duvall Noelle et al. ableiten. Die Wissenschaftler beobachteten in Brustkrebszellen, neben einer Kolo-kalisation von LASP1 mit den epigenetischen Faktoren UHRF1, DNMT2, G9a, eine direkte, LIM-Domänen-assoziierte

Bindung von LASP1 an den onkogenen Transkriptionsfaktor Snail1. (N. Duvall-Noelle, A. Karwandyar et al. 2015). Als Zinkfinger-Protein bindet Snail1 an cis-Elemente der Promotor-Region von E-Cadherin, insbesondere an die „E-box“ (A. Villarejo, A. Cortes-Cabrera et al. 2013). Eine darauffolgende Unterdrückung der Genexpression fördert die Epithelial-mesenchymale-Transition. Snail1 amplifiziert zudem die Genexpression diverser Matrix-Metalloproteasen (z.B. MMP1, -7 und -14) nachweislich, sowohl in HepG2 (Human Liver Carcinoma), als auch in HCC (Hepatocellular Carcinoma) Zellen (A. Miyoshi, Y. Kitajima et al. 2004). Dies begünstigt wiederum Migration, Invasion und Tumorprogression (A. Barrallo-Gimeno and M. A. Nieto 2005, S. Lamouille, J. Xu et al. 2014).

Das Protein ist jedoch relativ instabil (Y. Wu and B. P. Zhou 2010). Gemäß Duvall-Noelle et al. soll eine Assoziation mit LASP1 Snail1 vor einer Degradation bzw. einer evtl. Phosphorylierung schützen und somit insgesamt stabilisieren (N. Duvall-Noelle, A. Karwandyar et al. 2015).

Inwiefern Snail1 die Genexpression der Matrix-Metalloproteasen in humanen Brustkrebszellen beeinflusst bzw. inwiefern LASP1, als Stabilisator von Snail1, dahingehend involviert ist, muss zukünftig evaluiert werden.



---

## **5. AUSBLICK**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das LIM und SH3 Domänen Protein 1 (LASP1), als neues regulatorisches Gerüstprotein invadopodialer Strukturen, das die Matrixdegradationskapazität in humanen Brustkrebszellen maßgeblich beeinflusst, identifiziert werden. Die präsentierten Ergebnisse liefern erste Hinweise bzgl. des zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismus von LASP1 auf die Regulation der für die EZM-Degradation wichtigen Matrix-Metalloproteasen.

Die aufgezeigten möglichen Regulationsmechanismen von LASP1 auf die Genexpression sowie Sekretion der Matrix-Metalloproteasen sind vielfältig und komplex und daher Gegenstand weiterführender Arbeiten.

In einem ersten Schritt sollte weiterführend evaluiert werden, inwiefern LASP1 die Transkription der Matrix-Metalloproteasen, insbesondere in Hinblick seines möglichen Interaktionspartners AP-1, beeinflusst.

Zur Untersuchung einer dementsprechenden regulatorischen Interaktion von LASP1 mit AP-1 müsste ein AP-1 Reporter Assay durchgeführt werden. Der AP-1 Reporter Assay ist eine Luciferase-basierte Fluoreszenzmethode zur Detektion der Aktivität der AP-1-regulatorischen Signaltransduktion in Kulturzellen (<http://www.sabiosciences.com/Manual/1073762.pdf>). Beim Vergleich der AP-1-abhängigen Transkription zwischen stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Kontroll- und Knockdownzellen sollte im Falle einer faktischen Wechselbeziehung zwischen LASP1 und AP-1 nach LASP1 Knockdown eine Abnahme der AP-1-Promotor-Aktivität konstatiert werden.

Um ferner festzustellen, inwiefern die mögliche Interaktion zwischen LASP1 und AP-1 einer direkten oder aber indirekten Wechselbeziehung unterliegt, wären weiterhin Immunpräzipitationen mit LASP1 und c-Jun/c-Fos spezifischen Antikörpern sowie Pulldown-Assays mit „GST-tagged“ und „His-tagged-LASP1“ in stabil transfizierten MDA-MB-231<sub>sh</sub>LASP1 Zellen sinnvolle Experimente. Möglicherweise zeigt sich die in vielen Arbeiten spekulativ diskutierte nukleäre Funktion von LASP1 als transkriptioneller Kofaktor.

---

## **6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY**

### **DEUTSCH**

Migration und Tumorzellinvasion erfordern die vorhergehende Degradation der umliegenden Extrazellulärmatrix (EZM). Dieser Umbauprozess erfolgt primär durch proteolytische Endopeptidasen, sog. Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Damit diese ihre funktionelle Aktivität ausüben können, müssen sie zunächst rekrutiert und mit Hilfe podosomaler bzw. invadopodialer Strukturen in die EZM sezerniert werden.

Das LIM und SH3 Domänen Protein 1 (LASP1), ein neu in Podosomen von Makrophagen identifiziertes regulatorisches Gerüstprotein, beeinflusst, neben Größe, Anzahl und Beständigkeit von Podosomen, in hohem Maße die Matrixdegradationskapazität der Zelle.

Auch in invasiven Brustkrebszellen wurde eine Lokalisation von LASP1 an Invadopodien, den Podosomen-äquivalenten Strukturen, detektiert.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die funktionelle Charakterisierung von LASP1 in Invadopodien. Unter Etablierung eines Matrix-Degradations-Assays konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulation von LASP1 auch in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, die zuvor schon für Makrophagen gezeigte Matrixdegradation nachhaltig beeinträchtigt.

Durch Analyse und Verifikation von zugänglichen Mikroarraydaten mittels qRT-PCR und Western Blot konnte ferner belegt werden, dass LASP1 in den Brustkrebszellen die Genexpression und Proteintranslation von MMP1, -3 und -9 positiv moduliert und somit das gesamt-invasive Potential der Zelle steigert. Darüber hinaus deuten Zymogramme und die Analyse des konditionierten Mediums darauf hin, dass LASP1 als Strukturprotein die vesikuläre Sekretion der inaktiven Zymogene (proMMPs) in die EZM fördert. Demzufolge modifiziert LASP1 während der Krebsprogression die zelluläre Mikroumgebung zugunsten einer erhöhten Metastasierungsrate.

Die neu identifizierte regulatorische Funktion von LASP1 auf die Transkription sowie Sekretion von Matrix-Metalloproteasen erklärt die in früheren Arbeiten beobachtete Korrelation zwischen einer erhöhten LASP1 Konzentration im Gewebe und dem vermehrten Auftreten von Metastasen, und damit einhergehend, schlechteren Überleben der Patientinnen.

**6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY****ENGLISCH**

The process of migration and tumor invasion requires the degradation of the surrounding extracellular matrix by proteolytic endopeptidases, called matrix-metalloproteases (MMPs). Therefore, cells form protrusive invadopodia or podosomes that recruit and secrete MMPs to degrade the basement membrane.

The LIM and SH3 protein 1 (LASP1) was recently identified as a new scaffolding protein in podosomes of macrophages. Knockdown of LASP1 affected size, number and lifetime of the podosomes and moreover, inhibited matrix degradation capacity.

The main objective of the presented dissertation was to characterize the function of LASP1 in invadopodia of cancer cells. By establishing a matrix-degradation-assay, we demonstrated that down-regulation of LASP1 impaired matrix-degradation in MDA-MB-231 breast cancer cells, an effect earlier observed in macrophages.

By analyzing and verifying accessible microarray data sets we observed regulation of MMPs by LASP1. qRT-PCR and Western Blot experiments confirmed that LASP1 positively modulates gene expression and translation of MMP1, -3 and -9, and thereof enhances cellular invasion. Furthermore, zymography and analysis of the conditioned medium revealed cytosolic LASP1 promotion of MMP vesicle secretion into the extracellular matrix, thus altering the microenvironment during cancer progression.

In summary, the newly identified role of LASP1 in regulating matrix degradation by affecting MMP transcription and secretion elucidated the migratory potential observed in former studies that described upregulation of LASP1 in metastatic cancer cells.

---

**7. LITERATURVERZEICHNIS**

- A., Mironov and M. Pavelka (2008). "The Golgi Apparatus." Springer-Verlag **2008**(1): 1-716.
- Alabi, A. A. and R. W. Tsien (2013). "Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission." Annu Rev Physiol **75**: 393-422.
- Anantharam, A., M. A. Bittner, et al. (2011). "A new role for the dynamin GTPase in the regulation of fusion pore expansion." Mol Biol Cell **22**(11): 1907-1918.
- Antonny, B. (2004). "SNARE filtering by dynamin." Cell **119**(5): 581-582.
- Aranda, P. S., D. M. Lajoie, et al. (2012). "Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality." Electrophoresis **33**(2): 366-369.
- Artym, V. V., K. M. Yamada, et al. (2009). "ECM degradation assays for analyzing local cell invasion." Methods Mol Biol **522**: 211-219.
- Bachmeier, B. E., A. G. Nerlich, et al. (2001). "Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity." Anticancer Res **21**(6a): 3821-3828.
- Balda, M. S. and K. Matter (2009). "Tight junctions and the regulation of gene expression." Biochim Biophys Acta **1788**(4): 761-767.
- Baldassarre, M., A. Pompeo, et al. (2003). "Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells." Mol Biol Cell **14**(3): 1074-1084.
- Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." Development **132**(14): 3151-3161.
- Barylko, B., D. Binns, et al. (1998). "Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides." J Biol Chem **273**(6): 3791-3797.
- Basuyaux, J. P., E. Ferreira, et al. (1997). "The Ets transcription factors interact with each other and with the c-Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and -independent manner." J Biol Chem **272**(42): 26188-26195.
- Benbow, U. and C. E. Brinckerhoff (1997). "The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?" Matrix Biol **15**(8-9): 519-526.

- Betanzos, A., M. Huerta, et al. (2004). "The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells." Exp Cell Res **292**(1): 51-66.
- Bhuwania, R., S. Cornfine, et al. (2012). "Supervillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover." J Cell Sci **125**(Pt 9): 2300-2314.
- Bieche, I., C. Tomasetto, et al. (1996). "Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer." Cancer Res **56**(17): 3886-3890.
- Booth, Christine S., Elsje Pienaar, et al. (2010). "Efficiency of the polymerase chain reaction." Chemical Engineering Science **65**(17): 4996-5006.
- Bravo-Cordero, J. J., R. Marrero-Diaz, et al. (2007). "MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel Rab8-dependent exocytic pathway." Embo j **26**(6): 1499-1510.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.
- 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.
- Cao, H., H. M. Thompson, et al. (2000). "Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin." J Cell Sci **113 ( Pt 11)**: 1993-2002.
- Chaki, S. P. and G. M. Rivera (2013). "Integration of signaling and cytoskeletal remodeling by Nck in directional cell migration." Bioarchitecture **3**(3): 57-63.
- Chakraborti, S., M. Mandal, et al. (2003). "Regulation of matrix metalloproteinases: an overview." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 269-285.
- Chazotte, B. (2011). "Labeling nuclear DNA using DAPI." Cold Spring Harb Protoc **2011**(1): pdb.prot5556.
- Chen, W. T. (1989). "Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells." J Exp Zool **251**(2): 167-185.

- 
- Chew, C. S., X. Chen, et al. (2008). "Targeted disruption of the Lasp-1 gene is linked to increases in histamine-stimulated gastric HCl secretion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(1): G37-g44.
- Chew, C. S., X. Chen, 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." J Cell Sci **115**(Pt 24): 4787-4799.
- Chuang, L. Y., Y. H. Cheng, et al. (2013). "Specific primer design for the polymerase chain reaction." Biotechnol Lett **35**(10): 1541-1549.
- David-Pfeuty, T. and S. J. Singer (1980). "Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus." Proceedings of the National Academy of Sciences **77**(11): 6687-6691.
- Dawid, I. B., J. J. Breen, et al. (1998). "LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions." Trends Genet **14**(4): 156-162.
- Diefenbacher, M. E., D. Reich, et al. (2014). "The LIM domain protein nTRIP6 recruits the mediator complex to AP-1-regulated promoters." PLoS One **9**(5): e97549.
- Duvall-Noelle, N., A. Karwandyar, et al. (2015). "LASP-1: a nuclear hub for the UHRF1-DNMT1-G9a-Snail1 complex." Oncogene.
- Eferl, R. and E. F. Wagner (2003). "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **3**(11): 859-868.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-174.
- Fanjul-Fernandez, M., A. R. Folgueras, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models." Biochim Biophys Acta **1803**(1): 3-19.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat Rev Cancer **3**(6): 453-458.
- Firestein, G., R. Budd, et al. (2012). "Kelly's Textbook of Rheumatologie." Elsevier **2**(9): 109.

- Frietsch, J. J., T. G. Grunewald, et al. (2010). "Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long-term survival in female breast cancer." Br J Cancer **102**(11): 1645-1653.
- Garamszegi, N., S. P. Garamszegi, et al. (2012). "Matrix metalloproteinase-1 contribution to sarcoma cell invasion." J Cell Mol Med **16**(6): 1331-1341.
- Gialeli, C., A. D. Theocharis, et al. (2011). "Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting." Febs j **278**(1): 16-27.
- Gimona, M., R. Buccione, et al. (2008). "Assembly and biological role of podosomes and invadopodia." Curr Opin Cell Biol **20**(2): 235-241.
- Glasel, J. A. (1995). "Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios." Biotechniques **18**(1): 62-63.
- Gressner, A. and T. Arndt (2013). "Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik." Springer-Verlag **2**: 922-923.
- Grunewald, T. G. and E. Butt (2008). "The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both?" Mol Cancer **7**: 31.
- Grunewald, T. G., U. Kammerer, et al. (2007). "Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma." BMC Cancer **7**: 198.
- Grunewald, T. G., U. Kammerer, et al. (2007). "Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation." Br J Cancer **96**(2): 296-305.
- Grunewald, T. G., S. M. Pasedag, et al. (2009). "Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Protooncogene LPP." Transl Oncol **2**(3): 107-116.
- Guo, Y., P. Xiao, et al. (2008). "How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(5): 426-436.
- Haberland, J. and U. Wolf (2015). "Trendanalysen zur Inzidenz und Mortalität an Krebs in Deutschland seit 1970 " GMS Med Inform Biom Epidemiol **11**(1): 10.
- Hernandez-Barrantes, S., M. Bernardo, et al. (2002). "Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases." Semin Cancer Biol **12**(2): 131-138.



- Hess, J., P. Angel, et al. (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." J Cell Sci **117**(Pt 25): 5965-5973.
- Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). "Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." Nature **374**(6518): 190-192.
- Hiratsuka, S., K. Nakamura, et al. (2002). "MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis." Cancer Cell **2**(4): 289-300.
- Holzappel, Bianca and Lucia Wickert (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete." Biologie in unserer Zeit **37**(2): 120-126.
- Howlander, N., AM. Noone, et al. (2012). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)." National Cancer Institute **1**(1): 107.
- Hu, X. and C. Beeton (2010). "Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography." J Vis Exp(45).
- Itoh, M., K. Morita, et al. (1999). "Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin." J Biol Chem **274**(9): 5981-5986.
- Itoh, Y., A. Takamura, et al. (2001). "Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion." Embo j **20**(17): 4782-4793.
- Itoh, Yoshifumi (2015). "Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations." Matrix Biology **44-46**: 207-223.
- Iwatsuki, M., K. Mimori, et al. (2010). "Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance." Cancer Sci **101**(2): 293-299.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, et al. (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." Nat Biotechnol **21**(6): 635-637.
- Jacob, A., J. Jing, et al. (2013). "Rab40b regulates trafficking of MMP2 and MMP9 during invadopodia formation and invasion of breast cancer cells." J Cell Sci **126**(Pt 20): 4647-4658.
- Jaiswal, J. K., V. M. Rivera, et al. (2009). "Exocytosis of post-Golgi vesicles is regulated by components of the endocytic machinery." Cell **137**(7): 1308-1319.

- Jeziarska, A. and T. Motyl (2009). "Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review." Med Sci Monit **15**(2): Ra32-40.
- Kaatsch, P., C. Spix, et al. (2013). "Krebs in Deutschland 2009/2010: Häufigkeiten und Trends." Robert Koch-Institut **9**: 68-71.
- Keicher, C., S. Gambaryan, et al. (2004). "Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **324**(1): 308-316.
- Kessenbrock, K., V. Plaks, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." Cell **141**(1): 52-67.
- Kohrmann, Andrea, Ulrike Kammerer, et al. (2009). "Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature." BMC Cancer **9**(1): 188.
- Kotb, A. M., A. Hierholzer, et al. (2011). "Replacement of E-cadherin by N-cadherin in the mammary gland leads to fibrocystic changes and tumor formation." Breast Cancer Res **13**(5): R104.
- Kumar, D., A. Ray, et al. (2009). "Transcriptional synergy mediated by SAF-1 and AP-1: critical role of N-terminal polyalanine and two zinc finger domains of SAF-1." J Biol Chem **284**(3): 1853-1862.
- Kunze, U. (2011). "Mammakarzinom: Epidemiologie und Risikofaktoren." J Gastroenterol Hepatol **9**(2): 38-40.
- Kupai, K. (2011). "Zymography." Molecular Biology, University of Szeged **1**(1): 1-29.
- Lamouille, S., J. Xu, et al. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 178-196.
- Larionov, A., A. Krause, et al. (2005). "A standard curve based method for relative real time PCR data processing." BMC Bioinformatics **6**: 62.
- Lauzier, A., M. Charbonneau, et al. (2011). "Formation of invadopodia-like structures by synovial cells promotes cartilage breakdown in collagen-induced arthritis: involvement of the protein tyrosine kinase Src." Arthritis Rheum **63**(6): 1591-1602.

- 
- Lee, Y. R., E. M. Noh, et al. (2013). "Sulforaphane controls TPA-induced MMP-9 expression through the NF-kappaB signaling pathway, but not AP-1, in MCF-7 breast cancer cells." BMB Rep **46**(4): 201-206.
- Lehti, K., J. Lohi, et al. (2002). "Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase." J Biol Chem **277**(10): 8440-8448.
- 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, D. M. and Y. M. Feng (2011). "Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets." Breast Cancer Res Treat **128**(1): 7-21.
- Lin, Y. H., Z. Y. Park, et al. (2004). "Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1." J Cell Biol **165**(3): 421-432.
- Linder, S. (2007). "The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation." Trends Cell Biol **17**(3): 107-117.
- Linder, S. (2009). "Invadosomes at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 17): 3009-3013.
- Linder, S. and C. Wiesner (2015). "Tools of the trade: podosomes as multipurpose organelles of monocytic cells." Cell Mol Life Sci **72**(1): 121-135.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Mader, C. C., M. Oser, et al. (2011). "An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion." Cancer Res **71**(5): 1730-1741.
- Magalhaes, M. A., D. R. Larson, et al. (2011). "Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway." J Cell Biol **195**(5): 903-920.
- Maier, O., M. Knoblich, et al. (1996). "Dynamin II binds to the trans-Golgi network." Biochem Biophys Res Commun **223**(2): 229-233.

- 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." Eur J Cancer **40**(18): 2717-2725.
- Matsushita, N., S. Matsushita, et al. (2013). "Doxycycline-dependent inducible and reversible RNA interference mediated by a single lentivirus vector." Biosci Biotechnol Biochem **77**(4): 776-781.
- McSherry, E. A., S. Donatello, et al. (2007). "Molecular basis of invasion in breast cancer." Cell Mol Life Sci **64**(24): 3201-3218.
- Mego, M., S. A. Mani, et al. (2010). "Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications." Nat Rev Clin Oncol **7**(12): 693-701.
- Mehlen, P. and A. Puisieux (2006). "Metastasis: a question of life or death." Nat Rev Cancer **6**(6): 449-458.
- Meierjohann, S., A. Hufnagel, et al. (2010). "MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation." Mol Cancer **9**: 201.
- Mersich, A. T., M. R. Miller, et al. (2010). "The formin FRL1 (FMNL1) is an essential component of macrophage podosomes." Cytoskeleton (Hoboken) **67**(9): 573-585.
- Mihlan, S., C. Reiss, et al. (2013). "Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions." Oncogene **32**(16): 2107-2113.
- Miyoshi, A., Y. Kitajima, et al. (2004). "Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells." Br J Cancer **90**(6): 1265-1273.
- Murphy, D. A. and S. A. Courtneidge (2011). "The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(7): 413-426.
- Nagase, H., R. Visse, et al. (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovasc Res **69**(3): 562-573.

- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-21494.
- Naughton, B. J., D. D. Han, et al. (2011). "Fluorescence-based evaluation of shRNA efficacy." Anal Biochem **417**(1): 162-164.
- Nazar, R. N., P. Chen, et al. (2010). "DNA chip analysis in diverse organisms with unsequenced genomes." Mol Biotechnol **44**(1): 8-13.
- Nishikawa, R., Y. Goto, et al. (2014). "Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting of LASP1 in prostate cancer." Cancer Sci **105**(7): 802-811.
- Orth, M. F., A. Cazes, et al. (2015). "An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1): a versatile structural, signaling, and biomarker protein." Oncotarget **6**(1): 26-42.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-233.
- Pathan, M., S. Keerthikumar, et al. (2015). "FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool." Proteomics **15**(15): 2597-2601.
- Perera, R. (2010). "Inducible Knockdown of LASP-1 in Mammary Carcinoma Cells." Fakultät für Biologie der Universität Würzburg **1**(1).
- Peters, C., T. L. Baars, et al. (2004). "Mutual control of membrane fission and fusion proteins." Cell **119**(5): 667-678.
- Piccard, Helene, Philippe E. Van den Steen, et al. (2007). "Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins." Journal of Leukocyte Biology **81**(4): 870-892.
- Polette, M., B. Nawrocki-Raby, et al. (2004). "Tumour invasion and matrix metalloproteinases." Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 179-186.
- Poste, G. and I. J. Fidler (1980). "The pathogenesis of cancer metastasis." Nature **283**(5743): 139-146.
- Psaila, B., R. N. Kaplan, et al. (2006). "Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche." Breast Dis **26**: 65-74.

- Purushothaman, A., L. Chen, et al. (2008). "Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma." J Biol Chem **283**(47): 32628-32636.
- Quintavalle, M., L. Elia, et al. (2010). "MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro." J Cell Biol **189**(1): 13-22.
- 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." PLoS One **5**(4): e10050.
- Remacle, A. G., A. Noel, et al. (1998). "Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer." Br J Cancer **77**(6): 926-931.
- Remacle, A. G., D. V. Rozanov, et al. (2006). "Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP." Oncogene **25**(41): 5648-5655.
- Remacle, A., G. Murphy, et al. (2003). "Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface." J Cell Sci **116**(Pt 19): 3905-3916.
- Ren, F., R. Tang, et al. (2015). "Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis." PLoS One **10**(8): e0135544.
- Samarasinghe, B. (2013). "Introduction to the Hallmarks of Cancer: Tissue Invasion and Metastasis." Scientific American **1**(6): 15-17.
- Sato, H., T. Takino, et al. (1994). "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells." Nature **370**(6484): 61-65.
- Schachtner, Hannah, Simon D. J. Calaminus, et al. (2013). "Podosomes in adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling." Cytoskeleton **70**(10): 572-589.
- Schmid, S. L. and V. A. Frolov (2011). "Dynammin: functional design of a membrane fission catalyst." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 79-105.

- Schnaeker, E. M., R. Ossig, et al. (2004). "Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion." Cancer Res **64**(24): 8924-8931.
- Schreiber, V., C. Moog-Lutz, et al. (1998). "Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions." Mol Med **4**(10): 675-687.
- Shimizu, Fumie, Masashi Shiiba, et al. (2013). "Overexpression of LIM and SH3 Protein 1 Leading to Accelerated G2/M Phase Transition Contributes to Enhanced Tumourigenesis in Oral Cancer." PLoS ONE **8**(12): e83187.
- Shiple, J. M., G. A. Doyle, et al. (1996). "The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats." J Biol Chem **271**(8): 4335-4341.
- Sinn, H. P. and H. Kreipe (2013). "A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition." Breast Care (Basel) **8**(2): 149-154.
- Sledz, C. A., M. Holko, et al. (2003). "Activation of the interferon system by short-interfering RNAs." Nat Cell Biol **5**(9): 834-839.
- Small, J., K. Rottner, et al. (1999). "Visualising the actin cytoskeleton." Microsc Res Tech **47**(1): 3-17.
- Snoek-van Beurden, P. A. and J. W. Von den Hoff (2005). "Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors." Biotechniques **38**(1): 73-83.
- 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." Mol Cell Biol **26**(4): 1480-1495.
- Stölting, M., C. Wiesner, et al. (2012). "Lasp-1 regulates podosome function." PLoS One **7**(4): e35340.
- Stowell, M. H., B. Marks, et al. (1999). "Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring." Nat Cell Biol **1**(1): 27-32.

- Strongin, A. Y., I. Collier, et al. (1995). "Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease." J Biol Chem **270**(10): 5331-5338.
- Sun, H. J., Y. Y. Bahk, et al. (2006). "A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell." J Orthop Res **24**(11): 2059-2071.
- Tang, R., F. Kong, et al. (2012). "Role of hepatitis B virus X protein in regulating LIM and SH3 protein 1 (LASP-1) expression to mediate proliferation and migration of hepatoma cells." Virology **9**: 163.
- Tarone, G., D. Cirillo, et al. (1985). "Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes." Exp Cell Res **159**(1): 141-157.
- 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." FEBS Lett **373**(3): 245-249.
- Toth, M., D. C. Gervasi, et al. (1997). "Phorbol ester-induced cell surface association of matrix metalloproteinase-9 in human MCF10A breast epithelial cells." Cancer Res **57**(15): 3159-3167.
- Traenka, C., M. Remke, et al. (2010). "Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma." Cancer Res **70**(20): 8003-8014.
- Traenka, J., C. R. Hauck, 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." Thromb Haemost **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." Journal of Biological Chemistry **278**(4): 2692-2700.
- Trouillon, R. and A. G. Ewing (2014). "Actin Controls the Vesicular Fraction of Dopamine." J Biol Chem **289**(3): 812-820.



- 
- Trouillon, Raphaël and Andrew G. Ewing (2013). "Amperometric Measurements at Cells Support a Role for Dynamin in the Dilation of the Fusion Pore during Exocytosis." ChemPhysChem **14**(10): 2295-2301.
- Vaman, V. S. A. (2015). "LASP1, a newly identified melanocytic protein with a possible role in melanin release, but not in melanoma progression." Institute of Biomedicine, University of Würzburg **1**(1): 3.
- Vaman, V. S. A., H. Poppe, et al. (2015). "LASP1, a Newly Identified Melanocytic Protein with a Possible Role in Melanin Release, but Not in Melanoma Progression." PLoS One **10**(6): e0129219.
- Varon, C., F. Tatin, et al. (2006). "Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells." Mol Cell Biol **26**(9): 3582-3594.
- Vesely, P. W., P. B. Staber, et al. (2009). "Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins." Mutat Res **682**(1): 7-12.
- Villarejo, A., A. Cortes-Cabrera, et al. (2013). "Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and Epithelial to Mesenchymal Transition." Journal of Biological Chemistry.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.
- Walker, J. M. (1994). "The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation." Methods Mol Biol **32**: 5-8.
- Wang, H., H. An, et al. (2013). "miR-133a represses tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting LIM and SH3 protein 1 and inhibiting the MAPK pathway." Eur J Cancer **49**(18): 3924-3935.
- Wang, H., J. Shi, et al. (2014). "LIM and SH3 protein 1 induces TGFbeta-mediated epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer by regulating S100A4 expression." Clin Cancer Res **20**(22): 5835-5847.
- Weigelt, B., J. L. Peterse, et al. (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." Nat Rev Cancer **5**(8): 591-602.

- Wendt, M. K., M. A. Taylor, et al. (2011). "Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer." Mol Biol Cell **22**(14): 2423-2435.
- Wilhelm, S. M., D. Wunderlich, et al. (1992). "Primary structure and function of stromelysin/transin in cartilage matrix turnover." Matrix Suppl **1**: 37-44.
- Woessner, J. F., Jr. (2002). "MMPs and TIMPs--an historical perspective." Mol Biotechnol **22**(1): 33-49.
- Wu, Y. and B. P. Zhou (2010). "Snail: More than EMT." Cell Adh Migr **4**(2): 199-203.
- Yamaguchi, H., M. Lorenz, et al. (2005). "Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin." J Cell Biol **168**(3): 441-452.
- Yamaguchi, H. and T. Oikawa (2010). "Membrane lipids in invadopodia and podosomes: Key structures for cancer invasion and metastasis." Oncotarget **1**(5): 320-328.
- Yana, I. and S. J. Weiss (2000). "Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases." Mol Biol Cell **11**(7): 2387-2401.
- Yilmaz, M. and G. Christofori (2009). "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 15-33.
- Zamboni-Zallone, A., A. Teti, et al. (1989). "Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells." Exp Cell Res **182**(2): 645-652.
- Zeng, Z. S., A. M. Cohen, et al. (1999). "Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis." Carcinogenesis **20**(5): 749-755.
- Zucker, S. and W.-T. Chen (2003). "Cell Surface Proteases." Academic Press **54**(1): 2-3.

**8. ANHANG DER MIKROARRAYDATEN**

1	RefSeq Transcript ID	Gene Title	Gene Symbol	fold change	logFC
2	NM_006148	LIM and SH3 protein 1	LASP1	5,405	-2,434
3	NM_006148	LIM and SH3 protein 1	LASP1	1,714	-0,778
4	NM_003118 /// XR_110317 /// XR_110318	uncharacterized LOC100505813 /// secreted protein, putative	LOC100505813 /// SPARC	1,446	0,532
5	NM_003641	interferon induced transmembrane protein 1	IFITM1	1,662	0,733
6	NM_003641	interferon induced transmembrane protein 1	IFITM1	1,622	0,698
7	NM_004096	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	EIF4EBP2	1,522	-0,606
8	NM_001143818 /// NM_002575	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	SERPINB2	1,451	-0,537
9	NM_004753	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	DHRS3	1,459	0,545
10	NM_001206	Kruppel-like factor 9	KLF9	1,602	0,680
11	NM_001005753 /// NM_001193511	charged multivesicular body protein 3 /// RNF103-CHMP3	CHMP3 /// RNF103-CHMP3	1,416	-0,502
12	NM_002999	syndecan 4	SDC4	1,423	-0,509
13	NM_002999	syndecan 4	SDC4	1,432	-0,518
14	NM_000108	dihydroliipoamide dehydrogenase	DLD	1,420	-0,506
15	NM_015022 /// NM_178140	PDZ domain containing 2	PDZD2	1,529	-0,613
16	NM_015022 /// NM_178140	PDZ domain containing 2	PDZD2	1,529	-0,612
17	NM_020772	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1	NUFIP2	1,455	-0,541
18	NM_001100422 /// NM_001100423	spermatogenesis associated, serine-rich 2-like	SPATS2L	1,473	-0,559
19	NM_001204961 /// NM_001204962	pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	1,470	0,556
20	NM_004120	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	GBP2	1,599	0,678
21	NM_001145353 /// NM_172373	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	ELF1	1,491	-0,577
22	NM_001145033	chromosome 11 open reading frame 96	C11orf96	1,556	0,638
23	NM_001001342 /// NM_173809 /// NM_173810	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit 2	BLOC1S2	1,923	-0,944
24	NM_003469	secretogranin II	SCG2	1,464	0,550
25	NM_000962 /// NM_080591	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin synthase 1)	PTGS1	1,431	-0,517
26	NM_001114086 /// NM_001256023	chloride intracellular channel 5	CLIC5	1,536	-0,619
27	NM_001145306 /// NM_001259	cyclin-dependent kinase 6	CDK6	1,564	-0,646
28	NM_001145306 /// NM_001259	cyclin-dependent kinase 6	CDK6	1,643	-0,717
29	NM_001145306 /// NM_001259	cyclin-dependent kinase 6	CDK6	1,460	-0,546
30	NM_002422	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	MMP3	1,770	-0,824
31	NM_006379	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic type	SEMA3C	1,530	-0,614
32	NM_017633	family with sequence similarity 46, member A	FAM46A	1,506	0,591
33	NM_017633	family with sequence similarity 46, member A	FAM46A	1,441	0,527
34	NM_001037339 /// NM_001037340	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific	PDE4B	1,456	0,542
35	NM_001144994	chromosome 2 open reading frame 72	C2orf72	1,440	0,526
36	NM_005178	B-cell CLL/lymphoma 3	BCL3	1,691	0,758
37	NM_133367	progesterin and adipoQ receptor family member VIII	PAQR8	1,551	0,633
38	NM_006186 /// NM_173171 /// NM_173172	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	1,466	0,551
39	NM_006186 /// NM_173171 /// NM_173172	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	1,650	0,723
40	NM_001079528 /// NM_001171 /// NM_001172	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	ABCC6 /// ABCC6P2	1,537	0,620
41	NM_152778	major facilitator superfamily domain containing 8	MFSD8	1,423	-0,509
42	NM_152778	major facilitator superfamily domain containing 8	MFSD8	1,601	-0,679
43	NM_003116	sperm associated antigen 4	SPAG4	1,505	0,590

ANHANG DER MIKROARRAYDATEN

44	NM_000641 /// NM_001267718	interleukin 11	IL11	1,460	-0,546
45	NM_020632 /// NM_130840 /// NM	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a4	ATP6V0A4	1,471	-0,557
46	NM_003417	zinc finger protein 264	ZNF264	1,440	-0,526
47	NM_001085377 /// NM_002387	mutated in colorectal cancers	MCC	1,529	-0,613
48	NM_032119 /// NR_003149	G protein-coupled receptor 98	GPR98	1,470	-0,555
49	NM_007207 /// NM_144728 /// NM	dual specificity phosphatase 10	DUSP10	1,427	0,513
50	NM_145176	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter)	SLC2A12	1,628	0,703
51	NM_001080396	family with sequence similarity 155, member A	FAM155A	1,575	-0,656
52	NM_001013258 /// NM_213603	zinc finger protein 789	ZNF789	1,444	0,530
53	NM_001631	alkaline phosphatase, intestinal	ALPI	1,419	-0,505
54	NM_144690	zinc finger protein 582	ZNF582	1,529	-0,613
55	NM_057176	Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafn	BSND	1,454	-0,540
56	NM_001080471 /// NM_207369	platelet endothelial aggregation receptor 1	PEAR1	1,519	-0,603
57	NM_001008539 /// NM_00116477	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporte	SLC7A2	1,445	-0,531
58	NM_004866 /// NM_052822	secretory carrier membrane protein 1	SCAMP1	1,425	0,511
59	NM_014005 /// NM_018898 /// NM	protocadherin alpha 1 /// protocadherin alpha 10 /// p	PCDHA1 /// PCDHA10 /// PCDHA	1,489	0,575
60	NM_018420	solute carrier family 22, member 15	SLC22A15	1,546	-0,629
61	NM_006092	nucleotide-binding oligomerization domain containin	NOD1	1,419	0,504
62	NM_005252	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	1,601	0,679
63	NM_031936	G protein-coupled receptor 61	GPR61	1,454	-0,540
64	NM_180989	G protein-coupled receptor 180	GPR180	2,116	-1,081
65	NM_001135044 /// NM_002752 ///	mitogen-activated protein kinase 9	MAPK9	1,430	-0,516
66	NM_001160183 /// NM_006524 ///	zinc finger protein 138	ZNF138	1,441	-0,527
67	NM_014471	serine peptidase inhibitor, Kazal type 4	SPINK4	1,432	0,518
68	NM_001145938 /// NM_002421	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	1,584	-0,663
69	NM_001130144 /// NM_00116426	latent transforming growth factor beta binding protei	LTBP3	1,449	0,535
70	NM_001256113 /// NM_175075	chromosome 8 open reading frame 42	C8orf42	1,416	-0,502
71	NM_007124	utrophin	UTRN	1,451	-0,537
72	NM_174921	chromosome 4 open reading frame 34	C4orf34	1,481	0,567
73	NM_016020	transcription factor B1, mitochondrial	TFB1M	2,359	-1,238
74	NR_002612 /// NR_002771	deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding	DLEU2 /// DLEU2L	1,434	-0,520
75	NM_006169	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	1,457	0,543
76	NM_021038 /// NM_207292 /// NM	muscleblind-like splicing regulator 1	MBNL1	1,509	-0,594
77	NM_002926 /// NM_198227 /// NM	regulator of G-protein signaling 12	RGS12	1,465	-0,551
78	NM_017633	family with sequence similarity 46, member A	FAM46A	1,415	0,500
79	NM_152778	major facilitator superfamily domain containing 8	MFSD8	1,423	-0,509
80	NM_005165	aldolase C, fructose-bisphosphate	ALDOC	1,618	0,694
81	NM_006186 /// NM_173171 /// NM	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	1,491	0,577
82	NM_014178	syntaxin binding protein 6 (amisyn)	STXBP6	1,425	-0,511
83	NM_001198978 /// NM_00119897	small ArfGAP2	SMAP2	1,419	-0,505
84	NM_004585	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced)	RARRES3	1,415	0,500
85	NM_006813	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	PNRC1	1,485	0,571
86	NM_005252	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	1,615	0,691
87	NM_001006610 /// NM_003031	siah E3 ubiquitin protein ligase 1	SIAH1	1,473	-0,559
88	NM_005252	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	1,559	0,641

ANHANG DER MIKROARRAYDATEN

89	NM_032290	ankyrin repeat domain 32	ANKRD32	1,424	-0,510
90	NM_001160130 /// NM_001160130	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily,	KCNQ5	1,481	-0,566
91	NM_001848	collagen, type VI, alpha 1	COL6A1	1,448	0,534
92	NM_001160183 /// NM_006524 ///	zinc finger protein 138	ZNF138	1,562	-0,644
93	NM_013231 /// XR_110230 /// XR_	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2 ///	FLRT2 /// LOC100506718	1,433	-0,519
94	NM_005195	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	1,442	0,528
95	NM_001267706 /// NM_014143 ///	CD274 molecule	CD274	1,443	-0,529
96	NM_004878 /// NM_198797	prostaglandin E synthase	PTGES	1,519	0,603
97	NM_001126336 /// NM_00116409	versican	VCAN	1,508	-0,593
98	NM_001785	cytidine deaminase	CDA	1,463	-0,549
99	NM_001030272 /// NM_00103027	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	ARNTL	1,473	-0,559
100	NM_020747	zinc finger protein 608	ZNF608	1,454	0,540
101	NM_001145938 /// NM_002421	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	1,682	-0,750
102	NM_001029964	tubulin tyrosine ligase-like family, member 13	TTLL13	1,458	-0,544
103	NM_021038 /// NM_207292 /// NM	muscleblind-like splicing regulator 1	MBNL1	1,579	-0,659
104	NM_001159	aldehyde oxidase 1	AOX1	1,463	-0,549
105	NM_005768	lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	LPCAT3	1,436	0,522
106	NM_000640	interleukin 13 receptor, alpha 2	IL13RA2	1,424	-0,510
107	NM_001184906 /// NM_032875	F-box and leucine-rich repeat protein 20	FBXL20	1,475	0,560
108	NM_017644	kelch-like 24 (Drosophila)	KLHL24	1,415	0,501
109	NM_001001342 /// NM_173809 ///	biogenesis of lysosomal organelles complex-1, subunit	BLOC1S2	1,772	-0,826
110	NM_006148	LIM and SH3 protein 1	LASP1	4,233	-2,082
111	NM_014033	methyltransferase like 7A	METTL7A	1,696	0,762
112	NM_001204961 /// NM_00120496	pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	1,722	0,784
113	NM_018945	phosphodiesterase 7B	PDE7B	1,690	0,757
114	NM_001204961 /// NM_00120496	pre-B-cell leukemia homeobox 1	PBX1	1,473	0,559
115	NM_001013629 /// NM_00109884	transmembrane protein 236	TMEM236	1,537	-0,620
116	NM_001199852 /// NM_00119985	adenylate kinase 3	AK3	1,428	-0,514
117	NM_017633	family with sequence similarity 46, member A	FAM46A	1,483	0,568
118	NM_198275	myelin protein zero-like 3	MPZL3	1,474	-0,560
119	NM_001990 /// NM_172098	eyes absent homolog 3 (Drosophila)	EYA3	1,529	-0,613
120	NM_030798 /// XM_001721571 ///	uncharacterized LOC100505669 /// RCC1-like G exchar	LOC100505669 /// LOC653375 //	1,426	-0,512
121	NM_001170585 /// NM_153021	phospholipase B1	PLB1	1,452	0,538
122	NM_001199260 /// NM_022347 ///	torsin A interacting protein 2	TOR1AIP2	1,468	-0,554
123	NM_000088	collagen, type I, alpha 1	COL1A1	1,430	0,516
124	NM_001007098 /// NM_00100709	sterol carrier protein 2	SCP2	1,549	0,631
125	NM_003273	transmembrane 7 superfamily member 2	TM7SF2	1,427	0,513
126	NR_002612	deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding	DLEU2	1,462	-0,548
127	NM_001167911 /// NM_00116791	ventricular zone expressed PH domain homolog 1 (zebrin	VEPH1	1,448	-0,534
128					
129					

**DANKSAGUNG**

*Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Elke Butt bedanken. Im Rahmen eines Forschungsjahres am Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg ermöglichte sie mir die vorliegende Dissertation zu erarbeiten und zu verfassen. Wissenschaftliche Sachverhalten und Problematiken konnten im Konsil eruiert und gelöst werden.*

*Mein Dank gilt ferner den MTAs Petra Thalheimer, Petra Hönig-Liedl und Micheala Kapp. Mit ihrer Unterstützung lernte ich diverse Labortechnische Methoden kennen, die mir halfen zentrale Fragestellungen der dargereichten Arbeit zu ergründen.*

*An dieser Stelle sei euch Herr Dr. Daniel Jahn aus der Hepatologie des Universitätsklinikums Würzburg, Frau Prof. Dr. Kämmerer aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg sowie Frau Dr. Susanne Kneitz, aus dem Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Universität Würzburg besonderer Dank zu bekunden.*

*Des Weiteren sei der Institutsleitung des IKBZs der Universität Würzburg, Frau Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen, und allen namentlich nicht genannten Mitarbeitern für ihre administrative Unterstützung zu danken.*

*Besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihr stetiger, permanenter Rückhalt ermöglichte mir diese wissenschaftliche Arbeit zu realisieren.*

**LEBENS LAUF**

**Pesönliche Daten**

Name: Endres, Marcel  
Geburtsdatum/-ort: 29.09.1989 in Würzburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

**Universitärer Werdegang**

12/2015 – 01/2016 Bearbeitung der vorliegenden Doktorarbeit am IKBZ und Teilnahme am Exzellenzprogramm für med. Doktoranden an der GSLS, Würzburg  
Stipendium der Medizinischen Universität Würzburg  
Promotionskomitée  
1. Betreuer Prof. Dr. Butt, IKBZ, UKW Würzburg  
2. Betreuer Prof. Dr. Kämmerer, Frauenklinik, UKW Würzburg  
3. Betreuer Prof. Dr. Eigenthaler, ZMK/KFO, UKW Würzburg  
10/2009 – 11/2014 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Abschluss: Zahnmedizinisches Staatsexamen

**Schulischer Werdegang**

09/2007 – 06/2009 Gymnasium Marktbreit in Marktbreit  
Abschluss: allg. Hochschulreife  
09/2006 – 07/2007 Lycée Privé Germain in Coutances, Frankreich  
Abschluss: Épreuve de français (Bac général)  
09/2000 – 07/2006 Gymnasium Marktbreit in Marktbreit  
09/1996 – 07/2000 Grundschule in Gaukönigshofen

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

**AFFIDAVIT**

I hereby confirm that my thesis entitled "LASP1 regulates the gene expression as well as the secretion of matrix-metalloproteases in breast cancer cells." is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

**EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „LASP1 reguliert die Genexpression und Sekretion von Matrix-Metalloproteasen in Brustkrebszellen.“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift



