

Analyse der Modifikationen von CapG und ihre Bedeutung für die Metastasierung des Mammakarzinoms

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nicole Seier
aus Rheinberg

Düsseldorf, April 2009

Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik
Universitätsklinikum Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. D'Haese
Koreferent: Prof. Dr. W. Janni

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1	
1.1	Metastasierung maligner Tumore	1
1.2	Das Actinfilamentsystem und Actin-bindende Proteine	2
1.3	Actin und Actin-bindende Proteine im Zellkern	5
1.4	Transport Actin-bindender Proteine in den Zellkern	6
1.5	Actin-bindende Proteine und onkogene Transformation	7
1.6	Posttranslationalen Modifikation und onkogene Transformation	9
1.7	Zielsetzung	11
2. Material und Methoden	12	
2.1	RNA-Isolierung	12
2.2	Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA	12
2.3	cDNA-Synthese	12
2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.4.1	Kontrolle der cDNA-Synthese mittels β -Actin-PCR	13
2.4.2	Mutagenese	14
2.4.3	Amplifikation der CapG-Sequenz aus dem pcDNA-CapGMut-Vektor	14
2.5	Real-Time PCR	15
2.6	dHPLC-Analysen	16
2.7	Agarose-Gelelektrophorese	17
2.8	Sequenzierung	17
2.9	Klonierung	17
2.9.1	Plasmide	17
2.9.2	Bakterienstämme	18
2.9.3	Restriktion von DNA	18
2.9.4	Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors	18
2.9.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	18
2.9.6	Ligation	19
2.9.7	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	19
2.9.8	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	19
2.9.9	Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i> -Zellen	20
2.10	Zelllinien und Zellkultivierung	20
2.10.1	Zelllinien	20
2.10.2	Zellkultivierung	20

2.10.3	Subkultivierung von Monolayerkulturen	21
2.10.4	Bestimmung des Zelltiters	21
2.10.5	Kryokonservierung	21
2.11	Transiente Transfektion von pcDNA-CapGMut in T47D Zellen	21
2.12	Stabile Transfektion eines retroviralen Expressionsplasmids	22
2.13	Unterdrückung der CapG-Expression mittels siRNA	22
2.14	Invasionsassay	23
2.15	Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen	24
2.16	Subzelluläre Fraktionierung	24
2.17	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.18	Auftrennung und Nachweis von Proteinen	26
2.18.1	Proteinpräzipitation	26
2.18.2	Isoelektrische Fokussierung	26
2.18.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.18.4	Färbung von Polyacrylamidgelen	27
2.18.5	Western Blot und immunologische Detektion	27
2.18.6	Dokumentation und Auswertung	28
2.19	Aufreinigung von CapG aus menschlichen Leukozyten	29
2.19.1	Isolierung von Lymphozyten und Monozyten aus Buffy Coat	29
2.19.2	Anreicherung von CapG mittels Phenylsepharose-Chromatographie	29
2.19.3	Weitere Anreicherung von CapG durch Anionenaustauscher-Chromatographie	30
2.20	Phosphatase-Behandlung	30
2.21	ESI-MS/MS-Analysen	30
2.21.1	Tryptischer im-Gel-Verdau	30
2.21.2	Direkter tryptischer Verdau	31
2.21.3	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	31
2.22	Fluorimetrische Bestimmung der Capping-Aktivität	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Erhöhte CapG-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien	33
3.2	Invasivität von MaCa-Zelllinien korreliert mit der CapG-Expression	34
3.3	Invasive Zellen weisen hohen nucleären Anteil an CapG auf	37
3.4	Unterschiedliche CapG-Varianten im Zellkern und Cytoplasma	38
3.5	Posttranslationale Modifikation von CapG: Phosphorylierung	39
3.6	Anreicherung von CapG für die massenspektrometrische Analyse	40
3.7	Weitere Anreicherung von CapG durch MonoQ	43

3.8	Weitere posttranslationale Modifikationen von CapG	45
3.9	Ausschluss potentieller Phosphorylierungsstellen durch Mutagenese	51
3.10	N-terminale Abspaltung: eine posttranslationale Modifikation von CapG	53
3.11	Ausschluss N-terminaler Phosphorylierungsstellen	54
3.12	dHPLC zur SNP-Analyse	54
3.13	Keine unterschiedliche Capping-Eigenschaft der Arginin- und Histidin-Varianten	56
3.14	Mutagenese von CapG und die Auswirkung auf die posttranslationale Modifikation und Funktion	56
4.	Diskussion	61
5.	Zusammenfassung	82
6.	Summary	84
7.	Literatur	86
8.	Anhang	97
8.1.	Abkürzungen	97
8.2.	Plasmidkarten	100
9.	Danksagung	101
10.	Erklärung	102

1. Einleitung

1.1 Metastasierung maligner Tumore

Das Mammakarzinom ist mit etwa einer Millionen Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau [Pisani *et al.*, 1999; Parkin *et al.*, 2005].

Beim Mammakarzinom handelt es sich um eine invasive, das heißt eine in das Gewebe eindringende maligne Tumorerkrankung, die im größten Teil der Fälle aus dem Epithel hervorgeht, welches die Milchgänge der weiblichen Brustdrüse auskleidet.

Das Mammakarzinom zeigt durch seine klinisch schwer erkennbare intramammäre Infiltration und die daraus begründete oft unvollständige Entfernung des Tumors eine starke Tendenz zur Rezidivbildung. Zudem kommt es beim Mammakarzinom ziemlich früh nach der Entstehung zur Bildung von Tochtergeschwülsten den so genannten Metastasen. Liegen erstmal Fernmetastasen vor, ist nach heutigem Wissensstand eine Langzeitheilung nur in geringen Ausnahmefällen zu erreichen [Schmollich, 2006]. In ca. 90% der krebsbedingten Todesfälle sind Metastasen für den letalen Verlauf der Tumorerkrankung verantwortlich [Sporn, 1996].

Transformierte Zellen sind in der Lage sich vom Primärtumor zu entfernen, in dessen Umgebung oft Nahrungs- und Platzmangel herrscht [Fujita *et al.*, 2001], dabei vollzieht sich die Ausbreitung der invasiven Tumorzellen in mehreren Schritten. Der Verlust des Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakts ermöglicht es, dass einzelne Tumorzellen den Zellverband verlassen. Es folgt ein partieller Abbau der Basallamina durch Proteasen der Tumorzellen [Saiki, 1997; Kahari and Saarialho-Kere, 1999]. Anschließend wandern diese in die Blut- oder Lymphgefäße und können durch Extravasation (Austritt aus einem Gefäß) in fremdes Gewebe einwachsen und dort Metastasen bilden [Meyer and Hart, 1998].

Der Vorgang der Invasion und Extravasation schließt dramatische Änderungen der Zellmorphologie und eine aktive Zellbewegung ein. In den meisten Zellen ist die Fähigkeit sich zu bewegen unterdrückt, sie kann jedoch durch die onkogene Transformation zurück gewonnen werden [Mitchison and Cramer, 1996]. Dabei korreliert die Beweglichkeit einer Tumorzelle mit ihrer Fähigkeit zu metastasieren [Tullberg and Burger, 1985].

Die Migration von metastatischen Tumorzellen wird als eine amöboide Bewegung beschrieben, welche eine Formänderung einschließt [Fan and Lu, 1989]. Die Form wird bei eukaryotischen Zellen durch das Cytoskelett bestimmt. Zudem organisiert es das Cytoplasma, ermöglicht intrazelluläre Transport- und zelluläre Bewegungsvorgänge sowie die Zellteilung. Das Cytoskelett besteht aus den Actinfilamenten, den Intermediärfilamenten, dem Mikrotubulisystem sowie den damit assoziierten Proteinen. Die

Polymere dieser Systeme bestehen aus kleineren Proteinuntereinheiten, welche durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten werden. Zu den assoziierten Proteinen gehören unter anderem die Motorproteine, welche die oben genannten Vorgänge organisieren.

1.2 Das Actinfilamentsystem und Actin-bindende Proteine

In einer sich amöboid bewegenden Zelle, die ihre äußere Form und damit die Organisation ihres Cytoskeletts häufig ändert, müssen unter anderem bestehende Actinfilamente abgebaut und an anderen Stellen wieder aufgebaut werden, um eine Bewegung zu ermöglichen [Chen *et al.*, 2000]. Die Umorganisation des Actincytoskeletts erfolgt signalabhängig in einer geordneten Weise durch Actin-bindende Proteine, die mit dem Actinnetzwerk interagieren, den Polymerisationszustand modulieren und so dessen Umbau kontrollieren [Giebing *et al.*, 1994; Lauffenburger and Howitz, 1996].

Actin kann als monomeres globuläres G-Actin, oder in einer filamentösen Form, die als F-Actin bezeichnet wird, vorliegen [Holmes *et al.*, 1990]. Ein Vergleich der Actin-Sequenzen ergab, dass Actin ein sehr stark konserviertes Protein ist, vergleichbar mit Histonen [Pollard and Cooper, 1986]. Es ist das häufigste Protein in einer eukaryotischen Zelle und stellt ca. 10% des Gesamtproteins in Muskelzellen und 1-5% (0,25-1,25 mM) des gesamten zellulären Proteins in anderen Zellen dar.

Die Polymerisation von G-Actin zu F-Actin lässt sich in mehrere Schritte gliedern: der Nucleation, bei der sich langsam mehrere Actine zu einem Kern aus drei bis vier Untereinheiten zusammenlagern. Der Elongation, bei der bidirektional weitere G-Actine an das bestehende Filament angelagert werden. Dem steady-state, in dem ein Gleichgewicht zwischen neu angelagertem G-Actin und dissozierendem Actin besteht [Pollard and Cooper, 1986]. Dieser Verlauf der Polymerisation kann durch eine sigmoidale Kurve dargestellt werden, die den langsamen Beginn der Polymerisation bis zur Bildung eines Nucleus (Kern) und das anschließende schnelle Wachstum bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands zeigt [Carlier, 1991]. Unter physiologischen Salzkonzentrationen bindet monomeres Actin ATP mit einer etwas höheren Affinität als ADP [Wanger and Wegner, 1983]. Während der Polymerisation wird ATP durch Actin zu ADP hydrolysiert. ATP-G-Actin polymerisiert bevorzugt, wobei die Abgabe des anorganischen Phosphats nach der Hydrolyse zur Destabilisierung des Filaments führt und die Depolymerisation fördert [Belmont *et al.*, 1999].

Der Polymerisationsgrad, das heißt die Filamentlänge wird unter anderem durch die kritische Konzentration reguliert. Die „kritische Konzentration“ (C_c) bezeichnet die Konzentration an G-Actin, die im Gleichgewichtszustand zwischen Polymer und freien Monomeren herrscht. Die kritische Konzentration für die beiden Enden ist unterschiedlich.

Das „barbed end“, „schnell-wachsende“ oder (+)-Ende besitzt eine niedrige kritische Konzentration (C_{c+} , von $0,1 \mu\text{M}$), das „pointed end“, „langsam-wachsende“ oder (-)-Ende hat hingegen eine höhere kritische Konzentration von $0,8 \mu\text{M}$ [Wegner, 1976]. Bei einer Monomerkonzentration, die zwischen den kritischen Konzentrationen der beiden Enden liegt, erfolgt am (+)-Ende eine Netto-Polymerisation, während am langsam wachsenden Ende eine Netto-Depolymerisation stattfindet. Am (+)-Ende angelagertes monomeres Actin wandert so durch das Filament, bis es schließlich ans (-)-Ende gelangt und dort vom Filament dissoziiert. Dieser Vorgang wird als treadmilling bezeichnet [Kirschner, 1980].

Ohne Actin-bindende Proteine (ABP) läge aufgrund der hohen Konzentration an Actin-Monomeren und den hohen Salz- und ATP-Konzentrationen in der Zelle nahezu das gesamte Actin als F-Actin vor. In der Zelle ist allerdings nur etwa die Hälfte des Actins zu F-Actin polymerisiert [Stossel, 1985]. Dies ist durch die Actin-modulierenden Eigenschaften der ABP zu erklären. Diese Proteine nehmen Einfluss auf die oben genannte Actindynamik indem sie die Nucleations-, Elongations-, und stationäre Phase beeinflussen. Einige ABP wie Gelsolin, Profilin, Thymosin, Cofilin und Arp2/3 beeinflussen die Nucleationsphase durch ihre Eigenschaft die Bildung von Actin-Kernen zu fördern oder zu unterdrücken und so die Entstehung von Actinfilamenten zu initiieren oder zu hemmen. Andere ABP zerschneiden Actinfilamente (Gelsolin) oder binden (cappen) an den Actinfilament-Enden (Gelsolin, CapG) was bei ersteren zu einer Zerlegung und zu einem weiteren Abbau der entstandenen kürzeren Filamente führen kann. Das Cappen von F-Actin verhindert die Anlagerung und die Dissoziation von globulärem Actin an dem jeweiligen Ende und beeinflusst damit sowohl die Elongationsphase, als auch die stationäre Phase der Actinpolymerisation [Pollard and Earnshaw, 2007; Pollard, 2007]. Das Bündeln (Villin, Myopodin) und Vernetzen von Actinfilamenten ist ebenfalls die Aufgabe weiterer ABP [Weins *et al.*, 2001].

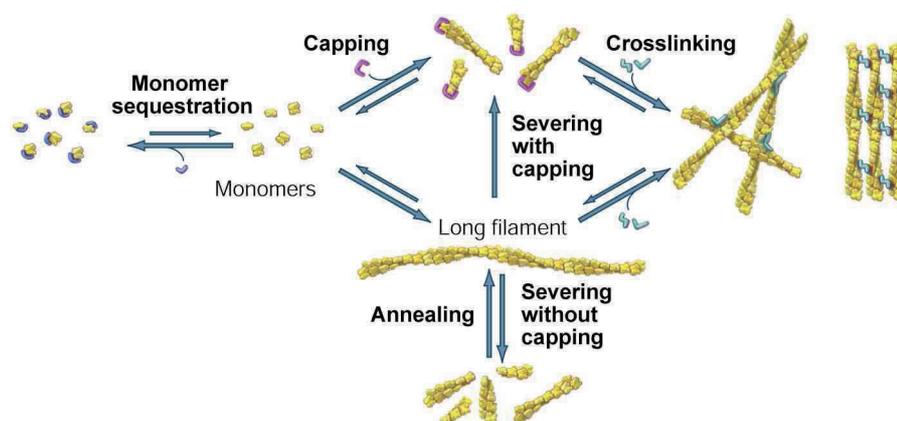


Abb.1.1: Actin-bindende Proteine: Actinmonomer-bindende Proteine können entweder ATP-Actin (Profilin und Thymosin) oder ADP-Actin (Cofilin) binden. Andere Proteine cappen entweder das schnell-wachsende (CapG, Gelsolin) oder das langsam-wachsende Ende (Arp2/3) der Actinfilamente. Gelsolin schneidet und bildet anschließend eine Kappe am schnell-wachsende Ende des Actinfilaments. Vernetzende Actin-bindende Proteine können Netzwerke und Bündel aus Actinfilamenten bilden [Pollard, 2007].

Neben Gelsolin und CapG gehören unter anderem ebenfalls Adseverin, Villin, Supervillin, Fragmin und EWAM zu den Mitgliedern der Gelsolin-Superfamilie, die alle eine ähnliche sekundär und tertiär Struktur aufweisen. Die Gelsolin-Superfamilie ist eine Gruppe von Actin-bindenden Proteinen die für das Schneiden und Cappen von Actinfilamenten in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) typisch ist [Kwiatkowski *et al.*, 1986].

Gelsolin, ein 85 kDa Protein kontrolliert die Länge von Actinfilamenten neben dem bereits erwähnten Fragmentieren, auch durch Cappen der schnell-wachsenden Actinfilament-Enden und hat eine Nucleation-initiiierende Wirkung [Fujita *et al.*, 2001]. Gelsolin besteht aus sechs Domänen (D_1 - D_6), wobei die verschiedenen Domänen separate Funktionen erfüllen [Kwiatkowski *et al.*, 1985]. Beispielsweise bindet D_1 Actin-Monomere in der Abwesenheit von Ca^{2+} , der resultierende Komplex führt zum Cappen des schnell wachsenden F-Actin-Endes. Die Domänen D_1 - D_3 sind an der Fragmentation des F-Actins beteiligt und es zeigte sich, dass D_2 - D_6 für die Nucleations-initiiierende Eigenschaft des Gelsolins verantwortlich sind [Chaponnier *et al.*, 1986; Way *et al.*, 1989; Pope *et al.*, 1991].

CapG (gCap39, Makrophagen Capping Protein, Mbh1) ist ein Actin-Filament cappendes Protein. Es ist ein ca. 40 kDa großes Protein bestehend aus 348 Aminosäuren [Yu *et al.*, 1990], welches in erster Linie in Makrophagen exprimiert wird und erstmals 1986 aus Kaninchen-Makrophagen isoliert wurde [Southwick and DiNubile, 1986]. Es stellt dort etwa 0,9-1% des cytoplasmatischen Gesamtproteins dar [Johnston *et al.*, 1990; Dabiri *et al.*, 1992]. Makrophagen sind von einer sofortigen Umorganisation des Cytoskeletts abhängig, da sie schnell auf bestimmte Reize reagieren müssen. Das Ca^{2+} -abhängige aber reversible Cappen der Actinfilamente führt zu einer gesteigerten Actindynamik und scheint dieses zu ermöglichen [Johnston *et al.*, 1990; Pantaloni *et al.*, 2001]. Das „G“ im Namen von CapG reflektiert die Ähnlichkeit zu Gelsolin [Schafer and Cooper, 1995]. Die genomischen Sequenzen der beiden Proteine sind zu 49% identisch [Johnston *et al.*, 1990]. CapG besteht jedoch nur aus drei Domänen, kann Actinfilamente am (+)-Ende cappen, kann sie jedoch im Gegensatz zu Gelsolin nicht schneiden [Southwick and DiNubile, 1986]. Durch das Cappen des schnell wachsenden Endes wird die kritische Konzentration erhöht, wodurch ein Längenwachstum nicht gecappter Actinfilamente möglich wird. Zudem scheint CapG an mehreren Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert zu sein [Onoda and Yin, 1993].

Die Bedeutung von Actin und den Actin-bindenden Proteinen im Cytoplasma konnte durch viele Versuche gezeigt werden, jedoch konnten Actin und eine Reihe Actin-bindender Proteine ebenfalls im Zellkern nachgewiesen werden.

1.3 Actin und Actin-bindende Proteine im Zellkern

Die Anwesenheit und Bedeutung von Actin im Zellkern wurde lange angezweifelt, inzwischen gibt es jedoch viele Hinweise darauf, dass Actin eine essentielle Rolle in nucleären Prozessen spielt. Monomeres Kern-Actin (nA) scheint an der Regulation der nucleären Transkription [Egly *et al.*, 1984; Lane, 1969; Smith *et al.*, 1979] und an der Chromosomenkondensation sowie am Export der mRNA aus dem Zellkern beteiligt zu sein [Rungger *et al.*, 1979; Scheer *et al.*, 1984].

Zudem konnte filamentöses Actin bereits mehrfach im Zellkern nachgewiesen und seine funktionelle Signifikanz bei der Transkriptionskontrolle demonstriert werden [Ye *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004]. Die Länge des nucleären F-Actins ist vermutlich genau so streng reguliert, wie bei den cytoplasmatischen Filamenten und erfordert demnach ebenfalls die Anwesenheit von Actin-modulierenden Proteinen [Hubert *et al.*, 2008].

Es zeigte sich, dass die Actin-bindenden Proteine N-WASP und Arp2/3 in Kombination mit Kern-Actin mit der RNA Polymerase II assoziiert sind und dadurch deren Transkriptions-Aktivität modulieren. Es wird angenommen, dass diese Proteine über die Regulation der Actin-Polymerisations eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielen [Miralles and Visa, 2006; Wu *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2007].

Das erste Zellkern-Actin bindendes Protein konnte bereits 1987 identifiziert werden [Nishida *et al.*, 1987]. Cofilin, ein Actin-modulierendes Protein der Cofilin-Familie bindet und depolymerisiert filamentöses Actin, hemmt die Polymerisation von G-Actin und scheint am nucleären Import von Actin beteiligt zu sein. Die Anreicherung von Kern-Actin in permeabilisierten Zellen konnte durch einen anti-Cofilin Antikörper gehemmt werden [Ruegg *et al.*, 2004]. Dabei wird die Interaktion zwischen Cofilin und Actin durch eine posttranslationale Modifikation von Cofilin reguliert. Die Phosphorylierung von Cofilin an der Position Ser-3 durch die LIM-Kinase führt zu einer Hemmung der Actin-Bindung [Nebul *et al.*, 1996; Arber *et al.*, 1998].

Weitere Actin-bindende Proteine, die im Zellkern nachgewiesen werden konnten sind CapG, Myopodin, Profilin und Supervillin. Die meisten dieser Proteine befinden sich zwar hauptsächlich im Cytoplasma, treten aber unter bestimmten Bedingungen (wie z.B. während Stressbedingungen oder Zelldifferenzierung) auch im Zellkern auf.

CapG und Myopodin hingegen kommen konstitutiv sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern vor [Gettemans *et al.*, 2005]. Dabei scheint die nucleäre Lokalisation von CapG mit dem Invasionspotential einer Zelle zu korrelieren. Die Hemmung der nucleären CapG-Lokalisation, durch das Anhängen einer NES (nuclear export sequence) von Fragmin, inhibiert die Invasion von epithelialen Zellen in eine Kollagen-Matrix. Es wird vermutet, dass PIP₂ zu einer Dissoziation des nucleären CapGs vom Kern-Actin führt und CapG

erst dadurch bei der Chromosomen-Kondensation mitwirken kann [Gettemans *et al.*, 2005]. CapG konnte zudem im Nucleolus nachgewiesen werden [Hubert *et al.*, 2008].

Profilin, ein ca. 16 kDa großes Actin-bindendes Protein wurde als erstes Protein beschrieben, das nicht an Actinfilamenten, sondern an Actinmonomere bindet [Carlsson *et al.*, 1977]. Zunächst glaubte man, die Funktion von Profilin bestünde nur darin, Actin an bestimmten Stellen an der Polymerisation zu hindern, um sie auf ein Signal hin für den Aufbau von Actinfilamenten freizugeben. Seit 1995 sind jedoch mehrere Klassen von Proteinen bekannt (z.B. VASP, N-WASP, Formin), die Profilin-Actin-Komplexe brauchen, um eine Polymerisation von Actinfilamenten überhaupt zu ermöglichen, vor allem in Bereichen von hoher Bewegungsaktivität. Profilin bindet an solche Proteine durch Interaktion mit Sequenzen, die reich an der Aminosäure Prolin (Polyprolin Sequenz) sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass Profilin mit dem SMN (survival of motor neuron)-Protein interagiert, welches für die Zusammenlagerung von snRN (small nuclear ribonucleo)-Proteinen verantwortlich ist [Giesemann *et al.*, 1999]. Im Zellkern formen die snRNPs Spliceosomen und sind an der mRNA-Verarbeitung beteiligt. Die Interaktion zwischen Profilin und SMN deutet auf eine regulatorische Funktion von Profilin in der mRNA Verarbeitung hin [Paushkin *et al.*, 2002].

Supervillin interagiert mit dem Androgen-Rezeptor (AR) und erhöht dessen Aktivität. Der nucleäre AR reguliert die Genexpression über die Rekrutierung von Koaktivatoren für die Transkription [Ting *et al.*, 2002].

1.4 Transport Actin-bindender Proteine in den Zellkern

Bei eukaryontischen Zellen sind das Cytoplasma und der Zellkern durch die Kernhülle voneinander getrennt. Der Austausch von Proteinen durch die Doppelmembran der Kernhülle erfolgt über eine Vielzahl von Kernporen. Der Kernporenkomplex (NPC) setzt sich aus etwa 30 verschiedenen Proteinen, die als Kernporine bezeichnet werden zusammen [Suntharalingam and Wentz, 2003]. Der eigentliche Proteintransport wird jedoch hauptsächlich durch die Interaktion löslicher Transportrezeptoren (Importine und Exportine) mit den Kernporinen vermittelt [Kalderon *et al.*, 1984; Lanford and Butel, 1984; Pollard *et al.*, 1996].

Bei dem Actin-bindenden Protein Fragmin wird die intrazelluläre Lokalisation über eine N-terminale Leucin-reiche nucleäre Exportsequenz (NES) reguliert [Van Impe *et al.*, 2003]. Diese Signalsequenz wurde als erstes bei dem HIV-1 Rev Protein [Fornerod *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997] und beim Kinase A Inhibitor [Wen *et al.*, 1994] identifiziert. Das Signal wird durch einen Rezeptor der β -Importin Familie erkannt und führt so zum Transport der Proteine aus dem Kern.

CapG ist hingegen konstitutiv sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma lokalisiert [Prendergast and Ziff, 1991; Onoda and Yin, 1993]. Onoda und Yin (1993) postulierten, dass die Phosphorylierung von CapG mit der nucleären Lokalisation im Zusammenhang steht. CapG weist im Gegenteil zu Fragmin trotz seiner ähnlichen Struktur kein NES auf. Hingegen weist CapG eine Sequenz auf, die einem klassischen NLS (nuclear localisation signal) ähnelt [Van Impe *et al.*, 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass der Zellkern-Import von CapG Energie-verbrauchend und Importin- β , jedoch nicht Importin- α abhängig ist [De Corte *et al.*, 2004]. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass weitere Proteine an dem nucleären Transport von CapG beteiligt sind [Van Impe *et al.*, 2008], die teilweise auch in die nucleolare Translokation involviert zu sein scheinen [Hubert *et al.*, 2008].

Ein weiteres Actin-bindendes Protein bei dem die Phosphorylierung einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation zu haben scheint ist Cofilin. Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von Cofilin nicht nur die Actin-Bindung reguliert (siehe 1.3), sondern auch einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Cofilin hat. Die Mutation von Serin₃ zu Alanin (S₃A) führte zu einer Anreicherung von Cofilin im Zellkern in NIH3T3 (murine Fibroblasten)-Zellen [Nebf *et al.*, 1996]. In Jurkat (Lymphom)-Zellen führt eine Dephosphorylierung von Cofilin zu einer Translokation in den Zellkern [Samstag *et al.*, 1994]. In Thyroid (Schilddrüsen)-Zellen konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen einer Stimulations-induzierten Dephosphorylierung von Cofilin und seiner nucleären Translokation gefunden werden [Saito *et al.*, 1994].

1.5 Actin-bindende Proteine und onkogene Transformation

Die vielfältigen Aufgaben und der Einfluss auf die Actinorganisation machen deutlich, dass die fehlerhafte Regulation Actin-bindender Proteine eine fatale Auswirkung auf die Zelle haben und zu einer onkogenen Transformation führen kann. Die abnorme Expression und Modifikation einiger Actin-bindender Proteine kann dazu führen, dass eine Zelle die für die Metastasierung notwendige Fähigkeit sich zu bewegen zurückgewinnt und so die onkogene Transformation unterstützen [Mitchison and Cramer, 1996]. Da Actin-bindende Proteine jedoch auch im Zellkern vorkommen, ist auch ein Einfluss über das nucleäre Actin auf die Transkription möglich.

Bislang konnte eine erhöhte Expression von CapG in einer Reihe von Tumoren, unter anderem in Mamma- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden [Dahl *et al.*, 2005].

De Corte *et al.*, (2004) nutzten Klone mit unterschiedlichen CapG-Expressionen um zu untersuchen, welche Auswirkung eine Erhöhung der Expression auf die Invasion in Kollagen und Organkulturen hat. Klone, die eine erhöhte CapG-Expression aufwiesen, wanderten in eine Kollagen-Matrix ein, was den Schluss zulässt, dass bereits eine moderate Expression von CapG eine Invasion auslöst [De Corte *et al.*, 2004]. Die

Versuche zeigten jedoch ebenfalls, dass die nucleäre Lokalisation eine Voraussetzung für die erhöhte Mobilität der untersuchten Zellen ist. Die erhöhte CapG-Expression alleine scheint demnach nicht für das erhöhte Invasionspotential der Zellen verantwortlich zu sein.

Es könnte demnach ein Zusammenhang zwischen der Invasionsfähigkeit, die eine wichtige Eigenschaft bei der Metastasierung ist, und einer erhöhten Expression und nucleären Anteils von CapG, bestehen [De Corte *et al.*, 2004]. Der Nachweis einer erhöhten Expression von CapG in Mamma- und Ovarialkarzinomen, die durch die Bildung von Metastasen beide sehr aggressive Tumoren darstellen, stützt diese Annahme.

Die Expression von Thymosin β 4, welches erstmals 1966 von Goldstein und White beschrieben wurde [Goldstein *et al.*, 1966], ist bei malignen Maus-Fibrosarkom-Zellen erhöht, dabei korreliert die Expression mit dem metastatischen Potential der Zellen [Kobayashi *et al.*, 2002]. Die erhöhte Expression von CapG und Thymosin β 4 spricht für eine Rolle dieser Proteine als Onkogene. Eine reduzierte Expression verschiedener Actin-modulierender Proteine, wie Profilin und Gelsolin, deutet hingegen auf eine mögliche Funktion als Tumorsuppressoren hin.

Profilin 1, das am häufigsten auftretende Mitglied der Profilin-Familie, zeigt in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien einen geringeren Gehalt als in Kontrollzellen [Janke *et al.*, 2000].

Vandekerckhoven *et al.* (1990) zeigten, dass transformierte menschliche Fibroblasten und Epithelialzellen eine markant reduzierte Expression von Gelsolin aufweisen [Vandekerckhoven *et al.*, 1990]. Eine reduzierte Gelsolin-Expression konnte ebenfalls in Karzinomen der Brust [Asch *et al.*, 1999], der Blase [Tanaka *et al.*, 1999], der Prostata [Lee *et al.*, 1999] und den Ovarien [Noske *et al.*, 2005] nachgewiesen werden. Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen dem Verlust von Gelsolin und einer ansteigenden Malignität gezeigt werden. Beispielsweise führt der Verlust der Gelsolin-Expression bei Patientinnen mit einem invasiven Karzinom der Brust zu einer Abnahme der Überlebensrate [Winston *et al.*, 2001]. Dieser Zusammenhang wird durch die Tatsache, dass eine Erhöhung der Gelsolin-Expression in Karzinomen der Ovarien einen starken inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Tumorzellen hat [Noske *et al.*, 2005] und bei Karzinomen der Blase zur Reduktion der Zellmigration führt, bestätigt. Weiterhin wird die Bildung von Lungenmetastasen durch die Überexpression von Gelsolin mittels Gentransfer unterdrückt [Fujita *et al.*, 2001]. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Gelsolin als ein Tumorsuppressor angesehen werden kann [Fujita *et al.*, 2001; Winston *et al.*, 2001].

Es ist schwer die Funktion von Gelsolin als Tumorsuppressor mit dessen Funktion in Einklang zu bringen. Cunningham *et al.* (1991) zeigten, dass durch die Actin-

modulierenden Eigenschaften von Gelsolin die Zellmotilität von Fibroblasten erhöht wird [Cunningham *et al.*, 1991]. In Tumoren, die ein hohes metastatisches und invasives Potential aufweisen, und bei denen die Gelsolin-Expression nicht erhöht oder sogar erniedrigt ist, müssen andere Actin-modulierende Proteine die ebenfalls das Actincytoskelett modulieren und so die Motilität einer Tumorzelle erhöhen, stärker exprimiert werden.

Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass einige Tumoren eine erhöhte Expression von Gelsolin aufweisen. Sowohl in nicht-kleinzelligen Lungen-Karzinomen, als auch in Urothel-Karzinomen wurde eine erhöhte Expression von Gelsolin nachgewiesen [Shieh *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Gelsolin-Expression von nicht invasiven (T0) zu invasiven (T1) und zu stark invasiven (T2 plus) Urothel-Karzinomen stattfindet. Die Zunahme der Gelsolin-Expression spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Umwandlung eines weniger aggressiven in einen aggressiven und invasiven Tumor [Rao *et al.*, 2002].

1.6 Posttranslationale Modifikation und onkogene Transformation:

Neben der veränderten Expression Actin-bindender Proteine bei transformierten Zellen weisen einige ABP eine Zunahme der Phosphorylierung auf.

Transformierte NIH3T3-Zellen zeigen einen deutlichen Anstieg an phosphorylierten Caldesmon, Calspectin und 36K Protein-Varianten. Es wird angenommen dass es bei Caldesmon welches die Actin-Myosin-Interaktion und die Reorganisation und Stabilität von Actin-Stress-Fasern moduliert in (durch das retrovirale Onkogen S3-v-*erbB*) transformierten Fibroblasten zu einer für die normale Funktion untypischen Tyrosinphosphorylierung kommt [McManus *et al.*, 1997].

Dabei ist die phosphorylierte Caldesmon-Variante mit dem Signalkomplex bestehend aus den Adapterproteinen Shc (Sarc homology 2 domain containing), Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) und dem GEF (Guanine nucleotide exchange factor) SOS (Son of Sevenless) assoziiert. Weitere Analysen zeigten dass durch die Mutation von Tyrosin₂₇, welches innerhalb der Myosin-Bindungsdomäne lokalisiert ist, zu Phenylalanin (Y₂₇F) die Interaktion zwischen Caldesmon und dem Shc-Grb2-Komplex deutlich reduziert wird. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von Tyrosin₂₇ zu einer reduzierten Bindungsaffinität zu Myosin führt. Dies könnte die Instabilität und den Abbau von Actin-Stress-Fasern in transformierten Fibroblasten erklären. Zudem scheint die Bindung des phosphorylierten Caldesmon und dessen Interaktion mit dem Shc-Grb2-Komplex die normale Signalfunktion des Komplexes zu behindern, was zu einer Hemmung des Ras/Raf-Signalwegs führt [Wang *et al.*, 1999].

In den letzten Jahren hat die Analyse posttranslatiöner Modifikationen von Proteinen immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die posttranslationale Modifikation, die u.a. die Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung einschließt, ist ein sehr bedeutender Mechanismus, durch welchen die Proteinfunktion bei eukaryotischen Proteinen reguliert werden kann [Yang, 2005].

Wie oben bereits erwähnt scheint die Phosphorylierung von CapG mit einer nucleären Lokalisation im Zusammenhang zu stehen. Zudem führt die Hemmung des nucleären Imports von CapG zu einer Unterdrückung der Invasion der Zellen in eine Kollagenmatrix Typ I. Dieses könnte ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen der posttranslationalen Modifikation von CapG, der nucleären Lokalisation und so dem Invasionspotential hindeuten.

1.7 Zielsetzung

Für die Untersuchungen zur Bedeutung des CapG-Proteins für die Metastasierung des Mammakarzinoms sollen im Wesentlichen entsprechende Karzinom-Zelllinien verwendet werden. Erster Ansatzpunkt dazu ist die Expressionsanalyse der CapG-Expression, mit der Absicht im Anschluss zwei Zelllinien mit deutlich unterschiedlicher CapG-Expression vergleichend zu untersuchen. Durch Unterdrückung mittels siRNA und Überexpression durch stabile Transfektion, soll der Einfluss der CapG-Expression auf das Invasionspotential der Zellen ermittelt werden. Die Analyse der Verteilung von CapG soll klären, ob eine Korrelation mit dem Invasionspotential besteht. Die Anreicherung, zwei-dimensionale Auftrennung und anschließende massenspektrometrische Analyse sollen einen Aufschluss über die CapG-Modifikationen geben. Ein Aminosäureaustausch soll zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen den identifizierten Modifikationen und dem Invasionspotential einer Zelle besteht. Durch weitere subzelluläre Fraktionierungen soll untersucht werden, ob das durch Mutagenese modifizierte CapG eine andere Verteilung als das normale Protein aufweist.

2. Material und Methoden

2.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde unter der Verwendung von TRIzol™ (Gibco, Karlsruhe) isoliert. Dieses Verfahren stellt eine Weiterentwicklung der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) dar und basiert auf einer monophasischen Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung, die während des Homogenisierens und der Lyse die Integrität der RNA schützt. Adhärenente Zellen wurden durch Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst und zentrifugiert (2.10.3). Die Zellen wurden mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen und das Zellpellet durch Zugabe von 1 ml TRIzol™ lysiert. Die lysierten Zellen können direkt zur RNA-Isolierung eingesetzt oder in dieser Form für mehrere Wochen bei -80°C eingefroren werden. Um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu ermöglichen, wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben ca. 15 sec geschüttelt und im Anschluss für 2-3- min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 10000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) nach der die wässrige RNA-haltige Oberphase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt wurde. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die RNA durch Zentrifugation (10 min; 4°C und 10000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei 55°C im Thermoblock (SHT 2D Stuart scientific) getrocknet und in 20-100 µl DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser aufgenommen. Die gewonnene RNA wurde nach der Quantifizierung (2.2) bis zur Nutzung bei -80°C gelagert.

2.2 Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA

Die Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration und -Reinheit erfolgte mit einem NanoDrop™ ND-1000 UV/VIS Spektralphotometer (NanoDrop Technologies).

2.3 cDNA Synthese

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Omniscript RT Kit, Qiagen, Hilden). Der Einsatz unspezifischer Random-Primer (Hexanucleotide) ermöglicht es, statistisch gesehen, die gesamte RNA-Population zu erfassen und ausgehend von einer einzigen cDNA-Synthese mehrere Transkripte im Anschluss gleichzeitig zu untersuchen.

Dazu wurden pro Ansatz 500 ng RNA auf ein Volumen von 12,5 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und nach 5-minütiger Denaturierung bei 65°C auf Eis abgekühlt. Zu der vorbereiteten RNA wurden je 7,5 µl des nach Herstellerangaben vorbereiteten

Reaktionsansatzes pipettiert. Folgende Konzentrationen lagen im Ansatz mit einem Endvolumen von 20 μl vor: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 7,5 mM MgCl_2 ; 0,1 mg/ml BSA; 15 mM DTT; je 1 mM dATP; dCTP; dGTP und dTTP; 20 U RNase-In; 1000 pmol Random-Primer und 9,5 U Reverse Transkriptase. Die Ansätze wurden für 60 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte für 5 min bei 95°C. Die Proben wurden im Anschluss bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Reaktionsvolumen der PCR betrug 25 oder 50 μl . Ein PCR-Ansatz enthielt DNA/cDNA als Template, PCR Reaktionspuffer, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) 5' und 3'-Primer, sowie eine Taq-Polymerase oder Expand High-Fidelity Polymerase (Roche, Mannheim). Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbaren Deckel (Biometra, Göttingen).

2.4.1 Kontrolle der cDNA-Synthese mittels β -Actin-PCR

Zur Qualitätskontrolle der synthetisierten cDNA auf Kontaminationen durch genomische DNA diente die β -Actin-PCR. Aufgrund der speziell gewählten Primer ergeben zusätzliche Intronsequenzen bei genomischer DNA ein größeres Fragment (652 bp) als cDNA (446), so dass nach elektrophoretischer Auftrennung (2.7) im Agarosegel Verunreinigungen deutlich detektierbar waren. Die verwendeten Primer und die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 2.1 und 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Primer für die β -Actin PCR und Produktgröße des PCR-Produkts

Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße
β -Actin Frw	AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT	446
β -Actin Rev	ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG	

Tabelle 2.2: Bedingungen für die β -Actin-PCR

β -Actin PCR			
Reaktionsansatz	Volumen [μl]	Reaktionsbedingungen	
H ₂ O	30,5	95°C; 10 min	
10x Puffer	5,0		
5'-Primer	2,5 (25 pmol)	95°C; 0,5 min	35 Zyklen
3'-Primer	2,5 (25 pmol)	60°C; 1 min	
dNTPs	4,0 (10 nmol)	72°C; 1 min	
Template	5 μl (50 ng)	72°C; 8 min	
HighFidelity Taq-polymerase	0,6 μl /1,8 U		

2.4.2 Mutagenese

Die Mutagenese erfolgte unter Verwendung des „QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit“ (Startagene, Kalifornien, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Einführung der Mutation erfolgt durch die Amplifikation des Ausgangskonstruktes mit der Pfu Turbo DNA Polymerase und Primern, die die gewünschte Mutation enthielten (Tab. 2.3). Nach der PCR wurde der Ansatz mit DpnI behandelt. Dabei wird das methylierte Ausgangskonstrukt, jedoch nicht die neu amplifizierte DNA, abgebaut. Die Ligation der Doppelsträngigen Amplifikate erfolgt nach Transformation in den im Kit enthaltenen E.coli-Stamm XL-Blue. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch eine Sequenzierung nach der Mini-Präp (2.9.9) überprüft.

Tabelle 2.3: Primer für Mutagenese-PCR

Bezeichnung	Sequenz	Tm
CapG-Mut-T3Q7 Frw	ATG TAC GCA GCC ATT CCC GCG AGT GGC	78
CapG-Mut-T3Q7 Rev	GCC ACT CGC GGG AAT GGC TGC GTA CAT	
CapG-Rescue1 Frw	CCA GGA AGG TGG TGT AGA ATC AGC ATT TCA CAA G	73
CapG-Rescue1 Rev	CTT GTG AAA TGC TGA TTC TAC ACC ACC TTC CTG G	
CapG-337-Mut Frw	CCT CAG GGC CGT GAG GCT CCC ATC TTC AAG C	80
CapG-337-Mut Rev	TGA AGA TGG GAG CCT CAC GGC CCT GAG G	
CapG-S69-Mut Frw	TGG ATA GGC CAG CAG GCA GCC CGG GAT GAG CA	84
CapG-S69-Mut Rev	TGC TCA TCC CGG GCT GCC TGC TGG CCT ATC CA	
CapG-103-Mut Frw	CAG GGC AAT GAG GCT GAC CTC TTC ATG AGC	75
CapG-103-Mut Rev	GCT CAT GAA GAG GTC AGC CTC ATT GCC CTG CAC	
CapG-151-Mut Frw	AAC ATC CGT GCC GCC GAG CGG GCA CTG AAC	84
CapG-151-Mut Rev	GTT CAG TGC CCG CTC GGC GGC ACG GAT GTT	
CapG-200-Mut Frw	CAT CCG GGA CGC TGA GCG ACA GGG CAA G	81
CapG-200-Mut Rev	CTT GCC CTG TCG CTC AGC GTC CCG GAT G	
CapG-212-Mut Frw	GTG GAG ATT GTC GCT GAT GGG GAG GAG CCT GCT	80
CapG-212-Mut Rev	AGC AGG CTC CTC CCC ATC AGC GAC AAT CTC CAC	
CapG-240-Mut Frw	GAG GAA GAC CTC GCA GCT GAC AAG GCA AAT GCC	79
CapG-240-Mut Rev	GGC ATT TGC CTT GTC AGC TGC GAG GTC TTC CTC	
CapG-S8/S10-Mut Frw	CAT TCC CCA GGC TGG CGC TCC ATT CCC AG	81
CapG-S8/S10-Mut Rev	CTG GGA ATG GAG CGC CAG CCT GGG GAA TG	
CapG-S15-Mut Frw	CAT TCC CAG GCG CAG TGC AGG ATC CAG G	79
CapG-S15-Mut Rev	CCT GGA TCC TGC ACT GCG CCT GGG AAT G	
CapG-Y2-Mut Frw	ATG GCC ACA GCC ATT CCC CAG AGT GGC TCT C	81
CapG-Y2-Mut Rev	GAG AGC CAC TCT GGG GAA TGG CTG TGG CCA T	

2.4.3 Amplifikation der CapG-Sequenz aus dem pcDNA-CapGMut-Vektor

Zur Klonierung der mutierten CapG-Sequenzen in den Expressionsvektor S11-IN wurde die Sequenzen zunächst aus den vorliegenden Vektoren pcDNA-CapGMut3,7/R; pcDNA-

CapGMut3,7/337/R; pcDNA-CapGMut337/R und pGMTeasy-CapG-His amplifiziert (3.14). Die zugehörigen Primer und Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.4: Primer für die Amplifikation der mutierten CapG-Sequenzen aus den pcDNA-CapGMut-Vektoren

Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße
T7-Frw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	1246
CapG-EcoRI-Rev	AGG GGC GAA TTC TCA TTT CCA GTC CTT GAA	

Tabelle 2.5: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der CapG-Sequenzen aus dem pcDNA-Vektor

Amplifikation CapGMut-Sequenzen			
Reaktionsansatz	Volumen [μ l]	Reaktionsbedingungen	
H ₂ O	32,5	95°C; 10 min	
10x Puffer	5,0		
5'-Primer	4,0 (40 pmol)	95°C; 0,5 min	8+25 Zykl.
3'-Primer	4,0 (40 pmol)	56°C/52°C; 0,5 min	
dNTPs	3,0	72°C; 2 min	
Template	80 ng (1 μ l)	72°C; 10 min	
HighFidelity Taq-polymerase	0,6 μ l/1,8 U		

2.5 Real-Time PCR

Die kontinuierliche Zunahme von Produkten während der Amplifikation kann mithilfe der Real-Time-PCR verfolgt werden. Dazu wird unter anderem die Fluoreszenzintensität eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffs genutzt.

Die RT-PCR wurde mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 13 μ l QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix, 10 pmol Primer und 65-650 ng cDNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen wurde mit RNase-freiem Wasser auf 26 μ l aufgefüllt. Die spezifische Amplifikation wurde mit den in Tabelle 2.6 aufgeführten Primern und die in Tabelle 2.7 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die Durchführung und Auswertung erfolgte mit dem: ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Die weitere Datenauswertung erfolgte nach Konvertieren der Daten in Microsoft Excel. Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte nach jeder Real-Time PCR über die Schmelzpunktanalyse. Die theoretischen Schmelzpunkte der PCR-Produkte wurden durch das Programm Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.nwr.edu/biotools/oligocalc.html>) berechnet und mit den Ergebnissen der Schmelzpunktanalyse verglichen. Um eine Aussage über die relative

Expression der verschiedenen Proteine machen zu können, wurde die 2- Δ CT- Methode genutzt [Livak *et al.*, 2001].

Tabelle 2.6: Primer für die Real-Time PCR

Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße
β -Actin-Fwd1	GAC AGG ATG CAG AAG GAG AT	90 bp
β -Actin-Rev1	ATG GAG CCG CCG ATC CAC A	
GapDH-Fwd1	CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG	90 bp
GapDH-Rev1	TGG CAG TGA TGG CAT GGA GTG	
CapG-RT Frw	ATC TGC ACC TGT GGA TAG GC	140 bp
CapG-RT Rev	CTC ATG AAG AGG TCA GAC TCA TTG	

Tabelle 2.7: Bedingungen für die Real-Time-PCR

Zyklen	Temperatur	Dauer
	95 °C	15 min
40 Zyklen	94 °C	15 sec
	56 °C	30 sec
	72 °C	30 sec

2.6 dHPLC-Analysen

Das Exon 10 des CapG-Gens wurde zunächst mit Primern amplifiziert und 5 μ l des Amplifikats für die SNP-Analyse verwendet. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.8 angegeben. Die optimalen Bedingungen (Acetonitril-Gradient, Temperatur) für die dHPLC-Analyse wurden freundlicherweise von Beate Betz mit Hilfe des Wavemaker 4.1.42 Programms ermittelt. Der Acetonitril-Gradient (Start:13%- Stop:15%) wurde so angepasst, dass das DNA-Fragment nach einer Retentionszeit von 3-5 min von der Säule eluiert wurde.

Tabelle 2.8: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Exon-10 von CapG

Exon 10-PCR für HPLC-Analyse			
Reaktionsansatz	Volumen [μ l]	Reaktionsbedingungen	
H ₂ O	31,5	95°C; 10 min	34 Zyklen
10x Puffer	5		
5'-Primer	2,5 (25 pmol)	95°C; 1 min	
3'-Primer	2,5 (25 pmol)	57°C; 1 min	
dNTPs	3 (7,5 nmol)	72°C; 1 min	
Template	5 (50 ng)	72°C; 8 min	
HighFidelity Taq-polymerase	0,5 μ l/1,8 U	95°C-1°C; 1 min	29 Zyklen

2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennschärfe von Agarosegelen lässt sich durch Variation der Konzentration beeinflussen, so dass DNA-Fragmente verschiedener Größen aufgetrennt werden können. Zur Auftrennung wurden 0,7-1,5%-ige (w/v TBE-Puffer) Agarosegele verwendet. Vor dem Auftragen der Probe wurde diese 1:1 mit Probenpuffer verdünnt. Als Standard wurde der SmartLadder-Größenstandards (Eurogentec, Köln) oder die 1 kb-DNA-Ladder (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 70 bis 120 V für 30 bis 200 min angelegt. Die Elektrophorese wurde unter Verwendung von TBE-Puffer mit dem PowerPac 300 Power Supply (BioRad, München) durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden nach einer mindestens 30 minütigen Inkubation in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) unter UV-Licht ($\lambda=312$ nm) sichtbar gemacht.

TBE-Puffer: 0,2 M Tris-HCl, 0,17 M Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8,0

Probenpuffer: 7 M Urea, 50 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 40% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau; pH 8,0

2.8 Sequenzierung

Da die Amplifikation von Genabschnitten für die Sequenzierung eine möglichst geringe Polymerase-Fehlerrate erfordert, wurde die Expand High-Fidelity Taq Polymerase (Roche, Mannheim) benutzt, welche über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität verfügt. Bei der PCR-Reaktion nicht verbrauchte Primer und dNTPs können zu Störsignalen während der Sequenzierung führen. Aus diesem Grund wurden die PCR-Produkte vor der Sequenzierung aufgereinigt. Dazu wurde ExoSap-It (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das PCR-Produkt konnte anschließend direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden. Diese wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität vorgenommen.

2.9 Klonierung

2.9.1 Plasmide

Der retrovirale Expressionsvektor **S11-IN** (5797) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hanenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt (Plasmidkarte siehe Anhang 8.2). Dieses Vektorsystem besitzt flankierende retrovirale Long Terminal Repeat (LTR)-Sequenzen, die die Integration der innerhalb der LTR-Sequenz liegenden DNA in das humane Genom vermittelt. Der Vektor enthält einen Replikationsursprung (ori) für die Replikation in E.coli, sowie das für die β -

Lactamase kodierende Ampicillinresistenzgen (*amp*), welches als prokaryontischer Selektionsmarker dient. Zusätzlich befindet sich eine Multiple Cloning Site (MCS) vor der Internal Ribosomal Entry Site (IRES) mit einer Reihe singulärer Restriktionsschnittstellen. Als viraler Promotor dient bei diesem Konstrukt der CMV (Zytomegalie-Virus)-Promotor, da er eine hohe Expression in Säugertierzellen erlaubt. Der Vektor S11-IN enthält das Neomycinresistenzgen (*NeoR*) als eukaryotischen Selektionsmarker hinter IRES.

Für die Klonierung des Expressionsvektors S11-CapG-IN wurde der retrovirale Vektor S11IN als Rückgrat verwendet und die codierende CapG-Sequenz von 1047 bp mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* eingefügt.

Der **pCDNA™ 3.1(+)-Vektor** wurde von Invitrogen (Mannheim) bezogen und für die transiente Transfektion genutzt. Die Plasmidkarte ist im Anhang (8.2) dargestellt.

2.9.2 Bakterienstämme

Zur Transformation und Amplifizierung von Plasmid DNA wurden folgende kompetente *E. coli*-Stämme mit den genannten Genotypen verwendet:

DH5 α : F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR rec1 endA1 hsdR17 (*r_k⁻*, *m_k⁺*)
phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1

SURE: e14- (McrA-) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac
recB recJ sbcC umuC::Tn5 (*Kan^r*) uvrC [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn (*Tet^r*)]

2.9.3 Restriktion von DNA

Restriktionen von DNA wurden nach den vorgegebenen Bedingungen und mit den mitgelieferten Puffern der Hersteller (Roche, Mannheim; New England Biolabs, Bad Schwalbach) durchgeführt. Zum Einsatz kamen 0,4 bis 5 μ g DNA und 1 bis 2 U Enzym in 20 μ l Reaktionsansätzen. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte für 1 h bei 37°C. Die Enzyme wurden anschließend bei 65°C für 20 min inaktiviert.

2.9.4 Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors

Nach der Restriktion des S11-IN Vektors und der Inaktivierung des Restriktionsenzym wurde der Vektor durch die alkalische Shrimp Phosphatase (GIBCO, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Dadurch wurde eine Religierung des Vektors, nach Zugabe des Inserts und Ligase, verhindert. Die Phosphatase wurde nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C für weitere 15 min bei 65°C inaktiviert.

2.9.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA im Agarosegel wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel

herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach der Gewichtsbestimmung der Agarosegele wurde die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus der Agarose isoliert. Die zugrunde liegende Methode ist die Auflösung des Agarosegels durch Natriumperchlorat und die Bindung der DNA an eine Anionenaustauschersäule, von der die DNA zum Schluss eluiert wird.

2.9.6 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) verwendet. Zur Anwendung kamen die mitgelieferten Reaktionspuffer in Gegenwart von 1 U der Ligase in einem Gesamtreaktionsansatz von 20 μ l. Die molare Menge des Insertionsfragmentes soll das 4-fache der Vektor DNA ausmachen, wobei aber auch weitere Vektor-Insert-Verhältnisse gewählt wurden. Die Ligationsansätze wurden für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 15°C inkubiert und die Ligase im Anschluss für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die DNA-Fragmente liegen nach der Behandlung mit Ligase als zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Vektor) vor, die zur Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet werden kann.

2.9.7 Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter SURE-Zellen wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C angezchtet. Mit dieser Vorkultur wurden dann 500 ml LB-Medium (s.u.) angeimpft. Das Zellwachstum wurde photometrisch bei $\lambda = 600$ nm verfolgt. Bei einer optischen Dichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 g für 15 min pelletiert. Die Zellpellets wurden zweimal mit eiskaltem Wasser (500 ml und 250 ml) gewaschen und zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml 10%-igem Glycerin und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert, in 40 μ l Aliquots auf Eis aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.9.8 Transformation von *E.coli*-Zellen mittels Elektroporation

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der kompetente *E.coli*-Stamm SURE durch Elektroporation transformiert. Dafür wurden die kompetenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-4 μ l des Ligationsansatzes gemischt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm, BioRad, München) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser (BioRad) durch einen exponentiell abfallenden Spannungspuls bei 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω und $\tau = 4,0$. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1ml SOC-Medium aus der Küvette herausgespült und in einem Reaktionsgefäß für 1h bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf

Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Einzelkolonien wurden in je 4 ml LBamp-Medium überführt, über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert und im Anschluss für die Plasmid-DNA-Isolierung geerntet.

LB-Medium:	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, add 1000 ml dH ₂ O; pH 7,3
Agar-Platten:	LB-Medium + 2 % Agar-Agar (50 mg/l)
SOC-Medium:	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose

2.9.9 Plasmid-Präparation aus *E.coli*-Zellen

Die Präparation hochreiner Plasmid-DNA aus 4 ml Übernachtskulturen erfolgte mit dem Plasmid-Isolation Kit (Macherey Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers.

Die Plasmid-Isolierung aus größeren Bakterienkulturen, das heißt Midi bzw. Maxi-Präparation von Plasmid DNA, erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Plasmid MIDI Kit (Qiagen, Hilden) (Ausbeute bis 100 µg) bzw. dem Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) (Ausbeute bis 500 µg).

2.10 Zelllinien und Zellkultivierung

2.10.1 Zelllinien

MDA-MB 231: Die Zelllinie wurde einer 51-jährigen, kaukasischen Frau mit Adenokarzinom aus der Brust entnommen.

BT-20: Zellen die einer 74-jährigen Frau mit einem duktalem Brustkarzinom entnommen und kultiviert.

T47-D: Entnommen einer 54-jährigen Patientin mit einem infiltrierendem duktalem Brustkarzinom.

2.10.2 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte bis zu einem 80%-ig konfluentem Wachstum in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 75, 250 oder 550 ml Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen). Zur Kultivierung der Zelllinien MDA-MB 231, BT-20 und T47D wurde Vollmedium bestehend aus DMEM Medium (Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium, GIBCO, Karlsruhe) mit 1000 mg/L Glucose, 110 mg/L Natriumpyruvat (GIBCO, Karlsruhe) und folgenden Zusätzen verwendet: 10% fötales Kälberserum (FCS Gold Mycoplex, PAA, Pasching, Österreich), 1% L-Glutamin (100x; GIBCO), 1% MEM Vitamin-Lösung (100x; GIBCO), 0,1% Gentamycin (10mg/ml; GIBCO).

Bei allen Zelllinien wurde das Medium mindestens zweimal pro Woche gewechselt. In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und direkt in eine 50 ml Kulturflasche mit 5 ml Medium überführt. Die Kultivierung der Zellen, die für den Invasionsassay verwendet wurden, erfolgte nur bis zu einem maximal 50%-ig konfluentem Wachstum. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und ausgezählt (2.10.4).

2.10.3 Subkultivierung von Monolayerkulturen

Kulturen bei denen der Boden der Gewebekulturflasche zu 80-90% bewachsen war (konfluente Kulturen), wurden in neue Kulturflaschen überführt. Dazu wurde das Medium entfernt, die adhärenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA Lösung bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten (maximal 5 Minuten). Anschließend wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Vollmedium die Wirksamkeit des Trypsins herabgesetzt, die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und die Zellen für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus). Pelletierte Zellen wurden in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und ein Teil in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät.

2.10.4 Bestimmung der Zelltiters

Zur Bestimmung des Zelltiters wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach der Zugabe der verdünnten Zellsuspension wurden vier Großquadrate ausgezählt. Der Titer berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}_2\text{) x Kammertiefe (mm) x Verdünnung}} = \text{Zellen}/\mu\text{l}$$

2.10.5 Kryokonservierung

Die Zellen wurden wie unter 2.10.3 beschrieben mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Medium mit 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen (Greiner, 2 ml) überführt. Die Zellen wurden zunächst bei -20°C dann bei -80°C eingefroren und später in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.11 Transiente Transfektion von pcDNA-CapGMut in T47-D Zellen

Für die transiente Transfektion der T47-DZellen wurde das Lipofectamin LTX-Reagenz (Invitrogen, Mannheim) verwendet. Die Zellen wurden 24 h vorher so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine 50-60 %-ige Konfluenz aufwiesen (1×10^5 Zellen pro Well einer 6-Well Platte). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die

Etablierung wurden verschiedene Mengen an Plasmid-DNA (2,5 – 5 μg) getestet. Pro Transfektionsansatz wurden 14 μl Lipofectamin, 8 μl Plus-Reagenz und die unterschiedlichen Mengen an Plasmid-DNA verwendet. Der Ansatz wurde mit Opti-MEM (GIBCO, Karlsruhe) Medium auf 100 μl aufgefüllt und nach einer 30-minütigen Inkubation unter Schwenken auf die Zellen gegeben. Die Zunahme der CapG-Expression wurde nach 18, 42 und 66 h durch Immunoblot-Analysen detektiert.

2.12 Stabile Transfektion eines retroviralen Expressionsplasmids

Die S2 Arbeiten zur viralen Transfektion der S11-CapG-IN, S11-CapG-R-IN, S11-CapG-His-R-IN und S11-CapGMut_x-R-IN Expressionsplasmide in die BT-20 und MDA-MB 231 Zelllinien wurden freundlicherweise von Fr. Constanze Wiek (Arbeitsgruppe Prof. H. Hanenberg, Klinik für Kinder-Onkologie, Düsseldorf) durchgeführt. Für die Virusproduktion wurden zunächst EcoR-Phoenix-Zellen in mit 0,1% Gelantine beschichtete 10 cm-Zellkulturflaschen ausgesät ($4,5 \times 10^6$ Zellen). Am Folgetag wurden die Zellen nach einem Vollmedium-Wechsel mit dem Expressionsplasmid unter Verwendung des FUGENE™-6-Transfektionsreagenzes (Roche) transfiziert. In 200 μl DMEM-Medium wurden hierzu 60 μl des FUGENE-Reagenzes sowie 15 μg des jeweiligen Plasmids gemischt und nach einer 15 minütigen Inkubationszeit bei RT das Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48 h wurde der Zellüberstand mit den produzierten Viren abgenommen und durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 μm) filtriert. Der filtrierte Überstand wurde anschließend auf die pG13-Zellen gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen, die kein Plasmid enthielten durch eine 0,9 mg/ml Geneticin-Lösung (G-418, Roche, Mannheim) selektiert. Nach weiteren 48 h konnte der Überstand nach erneuter Filtration zur Infizierung der Zielzellen genutzt werden. Für die Virus-Transfektion wurden die Zelllinien BT-20 und MDA-MB 231 in 6-well-Platten ausgesät und am Folgetag mit je 1 ml Virus Überstand transfiziert. Nach der Transfektion wurde das Medium (Vollmedium, siehe 2.10.2) gewechselt und zur Selektion der transfizierten Zellen folgte eine sieben- bis vierzehntägige Behandlung mit einer 0,9 mg/ml Geneticin-Lösung. Die Zellen wurden solange selektiert, bis alle Kontrollzellen (BT-20 bzw. MDA-MB 231 ohne S11-IN) abgestorben waren. Durch das Expressionsplasmid S11-IN wurde in transfizierten Zellen eine Geneticin-Resistenz eingeführt, die diese gegenüber untransfizierten Zellen bei Behandlung mit G418 überleben lässt, so dass schließlich 100% transfizierte Zellen vorlagen.

2.13 Unterdrückung der CapG-Expression mittels siRNA

Für die Unterdrückung der CapG-Expression in der MDA-MB 231-Zelllinie wurden die Zellen 24 h vor Zugabe der siRNA ausgesät (5×10^4 Zellen/Well einer 6-Well Platte). Die

Zellen wurden unter der Verwendung von HiPerFect (Qiagen, Hilden) und nach den Angaben des Herstellers mit den siRNA-Molekülen transfiziert. Es wurden drei verschiedenen siRNAs (Ambion, UK) verwendet: siRNA1: GGUGGUGUGGAG UCAGCAU, siRNA2: GGUGGAGAUUGUCACUGAU und siRNA3: GGUCUCUGAUGC CACUGGA, welche innerhalb der codierenden Sequenz (335-373, 621-639 und 759-777) der CapG-mRNA binden.

2.14 Invasionsassay

Die Fähigkeit der Migration von Tumorzellen durch einen mit Matrigel beschichteten Polycarbonatfilter kann für eine Aussage über die Invasivität der Zellen genutzt werden. Dabei simuliert das Matrigel die Basallamina (extrazelluläre Matrix). Das Matrigel ist eine lösliche Basallamina-Präparation aus dem Engelberth-Holm-Swarm (EHS)-Maus-Sarcom und besteht aus Laminin, Kollagen Typ IV, Heparan-Sulfat-Proteoglykane und Entactin. Zudem enthält es Wachstumsfaktoren, einschließlich TGF- β und FGF. Das Funktionsprinzip des Assays beruht auf der Migration der Tumorzellen durch das Matrigel, welche durch einen EGF/Serum-Konzentrationsgradienten ausgelöst wird.

Zur Durchführung des Invasionsassays wurden BioCoat™Matrigel™ Invasionskammern der Firma BD (Bedford, England) verwendet. Der Polycarbonatfilter, welcher als Träger für das Matrigel dient, wies eine Porengröße von 8 μ M auf. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst wie unter 2.10.3 und 2.10.4 beschrieben trypsinisiert und ausgezählt, um anschließend eine Zellsuspension von 5×10^4 Zellen/ml DMEM-Medium (ohne Zusätze) herzustellen. Es wurden 500 μ l dieser Suspension in die bereits rehydrierten Invasionskammern gegeben. Das untere Kompartiment enthielt Vollmedium (siehe 2.2.1) und 20 ng/ml EGF. Die Invasionskammer wurde anschließend für 23 Stunden bei 37°C und 5% C O₂ Atmosphäre inkubiert.

Die Auswertung erfolgte durch eine Toluidin-Färbung und anschließende Auszählung der invasiven Zellen.

Dazu wurden die nicht invasiven Zellen (oberes Kompartiment) zunächst mit einem Wattebausch entfernt. Die sich auf der untern Seite des mit Matrigel beschichteten Polycarbonatfilters befindlichen invasiven Zellen wurden 2 min mit 100% Methanol fixiert, 2 min mit Toluidin (0,1% Toluidinblau, 0,1% Natrium Tetraborat in dH₂O) gefärbt, zweimal mit dH₂O gewaschen und im Anschluss daran luftgetrocknet. Der Polycarbonatfilter wurde anschließend mit einem Skalpell aus der Invasionskammer gelöst und auf dem Objektträger in Immersionsöl (Zeiss) eingebettet. Die invasiven Zellen konnten anschließend ausgezählt und dokumentiert werden.

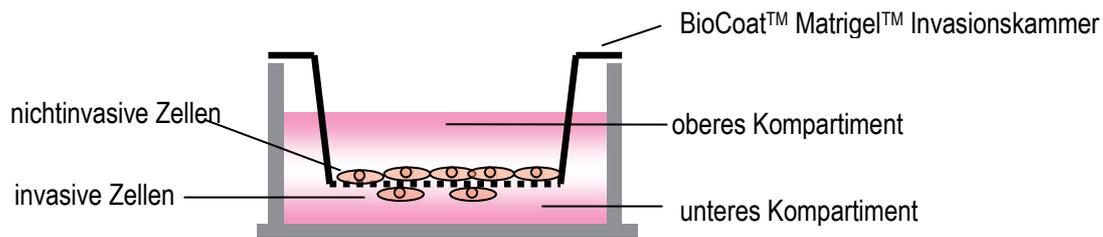


Abb.2.1: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Matrigel Invasionsassays

2.15 Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen

Zur Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen wurde ein modifizierter RIPA-Puffer verwendet (s.u.). Die pelletierten Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von eiskaltem RIPA-Puffer und einer 30-minütigen Inkubation auf Eis. Das Zelllysate wurde anschließend für 15 min bei 14.000 *g* und 4°C zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in neue Zentrifugationsgefäße wurde ein Aliquot für die Bestimmung der Proteinkonzentration (2.17) verwendet.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, ad 100 ml dH₂O; 10 ml-Aliquots gelagert bei -20°C. Nach dem Auftauen Zugabe einer Protease-Inhibitortablette (Roche, Mannheim)

2.16 Subzelluläre Fraktionierung

Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, und anschließend in HB-Puffer (s.u.) resuspendiert und anschließend für 1 min bei 150 *g* in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Lysispuffer aufgenommen und die Probe 10 min auf Eis inkubiert und dabei mehrfach invertiert. Nach anschließender Zentrifugation (15.000 *g*; 4°C; 5 min) wurde der Überstand (cytosolische Fraktion) abgenommen. Das Pellet wurde mit Lysispuffer gewaschen und 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut gewaschen. Das Kernpellet wurde anschließend in Puffer C resuspendiert und für 15 min auf Eis zu inkubiert. Dabei wurde die Probe jede Minute kurz gevortext. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen (nucleäre Fraktion).

Für die subzelluläre Fraktionierung der Leukozyten wurden diese zunächst mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) gewaschen, bei 500 *g* für 8 min zentrifugiert und das Volumen des Pellets bestimmt (PZ). Das Pellet wurde in 4PZ-Volumen Puffer A (s.u.) aufgenommen und die Zellen solange auf Eis inkubiert, bis sie in dem hypotonischen Puffer angeschwollen waren. Dieser Vorgang wurde durch regelmäßige Kontrolle im

Lichtmikroskop überprüft und nahm zwischen 15 und 30 min in Anspruch. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (500 g, 8 min), das Volumen der geschwollenen Zellen bestimmt (SPZ) und 2 SPZ-Volumen hinzu gegeben. Anschließend wurde die Suspension in einen vorgekühlten Glashomogenisator (Watson, 7 ml) mit lose sitzendem Pistell überführt und homogenisiert. Nach der Zentrifugation (1800 g, 15 min) wurde der Überstand (Cytoplasma) abgenommen und zentrifugiert (100000 g, Ultrazentrifuge). Das Pellet (Zellkerne) wurden in einem kleinen Volumen Puffer A resuspendiert und auf 30 ml 1,8 M Sucrose (in Puffer A) gegeben. Anschließend wurden die Kerne 45 min bei 3000 g im Ausschwenkrotor (Beckman, SW41) zentrifugiert. Die Sucrose wurde durch einen Waschschrift mit mindestens 10 Kernvolumen Puffer A entfernt. Die Kernproteine wurden anschließend mit Puffer C extrahiert.

Die Trennung der Kern- und Cytoplasma-Fractionen wurde durch Immunnachweise von Histon H₃, als nucleäres Protein und GAPDH, als cytoplasmatische Protein, kontrolliert.

HB-Puffer : 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,4; 4 μl/ml Proteaseinhibitor (Sigma, München)

Lysis-Puffer: HB-Puffer + 0,4% NP-40

Puffer C: 20 mM HEPES-HCl, 400 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT; pH 7,9 4μl/ml Proteaseinhibitor (Sigma, München)

Puffer A: 10 mM tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, pH 7,3

Sucrose-Lösung: 1,8 M Sugrose in Puffer A

2.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration einer Lösung wurde mit dem BioRad „protein assay“ nach Bradford [Bradford, 1976] oder mit dem Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (BioRad, München) durchgeführt. Die Proteinbestimmung mit dem Quick Start Kit erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Bei dem „protein assay“ von BioRad wurde ein Konzentrat des Farbstoffs „Coomassie Brilliant Blue G 250“ verwendet. Vor jeder Messung wurde eine Messung von einer proteinfreien Kontroll-Lösung mit Bradford-Reagenz als Referenz durchgeführt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA) in einer Ausgangskonzentration von 0,5 mg/ml. Die photometrische Messung erfolgte bei 595nm in einem Spektrophotometer (DU®-64-Spektrophotometer, Beckman).

2.18 Auftrennung und Nachweis von Proteinen:

2.18.1 Proteinpräzipitation

Für die Fällung von Proteinen zur Konzentrierung bzw. Verkleinerung proteinhaltiger Volumina wurde die TCA-Fällung genutzt. Dazu wurden die Proben auf eine 12%-ige TCA Konzentration eingestellt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden im Anschluss bei 16.000 *g* und 4°C für 45 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit gekühltem (–20°C) Aceton gewaschen, für 30 min auf Eis inkubiert und erneut pelletiert. Die Proteine wurden bei –80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren oder in Probenpuffer (s.u.) aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert.

2.18.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte horizontal mit vorgefertigten Streifen (GE Healthcare, Freiburg) mit einem linearen pH-Gradienten von 4-7 und einer Länge von 18 cm nach den Angaben des Herstellers.

Vor dem Lauf wurden die Streifen für ca. 19 h bei 20 °C mit Probenpuffer mit der Proteinprobe rehydratisiert. Anschließend wurden die Strips mit Mineralöl überschichtet und die isoelektrische Fokussierung im IPGphor (GE Healthcare, Freiburg) gestartet. Die Programme sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tabelle 2.9: Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung:

Programm 1: über Tag; 18 cm Streifen, pH 4-7			
Schritt	Volt	Anstieg	Zeit (h)
1	0-500	Linear	0:01
2	500-3500	Linear	1:30
3	3500		7:30
4	3500-500	Linear	0:30
Programm 2: über Nacht; 18 cm Streifen, pH 4-7			
1	0-500	Linear	0:01
2	500		6:00
3	500-3500	Linear	1:30
4	3500		7:00
5	3500-500	Linear	0:30

Vor der SDS-PAGE wurden die Streifen für 15 min in Equilibrierungspuffer mit DTT (10 mg/ml) und anschließend 15 min in Equilibrierungspuffer mit Iodoacetamid (25 mg/ml) inkubiert.

- Probenpuffer:** 7 M Urea, 2 M Thiourea, 0,5 % CHAPS, 0,5 % Asb-14, 0,002 % Bromphenolblau
- Equilibrierungspuffer:** 50 mM Tris-HCl, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerol, 2 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, pH 8,8. Zugabe von DTT (10 mg/ml) bzw. Iodoacetamid (25 mg/ml).

2.18.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde entweder mit einer Minigel-Apparatur für vertikale Plattengele (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) nach einer modifizierten Methode von Laemmli [Laemmli, 1970] durchgeführt oder als zweite Dimension, nach der isoelektrischen Fokussierung mit der Protean II-Apparatur der Firma BioRad (München). Die Trenngele enthielten 15% Acrylamid, 0,13 % BisAcrylamid, 0,38 M Tris-HCl, 0,1 % SDS, 10 % Glycin, 0,07 % Ammoniumpersulfat (APS) und 0,067 % N'N'N'N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (pH 8,8); die Sammelgele 4,8 % Acrylamid, 0,176 % BisAcrylamid, 0,1 % SDS, 0,125 M Tris-HCl, 0,1 % APS und 0,1 % TEMED (pH 6,8). Bei der SDS-Gelelektrophorese, als zweite Dimension wurde auf das Sammelgel verzichtet. Die Elektrophorese erfolgte (unter Verwendung des SDS-Elektrophoresepuffers) bei den Minigelen für 1,5 h bei konstanter Spannung (100 V), bei den großen Gelen bei 4°C für 16 h und 100 V, welche von einem Spannungsgeräte (PowerPac 300 Power Supply, BioRad, München) erzeugt wurde.

SDS-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

2.18.4 Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte durch die Coomassie Brilliant Blue Färbung nach Heukeshoven (Heukeshoven and Dernick, 1988). Dazu wurden die Gele 30 min fixiert und anschließend in der Färbelösung über Nacht inkubiert. Die Entfärbung erfolgte für einige h mit 10 % Essigsäure (in dH₂O). Die Gele wurden wie unter 2.18.6 beschrieben dokumentiert und anschließend in der Entfärbelösung aufbewahrt.

- Fixierer:** 10 % Essigsäure, 30 % Ethanol (in dH₂O)
- Färbelösung:** 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G250, 10 % Methanol, 10 % Essigsäure, 5 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung
- Entfärber:** 10% Essigsäure (in dH₂O)

2.18.5 Western Blot und immunologische Detektion

Für die Immunfärbung wurden die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond, GE Healthcare, Freiburg) transferiert. Der

Elektroblot erfolgte unter Verwendung des Transferpuffers (s.u.) im Nass Blot-Verfahren, gekühlt für 45 -75 min (je nach Geldicke). Das Filterpapier, das Polyacrylamidgel und die Nitrocellulosemembran wurden zuvor 10 min im Transferpuffer inkubiert.

Zur Kontrolle wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Blot mit einer Ponceau S-Lösung (Sigma Diagnostics®, München) angefärbt und anschließend mit TBS entfärbt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Nitrocellulose-Membran für mindestens 45 min mit Western Blocker Solution (Sigma, München) abgedeckt.

Die verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind in Tabelle 2.10 aufgelistet. Für die immunologische Detektion wurden mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper und das ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach der Inkubation mit dem Erst- und Zweitantikörper, wurde die Membran mit TBS-T (3 x 10 min) gewaschen.

Transferpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
TBS	10 mM Tris-HCl, 150mM NaCl; pH 8,0
TBS-T	TBS + 0.05% Tween 20

Tabelle 2.10: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Erst-Antikörper	Verdünnung	Zweit-Antikörper	Verdünnung
a-CapG	1:2500	a-Kaninchen IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	1:2500
α-Tubulin	1:4000	a- Kaninchen IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	1:4000
GapDH	1:5000	a-Huhn-Avidin (anschl. Zugabe von Biotin-HRP)	1:10000
Histon H₃	1:2000	a-Kaninchen IgG gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase	1:2500

2.18.6 Dokumentation und Auswertung

Zur Exposition wurden die Nitrocellulosemembranen nach der Inkubation mit der ECL-Lösung zwischen Filterpapier getrocknet und zwischen Kopierfolie in die Kassette gelegt. Die Expositionszeiten lagen zwischen 30 s und 5 min. Nach der Exposition wurden die Filme (Hyperfilm, GE Healthcare, Freiburg) solange in der Entwicklerlösung (Kodak) inkubiert, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Der Film wurde ausreichend gewässert und anschließend fixiert (Fertiglösung, Kodak). Nach erneutem Wässern wurde der Film getrocknet und wie auch die Gele mit einer Digital-Kamera fotografiert.

Die Schwärzung des Hyperfilms wurde durch Bestimmung der Pixel mit dem Programm Un-Scan-it (Silk Scientific, Utha, USA) bestimmt.

2.19 Aufreinigung von CapG aus menschlichen Leukozyten

2.19.1 Isolierung von Lymphozyten und Monozyten aus Buffy Coat

Als Buffy Coat wird eine Leukozyten-angereicherte Fraktion bezeichnet, welche nach dem Abzentrifugieren von Vollblut und der Abnahme des Blutplasmas und der Erythrozyten entsteht. Mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque, GE Healthcare, Deutschland) lassen sich die mononukleären Zellen des peripheren Blutes isolieren. Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Zelldichte besitzen. Zur Isolierung der Lymphozyten und Monozyten wurde das Lymphozytenkonzentrat (bezogen von der Blutspendezentrale Düsseldorf) zunächst mit gleicher Menge PBS (PAA, Pasching, Österreich) verdünnt. 15 ml Ficoll wurden anschließend mit 30 ml des Buffy Coat-PBS Gemisches überschichtet. Durch eine Zentrifugation (1200 *g*; 75 min; 4°C) im Ausschwenkrotor wurden die Monozyten und Lymphozyten von den restlichen Bestandteilen des peripheren Blutes getrennt, lagerten sich als Bande über dem Ficoll an und konnten abgenommen werden. Die Mono- und Lymphozyten wurden mit PBS verdünnt und pelletiert (30 min, 4°C, 3500 *g*) und anschließend nochmals mit PBS gewaschen und die Zellen für 30 min bei 4 °C und 35 00 *g* im Ausschwenkrotor pelletiert. Die Zellen wurden entweder direkt aufgeschlossen, oder für die weitere Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.19.2 Anreicherung von CapG mittels Phenylsepharose-Chromatographie

Die Zellen wurde in 2-fachem Volumen RAW-Extraktionspuffer (s.u.) aufgenommen und mit einem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert (30x). Zum Homogenat wurde das gleiche Volumen Extraktionspuffer ohne Triton-X-100 gegeben. Die Zelltrümmer wurden 1 h bei 50.000 *g* und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine 30 %-ige Ammoniumsulfatsättigung eingestellt und die präzipitierten Proteine nach 30 min in der Ultrazentrifuge bei 27.000 *g* und 4 °C für 30 min pelletiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Johnston et al. (1990). Das Pellet wurde in RAW-Extraktionspuffer aufgenommen und über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert. Im Anschluss wurde das Dialysat auf 3 mM Ca²⁺ eingestellt und auf die mit Hoch-Salz-Puffer equilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule zunächst mit Hoch-Salz-Puffer und im Anschluss mit Niedrig-Salz-Puffer gewaschen. Danach wurde CapG mit Elutionspuffer von der Säule eluiert.

Die Fraktionen mit einer Proteinkonzentration über 0,1 mg/ml wurden vereint und mittels Ultrafiltration (Centricons; MWCO 12 kDa; Millipore, Schwalbach) konzentriert.

RAW-Extraktionspuffer: 10 mM HEPES-NaOH; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA, 1 mM PMSF; pH 7,4

Hoch-Salz-Puffer: 10 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,3

Niedrig-Salz-Puffer: 10 mM HEPES-NaOH, 10 mM Tris, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,3

Elutionspuffer : 10 mM HEPES, 10 mM Tris-HCL, 10 mM EGTA, pH 7,3

2.19.3 Weitere Anreicherung von CapG durch Anionenaustauscher-Chromatographie

Für die weitere Aufreinigung von CapG durch die Anionenaustauscher-Chromatographie wurde eine MonoQ-Säule (GE Healthcare, Freiburg) verwendet, die gemäß den Angaben des Herstellers vorbereitet wurde. Die vereinigten Proben der Phenylsepharose wurden über Nacht gegen MonoQ-Puffer (ohne KCl) dialysiert. Die Säule wurde vor Gebrauch mit diesem Puffer equilibriert. Die Probe wurde mit einer Flussrate von 0.25 ml/min auf die Säule aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch einen KCl-Gradient von 0-100 mM KCl über 50 ml, von 100-500 mM KCl über 25 ml und von 500-1000 mM KCl über 10 ml, mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und einer Fraktionsgröße von 1ml.

MonoQ-Puffer: 10 mM HEPES-NaOH; 10 mM Tris; pH 7,8
100 mM bzw. 1 M KCl zugesetzt.

2.20 Phosphatase-Behandlung

Ein Teil der durch Phenyl-Sepharose angereicherten Proteine wurde mit alkalischer Phosphatase (Sigma Diagnostics, München) behandelt. Dazu wurde die Probe auf eine Endkonzentration von 1mg/ml mit AP-Puffer verdünnt und mit 10 U alkalischer Phosphatase pro mg Protein für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch eine Inkubation für 5 min bei 95°C gestoppt.

AP-Puffer: 50 mM Tris-HCl; 1 mM MgCl₂, pH 9,8

2.21 ESI-MS/MS-Analysen

2.21.1 Tryptischer im-Gel-Verdau

Beim tryptischen Verdau erschweren Verunreinigungen, vor allem die mit Keratin erheblich die massenspektrometrische Analyse der eigentlichen Probe. Daher müssen zum Schutz der Proben vor Keratin geeignete Vorsichtsmaßnahmen (Handschuhe, Kittel etc.) getroffen werden. Der im-Gel-Verdau besteht aus drei Schritten. Zunächst muss das Gelstück entsalzt und entfärbt und die Proteine tryptisch verdaut werden um anschließend

die Peptide aus dem Gel eluieren zu können. Zunächst wurden die Proteinspots aus dem Gel und anschließend in ca 1mm³ große Stücke geschnitten. Nach dem Überführen in silikonisierte Reaktionsgefäßen wurden die Gelstücke entfärbt, anschließend 1 x 10 min und 4 x 30 min mit Waschpuffer 1 und 1 x 30 min mit Waschpuffer 2 gewaschen. Die Gelstücke wurden dann für mind. 30 min in einer Vakuum Zentrifuge (SeedVac, Thermo Scientific, Dreieich) getrocknet.

Zum Proteinverdau wurden die getrockneten Gelstücke in einem Volumen eiskalter Trypsinlösung für 30 min auf Eis quellen gelassen. Nach Abnahme der Trypsinlösung wurden die Gelstücke mit Trypsinpuffer überschichtet und für 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

Die Gelstücke wurden nach der Inkubation bei 10000 g abzentrifugiert, mit 2 Volumen Wasser für 5 min geschüttelt und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10000 g) wurde der Überstand ebenfalls gesammelt, die Gelstücke 3 x mit 1 Volumen Elutionspuffer für 30 min geschüttelt und die Überstände gesammelt. Zuletzt wurden die Gelstücke mit 1 Volumen Acetonitril 30 min geschüttelt und der Überstand nach Zentrifugation mit den anderen vereint und in einer Vakuum-Zentrifuge bis zur Trocknung eingengt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die getrockneten Peptide bei -20°C eingefroren.

2.21.2 Direkter tryptischer Verdau

Die Proteine wurden zunächst in der Vakuumzentrifuge (SeedVac, Thermo Scientific, Dreieich) eingengt und dann in Trypsin-Lösungspuffer (s.u.) aufgenommen. Mit der Trypsin-Lösung wird ein Trypsin zu Protein-Verhältnis von 20:1 eingestellt und die Lösung für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wird für 10 min bei 95°C gestoppt und anschließend in der Vakuum-Zentrifuge (SpeedVac, Thermo Scientific, Dreieich), bis zur kompletten Trocknung eingengt.

Entfärber:	10% Essigsäure (in dH ₂ O)
Waschpuffer 1:	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50% Acetonitril
Waschpuffer 2:	100% Acetonitril
Trypsinpuffer:	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Trypsinlösung:	0,1 µg/µl Trypsin in Trypsin-Lösungspuffer
Elutionspuffer:	50% Acetonitril, 5% Ammeisensäure, 45 % Milli-Q-Wasser

2.21.3 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Die ESI-MS/MS-Analysen wurden in Kooperation mit Frau Metzger im analytischen Zentrallabor durchgeführt.

Die Analyse der Modifikationen erfolgte mit dem ESI-QqTOF, Q-Star XL (Applied Biosystem) und mit den Programmen: Analyst, GPMaw und Mascot.

2.22 Fluorimetrische Bestimmung der Capping-Aktivität

Für die Anwendung dieser Untersuchungsmethode wird Actin mit dem fluoreszierenden Reagenzien N-(1-pyrenyl)iodoacetamid (kurz: Pyren-Actin) gekoppelt [Kouyama and Mitashi, 1981]. Die Verwendung von Pyren-Actin macht es möglich den Übergang von G-Actin zu F-Actin zeitlich zu verfolgen, da sich Absorptions- und Emissionsspektrum dieser beiden Actinzustände unterscheiden. Das eingesetzte Pyren-Actin wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Horst Hinssen, Institut für Biochemische Zellbiologie der Universität Bielefeld, zur Verfügung gestellt. Die Messungen wurden bei 20°C in einem F-3010 Fluoreszenz Spektrophotometer (Hitachi, Feldkirchen) durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda = 365$ nm, die Fluoreszenz wurde bei $\lambda = 407$ nm gemessen. Das Probenvolumen betrug 1ml. Zur Bestimmung der Capping-Aktivität wurden über Nacht Actin-Kerne (900nM) in F-Puffer polymerisiert. Dies entspricht 360 μg G-Actin in 10 ml F-Puffer. Dadurch entstehen kurze Actin-Filamente, die durch die Bindung von CapG am schnell-wachsenden Ende am Wachstum gehindert werden. Für die Messung wurde die CapG-Probe mit 190 μg G-Actin sowie 40 μg Pyren-Actin versehen, gemischt und 400 – 900 μl der 900 nM Actin-Kern-Lösung zugegeben.

F-Puffer: 10 mM Imidazol-HCl, 1 mM ATP, 0,3 mM CaCl_2 , 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 ; pH 7,4

3. Ergebnisse

3.1 Erhöhte CapG Expression in Mammakarzinom-Zelllinien

Um die Bedeutung von CapG beim Mammakarzinom (MaCa) zu untersuchen, wurde zunächst mittels Real-Time PCR (2.5) die CapG-Expression in verschiedenen MaCa-Zelllinien charakterisiert. Die etablierten Zelllinien wurden als Modellsystem für die Untersuchungen zur Bedeutung von CapG beim MaCa verwendet, da sich diese durch unbegrenzte Lebensdauer und leichte Kultivierung auch für anschließende funktionelle Analysen sehr gut eignen.

Die Auswertung der Real-Time PCR-Daten erfolgte über die Ermittlung der Ct-Werte, wodurch unter Verwendung der Δ Ct-Methode die relative Expressionen von CapG und Actin im Verhältnis zu der von GAPDH (=1), welches als interne Kontrolle diente, ermittelt werden konnten.

Actin zeigte keine großen Abweichungen in der Expression innerhalb der verschiedenen Zelllinien. Im Gegensatz dazu konnten in den MaCa-Zelllinien Unterschiede in der CapG-Expression bis zu einem Faktor von 150 nachgewiesen werden. Die höchste CapG-Expression wies die Zelllinie MDA-MB 231, die geringste die Zelllinie ZR-75-1 auf. Im Vergleich zur MCF-12A (humane Mammakarzinom-Zelllinie) zeigten vier (MCF-7, T-47D, MDA-MB 463 und MDA-MB 231) von sieben Zelllinien eine erhöhte CapG-Expression.

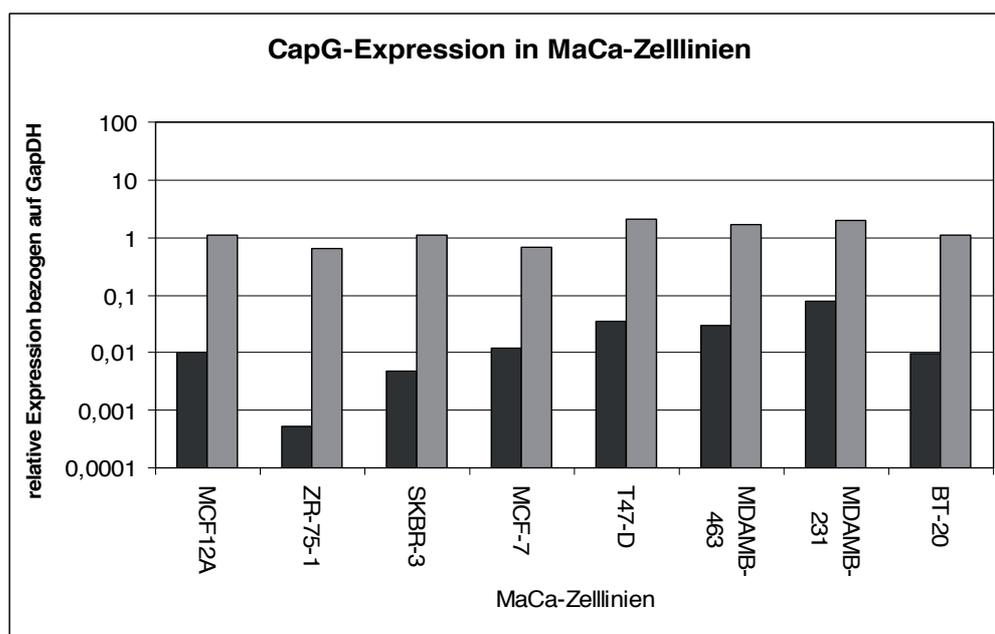


Abb.3.1: Relative Expression von CapG (dunkle Balken) und Actin (helle Balken) in MaCa-Zelllinien. Die Real-Time PCR wurde mit cDNA aus verschiedenen MaCa-Zelllinien durchgeführt. Pro PCR-Ansatz wurden 65 ng cDNA eingesetzt. GAPDH diente als Housekeeping-Gen. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Ermittlung des Δ Ct-Wertes.

Die BT-20 Zellen, weisen eine zehnfach geringere RNA-Menge von CapG auf als die MDA-MB 231 Zellen und werden im Gegensatz zu den MDA-MB 231 Zellen als vergleichsweise gering invasiv beschrieben. Zudem boten sich die beiden Zelllinien aus praktischen Gründen (Verfügbarkeit, Kultivierungsbedingungen etc.) für die weiteren Analysen an.

3.2 Invasivität von MaCa-Zelllinien korreliert mit der CapG-Expression

Für die Untersuchung des Einflusses der CapG-Expression auf die Invasivität wurde die Expression von CapG in der MDA-MB 231-Zelllinie unterdrückt, die Menge an CapG in den BT-20 Zellen erhöht und im Anschluss die Auswirkung der veränderten CapG-Expression auf die Invasivität analysiert.

Die geringe CapG-Expression in den BT-20 Zellen konnte durch virale Transfektion (2.12) deutlich erhöht werden. Mittels Western Blot und anschließender Intensitätsbestimmung der Banden konnte eine Zunahme der CapG-Proteinmenge in den BT-20 Zellen auf das sechsfache nachgewiesen werden (Abb.3.3b).

Für die Unterdrückung der Expression von CapG bei der Zelllinie MDA-MB 231 wurden drei verschiedene kommerziell erwerbbar siRNAs in unterschiedlichen Konzentrationen und Zeitabständen getestet. Die verschiedenen siRNAs weisen unterschiedliche Bindungsstellen in der CapG-RNA Sequenz auf. Dabei ist die siRNA1 komplementär zu den Basen 335-373 (Exon 6) der mRNA Sequenz. Die siRNAs2 und 3 binden in den Bereichen der Basen 621-639 (Exon 8) bzw. 759-776 (Exon 9).

Bei allen siRNAs zeigte sich 24 Stunden nach der transienten Transfektion (2.13) bereits eine deutliche Reduktion der CapG-Expression, die bei der siRNA1 nach drei Tagen Inkubationszeit am deutlichsten zunahm. Eine anscheinend 100%-ige Reduktion der CapG-Expression konnte fünf Tage nach Zugabe der siRNA1 erreicht werden (Abb.3.2a). Nach acht Tagen konnte bei allen Proben wieder eine Zunahme des CapG-Proteins nachgewiesen werden, die jedoch bei der mit siRNA1 behandelten Probe am schwächsten ausfiel.

Durch die siRNAs 2, 3 und der Kombination aller drei siRNAs konnte (vor allem nicht in dem Zeitraum von drei bis acht Tagen) keine so deutliche Unterdrückung der CapG-Expression erreicht werden.

Weitere Versuche zeigten, dass eine 100%-ige Unterdrückung der CapG-Expression nach fünf Tagen bereits mit einer 12,5 nM siRNA1-Lösung möglich war. Bei der Behandlung der MDA-MB 231 Zellen mit einer 10 nM siRNA1-Lösung war hingegen keine vollkommene Unterdrückung der CapG-Expression möglich (Tab. 3.1). Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche eine 12,5 nM siRNA1-Lösung verwendet.

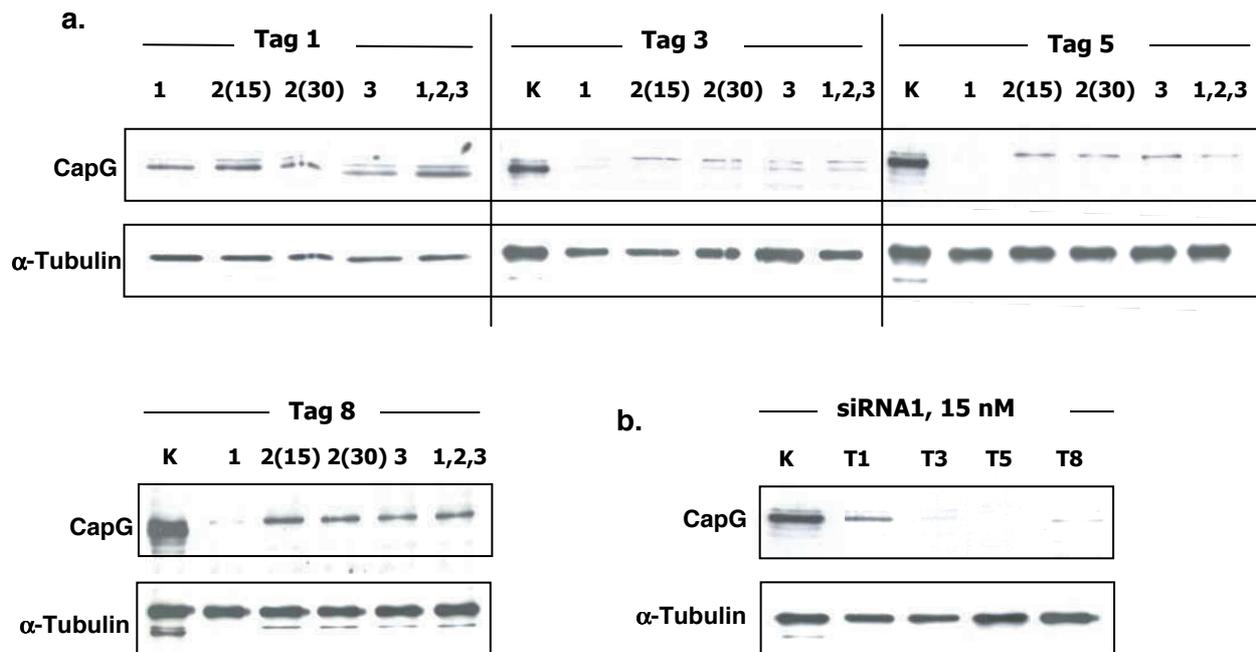


Abb.3.2: Unterdrückung der CapG-Expression bei der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231.

a. Die MaCa-Zelllinie MDA-MB 231 wurde mit drei verschiedenen siRNAs (1, 2 und 3) in verschiedenen Konzentrationen (15 und 30 nM; in Kombination je 5 nM) und Zeitabständen (Tag 1 bis Tag 8) transfiziert. Die CapG Expression wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Als Ladungskontrolle diente α -Tubulin. Es wurden je 20 μ g Protein aufgetragen: K= Kontrolle (MDA-MB 231 ohne siRNA); **1** = MDA-MB 231 + siRNA1, 15 nM; **2(15)** = MDA-MB 231 + siRNA 2, 15 nM; **2(30)** = MDA-MB 231 + siRNA 2, 30 nM; **3** = MDA-MB 231 + siRNA 3, 15 nM; **1,2,3** = MDA-MB 231 + siRNA1,2,3 je 5 nM.

Die stärkste Unterdrückung der CapG-Expression konnte fünf Tage nach der Transfektion der siRNA1 in einer Konzentration von 15 nM erreicht werden. Bei den anderen siRNAs und bei der Kombination der siRNAs kommt es ebenfalls zu einer deutlich geringeren CapG-Expression, jedoch kann man nach fünf Tagen noch CapG detektieren. Acht Tage nach der Transfektion nimmt die Menge an CapG wieder zu.

b. Auswirkung von siRNA1 (15 nM) auf die CapG-Expression nach 24 h (T1), 3 Tagen (T3), 5 Tagen (T5) und 8 Tagen (T8). Die CapG-Expression durch siRNA1 ist bereits nach einem Tag deutlich geringer und nimmt drei Tage nach der Transfektion noch deutlich ab, bis sie nach fünf Tagen nicht mehr nachweisbar ist. K = Kontrolle (MDA-MB 231 ohne siRNA1); als Ladungskontrolle diente α -Tubulin.

In Matrigel-Invasionsassays (2.14) wurden die MDA-MB 231 Zellen mit und ohne vorheriger siRNA-Behandlung und die Zelllinie BT-20 vor und nach der Erhöhung der CapG-Expression bezüglich ihres Invasionspotentials getestet. Die BT-20 Zellen zeigten nur einen sehr geringen Anteil an invasiven Zellen. Im Durchschnitt konnten nur 55 von $2,5 \times 10^4$ Zellen die Kollagenmatrix innerhalb von 22 Stunden passieren und so auf der Membranunterseite mittels Toluidinblau-Färbung sichtbar gemacht werden. Die Anzahl invasiver BT-20 Zellen konnte jedoch durch eine Erhöhung der CapG-Expression nach stabiler Transfektion auf das ca. dreifache gesteigert werden.

Zudem nahm die Invasivität der MDA-MB 231 Zellen durch eine Reduktion der CapG-Expression deutlich ab. Das Invasionspotential der Zelllinie konnte durch Unterdrückung der CapG Expression auf 12,5 % reduziert werden.

Die angegebenen Werte beruhen auf einer quantitative Auswertung von insgesamt vier unabhängigen Versuchsreihen.

Weitere Versuche mit verschiedenen siRNA1-Konzentrationen (2,5 nM -12,5 nM) machten deutlich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der CapG-Menge und dem Invasionspotential der Zelllinie MDA-MB 231 besteht (Tab. 3.1). Nach einer fünf-tägigen

Behandlung mit einer 2,5 nM siRNA1-Lösung lag die Menge an CapG bei ca. 40% und die der invasiven MDA-MB 231 Zellen noch bei 62% (bezogen auf die Kontrolle MDA-MB 231 ohne siRNA1). Die CapG-Expression konnte hingegen nach einer 5 nM, 7,5 nM und 10 nM siRNA1-Behandlung auf 25%, 15 % bzw. 6 % reduziert werden. Das Invasionspotential der mit 5 nM, 7,5 nM und 10 nM siRNA1-Lösung behandelten MDA-MB 231 Zellen lag bei 51%, 30% und 23%. Die anscheinend 100%-ige Unterdrückung der CapG-Expression durch die 12,5 nM siRNA1-Lösung führte zu einer Reduktion der invasiven Zellen auf ca. 13%, wie oben bereits beschrieben.

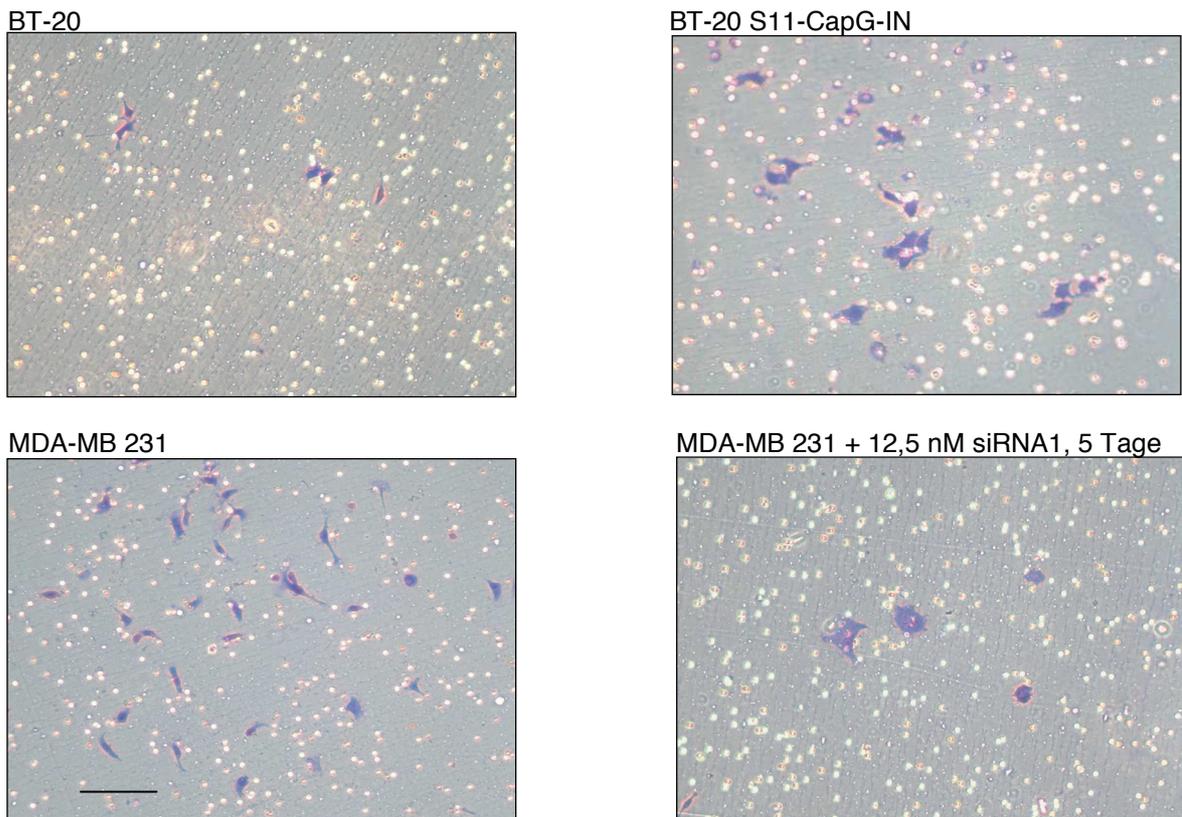


Abb.3.3a: Färbung der invasiven Zellen nach Matrigel-Invasionsassay. Ein Teil der MDA-MB 231 Zellen wurde vor dem Invasionsassay für 5 Tage mit siRNA1 (12,5 nM) behandelt. Von jeder Zelllinie wurden 25.000 Zellen in das obere Kompartiment eingesät und nach 22 Stunden die invasiven Zellen fixiert und gefärbt. Bei der MDA-MB 231 Zelllinie nimmt die Anzahl der invasiven Zellen durch die siRNA1-Behandlung deutlich ab (weniger Zellen auf der Membranunterseite). Die Anzahl der gefärbten BT-20 Zellen auf der Membranunterseite (invasive Zellen) nimmt hingegen durch die erhöhte CapG-Expression zu.

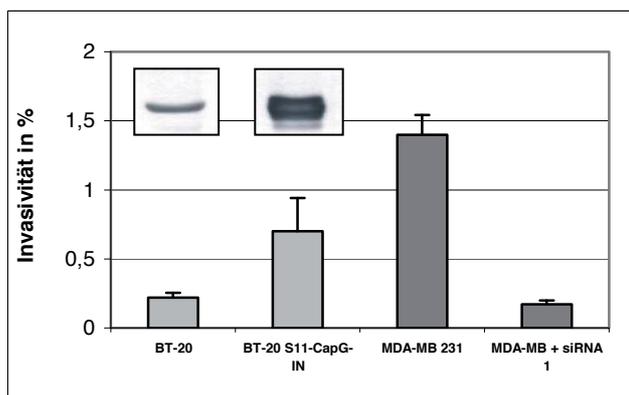


Abb.3.3b: Einfluss der CapG-Expression auf die Invasivität ausgewählter MaCa-Zelllinien: Es wird deutlich, dass durch Erhöhung der CapG-Expression in der zunächst gering invasiven Zelllinie BT-20 (der Anteil der invasiven Zellen deutlich erhöht werden konnte. Im Gegensatz dazu führt die Unterdrückung der CapG-Expression bei den MDA-MB 231 Zellen zu einer deutlichen Abnahme der invasiven Zellen.

Tabelle 3.1: Invasionspotential der Zelllinie MDA-MB 231 korreliert mit der CapG-Expression: Durch die Reduktion der exprimierten CapG-Menge mittels siRNA1-Behandlung (2,5-12,5 nM) nimmt auch die Invasivität der Zellen ab.

siRNA1-Konz. [nM]	0	2,5	5	7,5	10	12,5
CapG-Expression bezogen auf Kontrolle	100	40	25	15	6	0
Invasive Zellen [%] bezogen auf Kontrolle	100	62	51	30	23	13

3.3 Invasive Zellen weisen hohen nucleären Anteil an CapG auf

Die Untersuchung zur Verteilung von CapG erfolgte nach subzellulärer Fraktionierung (2.16) mittels Immunoblot-Analyse.

Die Versuche zeigten eine unterschiedliche Verteilung von CapG in den MaCa-Zelllinien MDA-MB 231 und BT-20 (Abb.3.4). Im Gegensatz zu MDA-MB 231, bei der ungefähr 50% des CapG Proteins im Zellkern nachgewiesen werden konnte, zeigte die nucleäre Fraktion der BT-20 Zellen auch nach dem Auftragen von 60 μ g Proteinextrakt kein CapG. In den CapG überexprimierenden BT-20 Transfektanten, zeigte sich hingegen ein hoher Anteil an nucleärem CapG. Der Anteil an cytoplasmatischem CapG schien jedoch stärker anzusteigen, als der an nucleärem. Für die Kompartimentierungskontrolle wurden GAPDH, als cytosolischer Marker und Histon H3, als nucleärer Marker verwendet. Nach der subzellulären Fraktionierung konnte nur eine geringe Verunreinigung der nucleären Fraktion mit cytoplasmatischen Proteinen nachgewiesen werden. Zudem konnte kein H3 in der cytosolischen Fraktion mittels Western Blot identifiziert werden.

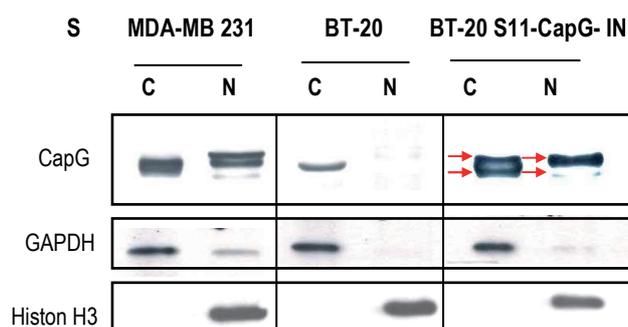


Abb.3.4: Unterschiedliche intrazelluläre Verteilung von CapG: Western Blot-Analysen zeigten eine unterschiedliche Verteilung von CapG in den untersuchten Zelllinien MDA-MB 231, BT-20 und BT-20 S11-CapG-IN. In den BT-20 Zellen konnte kein nucleäres CapG nachgewiesen werden, die MDA-MB 231 Zellen hingegen wiesen einen etwas höheren nucleären Anteil an CapG auf. Durch eine deutliche Erhöhung der CapG-Expression in der Zelllinie BT-20 (BT-20 S11-CapG-IN) konnte auch der Anteil an nucleärem CapG erhöht werden, jedoch schien der cytoplasmatische Anteil an CapG höher zu sein, als der nucleäre. Es konnten mehrere CapG-Banden detektiert werden, die in den beiden Kompartimenten unterschiedlich verteilt sind (rote Pfeile). GAPDH und Histon H3 wurden als cytosolische und nucleäre Marker genutzt. Die Kontrollen zeigten, dass nur ein geringer Anteil an cytoplasmatischen Proteinen in der nucleären Fraktion nachgewiesen werden konnte (schwache Banden von GAPDH in der nucleären Fraktion). Ebenfalls konnte kein H3 in den cytoplasmatischen Fraktionen nachgewiesen werden.

Durch den Western Blot wurden mehrere CapG-Banden (Abb. 3.4 rote Pfeile) detektiert, wodurch sich ein erster Hinweis auf unterschiedliche CapG-Varianten und deren Verteilung im Cytoplasma und Zellkern ergab. Um das genauer zu untersuchen wurde

eine weitere subzelluläre Fraktionierung mit anschließender Auftrennung der Fraktionen durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Bei der Fraktionierung dienten jedoch Leukozyten als Ausgangsmaterial, da diese in ausreichender Menge in kürzerer Zeit gewonnen werden konnten.

3.4 Unterschiedliche CapG-Varianten im Zellkern und Cytoplasma

Um eine saubere Trennung der cytoplasmatischen und nucleären Proteine voneinander zu erreichen wurden die Zellkerne bei dieser Fraktionierung über ein Sucrosekissen von den cytoplasmatischen Proteinen getrennt (2.16). Diese Methode ist zudem deutlich schonender für die Zellkerne, die dadurch nicht teilweise bereits während der Zentrifugation aufgebrochen werden wodurch sich die nucleären und cytoplasmatischen Proteinen mischen können. Die Anreicherung der Kerne durch die subzelluläre Fraktionierung wurde anschließend durch eine Methylenblaufärbung einer Probe des Kernpellets überprüft. Bei den Leukozyten konnten ebenfalls verschiedene Varianten in den beiden Fraktionen und ein hoher nucleärer CapG-Anteil nachgewiesen werden. Durch die Fraktionierung und die anschließende zwei-dimensionale Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass im Zellkern und Cytoplasma mehrere CapG-Varianten, mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten vorlagen, während die basischen Varianten (IP 6,07-5,98) nur im Cytoplasma nachgewiesen werden konnten (Abb.3.5). Eine Deutung dieser Varianten und der Grund für die unterschiedliche Verteilung waren zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, weshalb eine genauere Analyse der Varianten notwendig war.

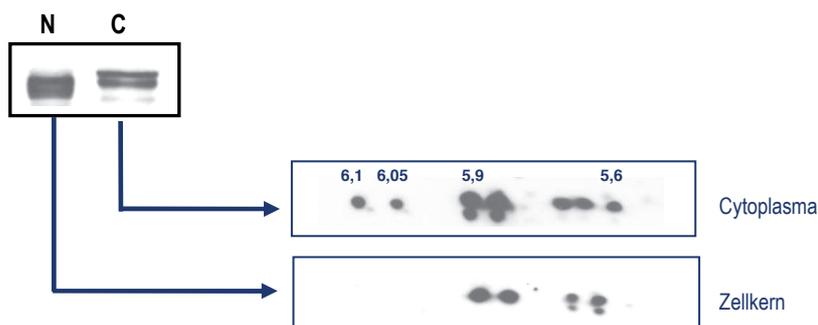


Abb.3.5: Subzelluläre Fraktionierung und Nachweis von CapG in Leukozyten: Die subzelluläre Fraktionierung und der anschließende Western Blot zeigten, dass die Leukozyten einen hohen nucleären CapG-Anteil (ca. 50 %) aufweisen. Durch die Auftrennung der nucleären und cytoplasmatischen Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass nur in der cytosolischen Fraktion die basischen CapG-Varianten mit den isoelektrischen Punkten von 6,1 und 6,05 vorlagen. Die Varianten mit den isoelektrischen Punkten von 5,9 bis 5,6 konnten in beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Der sauerste Spot ist zwar schwach, konnte aber stets (oft deutlicher) in der Zellkernfraktion nachgewiesen werden.

3.5 Posttranslationale Modifikation von CapG: Phosphorylierung

Bereits publizierte Daten deuten auf eine Phosphorylierung von CapG hin [Onoda and Yin, 1993]. Um zu überprüfen, ob es sich bei den saureren Varianten um CapG-Phosphorylierungsvarianten handelt, wurde eine Proteinextraktion von der Zelllinie MDA-MB 231 mit und ohne Phosphatase-Inhibitoren vorgenommen und die ohne Phosphatase-Inhibitoren extrahierten Proteine anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt (Abb.3.6). Zudem erfolgte eine direkte Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA). Werden die Zellen direkt in TCA aufgenommen kann es zu keiner Phosphorylierung und Dephosphorylierung des CapG-Proteins mehr kommen. Nach zwei-dimensionaler Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse zeigten sich bei den Proben der Proteinextraktion ohne Phosphatase-Inhibitoren und der Proteinextraktion mit TCA ähnliche Spotmuster der CapG-Varianten. Die Phosphatase-Behandlung der ohne Phosphatase-Inhibitor extrahierten Proteine führte zu einer Abnahme der sauren CapG-Varianten. Hingegen nahmen die sauren CapG-Varianten durch die Extraktion der Proteine mit Phosphatase-Inhibitoren zu. Durch die Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren bei der Proteinextraktion kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Kinasen und Phosphatasen zum Vorteil der Kinasen und so zu einer Zunahme der phosphorylierten CapG-Varianten. Die Phosphatase-Behandlung hingegen führt zu einer Abnahme der phosphorylierten Varianten. Dass es durch die Proteinextraktion ohne Inhibitoren zu keiner Abnahme der phosphorylierten CapG-Varianten kam, konnte durch eine direkte Aufnahme der Zellen in TCA gezeigt werden. Diese Ergebnisse machen eine Modifikation der sauren CapG-Varianten durch Phosphorylierung wahrscheinlich.

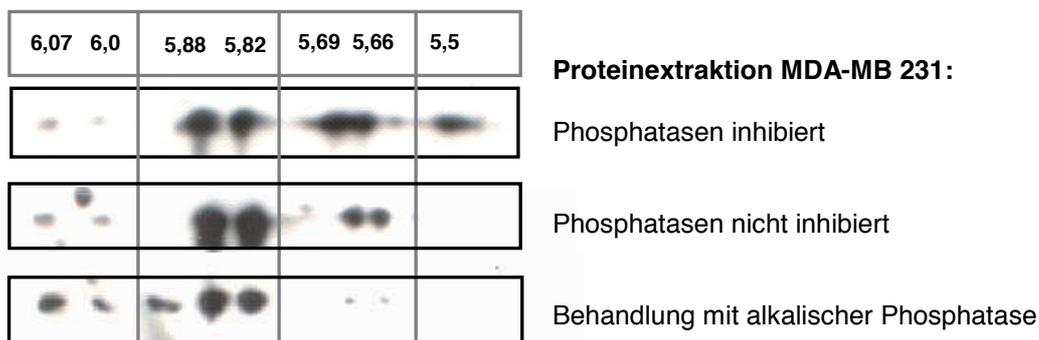


Abb.3.6: Nachweis der Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation von CapG: Durch die Proteinextraktion mit Phosphatase-Inhibitoren (Na_3VO_4 und NaF) nahm die Menge an sauren CapG-Varianten im Vergleich zu einer Phosphatasen-freien Extraktion zu, hingegen konnten diese Varianten durch eine Proteinextraktion und anschließende alkalische Phosphatase-Behandlung deutlich reduziert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Modifikation der sauren CapG-Varianten in Form von Phosphorylierung hin.

Der Anteil der vier basischen Varianten (IP: 6,07 6,0 5,88 und 5,82) nahmen bei der Veränderung des Phosphorylierungs-Grades durch Phosphatase-Behandlung nicht ab, so dass hier offenbar andere Modifikationen vorliegen.

3.6 Anreicherung von CapG für die massenspektrometrische Analyse

Da es sich bei CapG um ein Protein handelt, welches in Macrophagen hoch exprimiert wird, wären diese ein zweckdienliches Material zur CapG-Isolierung gewesen. Statt einer reinen Macrophagenfraktion standen jedoch nur Leukozyten und Thrombozyten reiche Fraktionen, die aus dem so genannte Buffy Coat aufgereinigt wurden, zur Verfügung. Real-Time PCR Analysen zeigten jedoch, dass auch die angereicherten Zellen eine hohe CapG-Expression aufweisen (0,5% des Gesamtproteins) und so ein geeignetes Ausgangsmaterial zur Isolierung des Proteins darstellen.

Nach der Anreicherung der Leukozyten erfolgten der Zellaufschluss und die Anreicherung von CapG durch eine Hydrophobizitäts-Interaktions-Chromatographie (HIC) über eine Phenylsepharose-Matrix.

Nach der Aufbereitung der Leukozyten (2.19.1) konnten aus ca. 20 ml bei 1000 g pelletierte Leukozyten 1,5 g lösliche Proteine isoliert werden. Nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und Dialyse wurde etwa ein Gramm Protein, wie von Johnston *et al.* (1990) beschrieben, durch Phenylsepharose aufgetrennt (2.19.2).

Die an die Phenylsepharose-Matrix gebundenen Proteine wurden bei der Elution fraktioniert gesammelt. Die Proteine eluierten in zwei diskreten Peaks. In den Abbildungen 3.7 und 3.8 ist eine Anreicherung von CapG durch HIC exemplarisch dargestellt.

In den Fraktionen des ersten Peaks konnte eine geringe Menge eines ca. 30 kDa großen Proteins durch SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Dieses Protein konnte neben 35 kDa, 45 kDa und 64 kDa Proteinen ebenfalls in den Fraktionen des zweiten Peaks identifiziert werden. Western Blot-Analysen zeigten, dass es sich bei dem 45 kDa Protein um CapG handelt. Die Fraktionen des zweiten Peaks, die eine Proteinkonzentration über 0,1 mg/ml aufwiesen, wurden vereint und mittels Ammoniumsulfatfällung konzentriert. Die Ausbeute des Eluats lag durchschnittlich bei 3,5 mg Protein. Durch die Auswertung des SDS-Gels wurde deutlich, dass der CapG-Anteil am Gesamt-Eluat ca. 30% betrug, die Ausbeute an CapG lag demnach bei etwa einem mg.

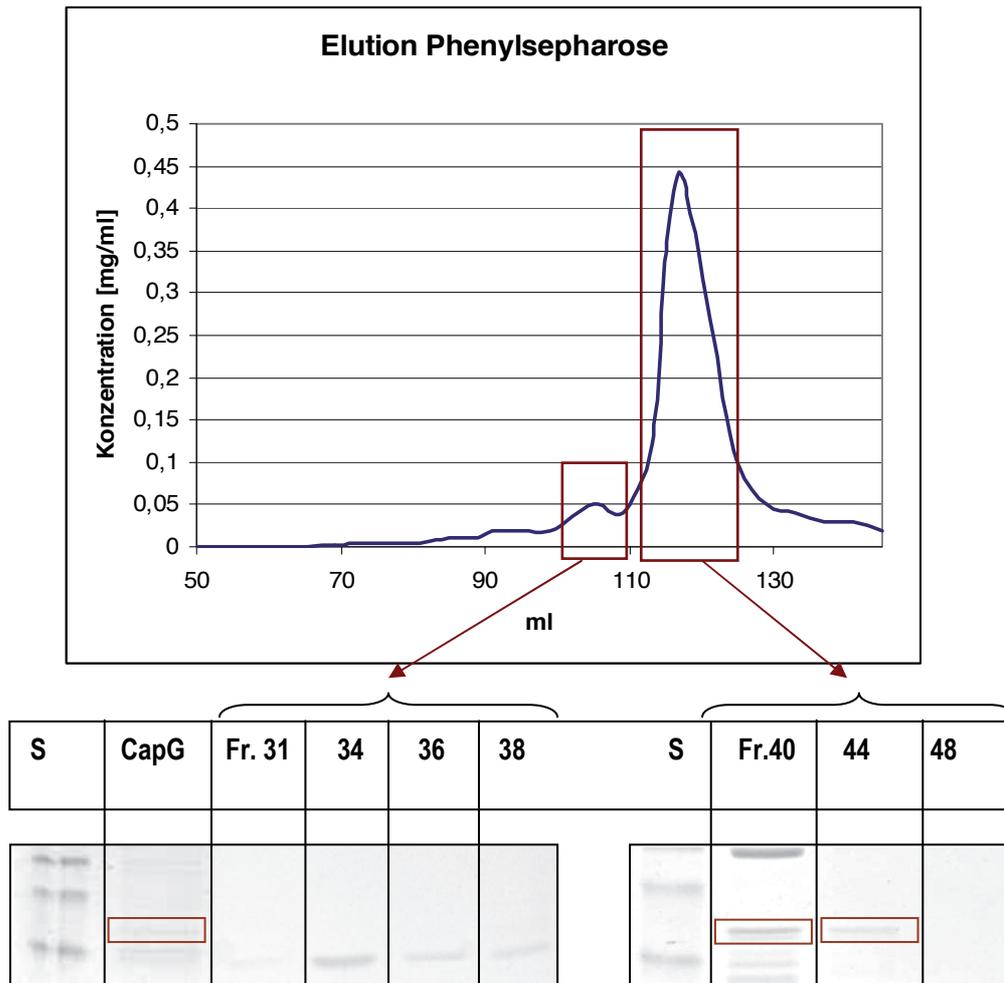


Abb.3.7: Aufreinigung von CapG mittels Phenylsepharose-Chromatographie: Bei der Elution der an der Phenylsepharose gebundenen Proteine eluierten diese in zwei diskreten Peaks. Die Analyse der Fraktionen durch SDS-Gelelektrophorese zeigte, dass die Fraktionen 31-38 des ersten Peaks ein 30 kDa Protein enthielten, die des zweiten Peaks (40-48) zusätzlich ein 35, 45 (CapG) und ein 65 kDa großes Protein. S = Standard; CapG = positiv Kontrolle für CapG.

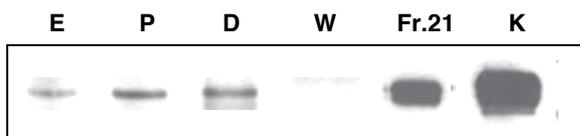


Abb.3.8: SDS-PAGE und Western Blot der Anreicherungsschritte von CapG aus Leukozyten: E: Extrakt; P: Pellet der Ammoniumsulfatfällung D: Dialysat; W: Waschfraktion der Phenylsepharose Fr.21: Fraktion 21 einer Phenylsepharoseaufreinigung K: vereinte Fraktionen der Phenylsepharose (konzentriert).

Die CapG-Varianten des Phenylsepharose-Eluats wurden durch zwei-dimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und konnten durch eine spätere Western Blot-Analyse als CapG identifiziert werden (Abb.3.9). Der Spot 1 wies mit 6,07 den basischsten, die Variante 7 mit 5,61 den sauersten isoelektrischen Punkt auf. Besonders auffällig war die Anordnung der CapG-Varianten in Doppelspots, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt nur minimal voneinander unterscheiden (0,06). Diese Besonderheit konnte nur beim letzten Spot nicht nachgewiesen werden (Spot 7). Zudem schwankte das Verhältnis der Varianten eines Doppelspots sichtlich nach den Anreicherungen von CapG.

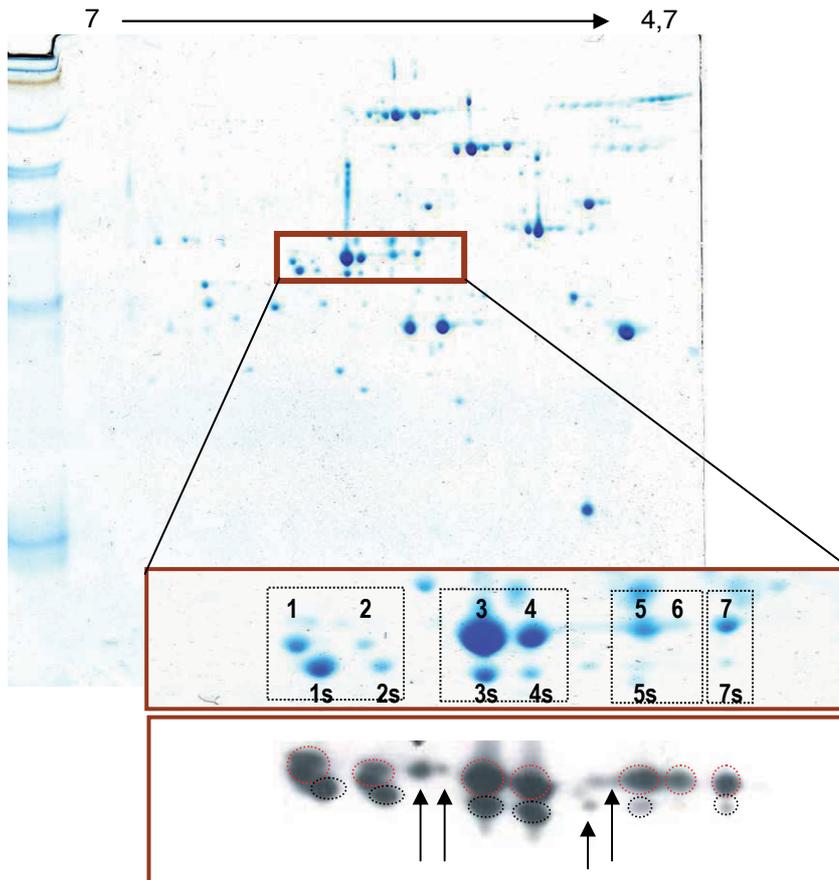


Abb.3.9: Auftrennung verschiedener CapG-Varianten mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese: Durch die zwei-dimensionale Auftrennung von CapG konnten verschiedene CapG Varianten nachgewiesen und durch Western Blot eindeutig als CapG identifiziert werden. Da die Probe für die Western Blot-Analyse von einer anderen Aufreinigung stammte, sind geringe Abweichungen in den Anteilen der Varianten erklärbar. Besonders auffällig war die Anordnung der CapG-Varianten 1-6 als Doppelspots, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt nur um 0,06 voneinander unterscheiden. Zudem konnten verkürzte Varianten (1s-7s) detektiert werden. Bei den mit den Pfeilen markierten Spots handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte oder modifizierte Varianten, die während der Aufreinigung entstanden sind.

Durch die Anreicherung von CapG konnten zudem Spots identifiziert werden, die sich in ihrer Größe von den bereits bekannten gering unterschieden. Die kleineren basischen Varianten (1s und 2s; s = small) weichen in ihrem isoelektrischen Punkt von den größeren Varianten ab, hingegen weisen die verkürzten Varianten 3s-7s den gleichen isoelektrischen Punkt, wie die größeren Varianten (3-7) auf (Abb. 3.9).

Die Varianten 1-7, 1s und 2s konnten nach jeder Aufreinigung sowohl auf dem SDS-Gel, als auch nach dem Western Blot identifiziert werden. Die Varianten 3s, 4s, 5s und 7s wiesen hingegen größere Schwankungen auf und konnten nicht immer detektiert werden. Die mit den schwarzen Pfeilen markierten Varianten konnten nur sehr schwach oder gar nicht auf dem SDS-Gel und oft auch nicht durch die Western Blot-Analyse nach erfolgter Aufreinigung nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um Modifikationen oder Abbauprodukte handelt, die während der Aufreinigung von CapG entstanden sind und diese Varianten nicht weiter analysiert.

Die ersten Versuche zur CapG Modifikation haben gezeigt, dass die saureren CapG-Varianten durch Phosphorylierung zustande kommen (Abb.3.6). Auch beim

angereicherten CapG war es möglich die saureren Varianten (5,6 und 7) durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase zu eliminieren. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass bei dem CapG-Protein eine Modifikation in Form von Phosphorylierung vorliegt.

CapG vor Phosphatase-Behandlung:



CapG nach Phosphatase-Behandlung:



Abb.3.10: Phosphatase-Behandlung von CapG: Durch die Behandlung des Eluats mit alkalischer Phosphatase und anschließender zwei-dimensionaler Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die isoelektrischen Punkte der saureren Varianten (5, 6 und 7) sich durch Phosphorylierung von den anderen Varianten unterscheiden.

Um die CapG-Modifikationen und die Phosphorylierungsstellen von CapG zu identifizieren wurden die CapG-Spots im Gel tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert.

3.7 Weitere Anreicherung von CapG durch MonoQ

Der größere Anteil des Phenylsepharose-Eluats (2,5 mg) wurde für eine weitere Aufreinigung von CapG durch eine Anionenaustauscher-Chromatographie (2.19.3) genutzt und die Peptide nach einem tryptischen Verdau massenspektrometrisch analysiert.

Bei der Chromatographie konnten neben der Waschfraktion, die hauptsächlich ein 30 kDa Protein enthielt, weitere deutliche Peaks eluiert werden (Abb. 3.11). Der zweite Peak setzte sich aus zwei überlappenden Peaks zusammen (Fraktionen 42-46 und 48-54), die beide das CapG- Protein enthielten. Demnach eluierte CapG bei einer KCl-Konzentration zwischen ca. 20-30 mM. Die Proteinkonzentration der Fraktionen lag zwischen 30 und 60 $\mu\text{g/ml}$. In den Fraktionen 123 und 124 konnte ein 65 kDa Protein nachgewiesen werden. Der letzte Peak enthielt hochmolekulare Proteine (ca. 200 kDa), die auf dem Gel nur schlecht zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt).

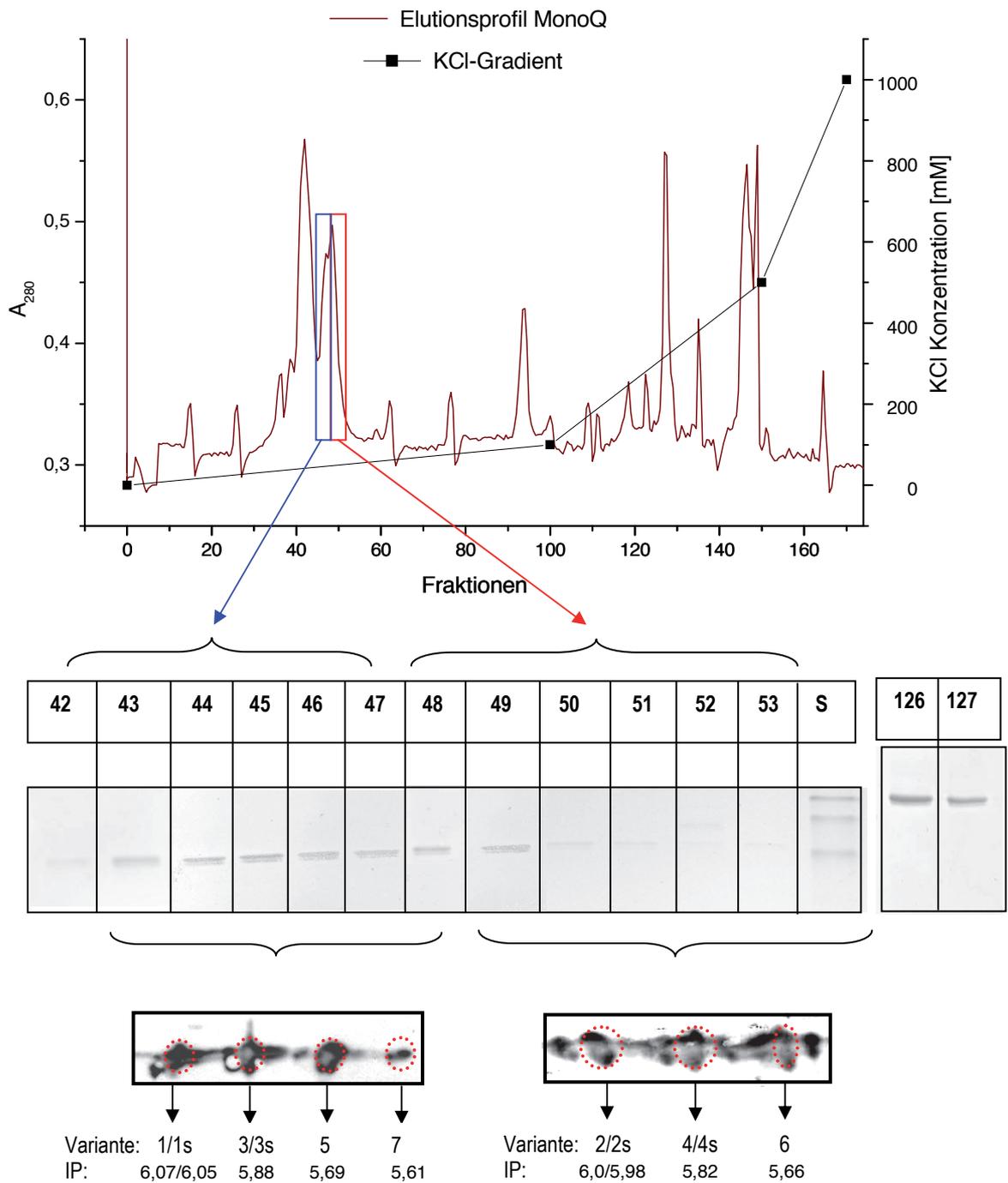


Abb.3.11: Weitere Aufreinigung und Auftrennung der CapG-Varianten: Exemplarische Darstellung der weitere Anreicherung von CapG durch Anionenaustauscher-Chromatographie (MonoQ). Das CapG-Protein konnte von den anderen unerwünschten (u.a. Fr. 126 und 127) Proteinen getrennt werden. Die CapG-Varianten eines Doppelspots eluierten bei ca. 20-30 mM KCl und bildeten einen Doppelpack (blau und rot umrandet). Die Analyse der Fraktionen 43 und 51 durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese und Immunoblot-Analyse zeigte, dass die Fraktionen des ersten Peaks (blau) hauptsächlich die basischeren Varianten der Doppelspots von CapG aufwiesen. Die Fraktion 53 wies hingegen einen höheren Anteil an den saureren Varianten auf.

Die Fraktion 43 wies fast ausschließlich die basischeren Varianten der Doppelspots auf, dabei stellten die Variante 5 und 7 etwa 1/3 des gesamten CapGs dieser Fraktion dar. In

der Fraktion 51 konnten alle Varianten nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich ein höherer Anteil an den saureren Doppelspot-Varianten (Abb. 3.11 unten). Die Varianten 5 und 7 hatten hier einen deutlich geringeren Anteil an der Gesamtmenge von CapG, als bei der Fraktion 43. Da die CapG-Varianten (eines Doppelspots) nicht in zwei diskreten Peaks eluierten, sondern sich die beiden Peaks überlappten lag keine 100 %-ige Trennung der Varianten vor. Auf dem SDS-Gel konnten jedoch keine Verunreinigungen durch andere Proteine mehr nachgewiesen werden.

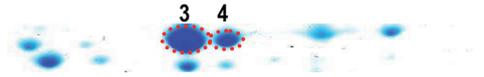
Bei einer Bestimmung der Phosphorylierungsstellen mittels massenspektrometrischer Analyse sollte der Anteil an phosphoryliertem CapG möglichst hoch sein. Für einen direkten tryptischen Verdau und massenspektrometrische Analyse ohne vorherige zwei-dimensionale Gelelektrophorese boten sich demnach die Fraktionen des ersten Peaks (42-47) an.

3.8 Weitere posttranslationale Modifikationen von CapG

Bei den massenspektrometrischen Analysen (2.21) der Spots 3 und 4 (Doppelspots) konnten in beiden Proben ein Peptid mit einer Masse von 2785,54 Da ($M+H^+$) nachgewiesen werden, welches genau 59 Da schwerer war, als das Peptid bestehend aus den Aminosäuren 1-25. Eine Anlagerung von 43 Da deutet auf eine N-terminale Acetylierung hin, die zusätzliche Masse von 16 Da kann durch eine Oxidation des Methionins erklärt werden. Durch die weitere MS/MS-Analyse bestätigte sich, dass es sich bei dem Peptid mit der Masse von 2785,54 Da um die Aminosäuren 1-25 handelte (Abb. 3.12).

Das Massenspektrum der MS/MS-Analyse zeigt die Häufigkeitsverteilung (Intensität) der vorhandenen Ionen in Abhängigkeit ihres Wertes für das Verhältnis m/z , also Masse pro Ladung. Dabei konnte ein Fragment identifiziert werden, welches einem oxidierten Methionin entspricht (M_{ox}) und eine erhöhte Masse von 43 Da ($147,04 + 43,04 = 190,08$) aufwies. Die weitere Fragmentierung (MS/MS-Analyse) des bei der MS-Analyse identifizierten Peptides bestätigte demnach die bereits vermutete N-terminale Acetylierung der CapG-Varianten der Spots 3 und 4.

Spot 3 und 4: 1-25, $[M+H]^+ = 2785,54$



Ac-M_{ox}YTAIPQSGSPFPGSVQDPGLHWVR

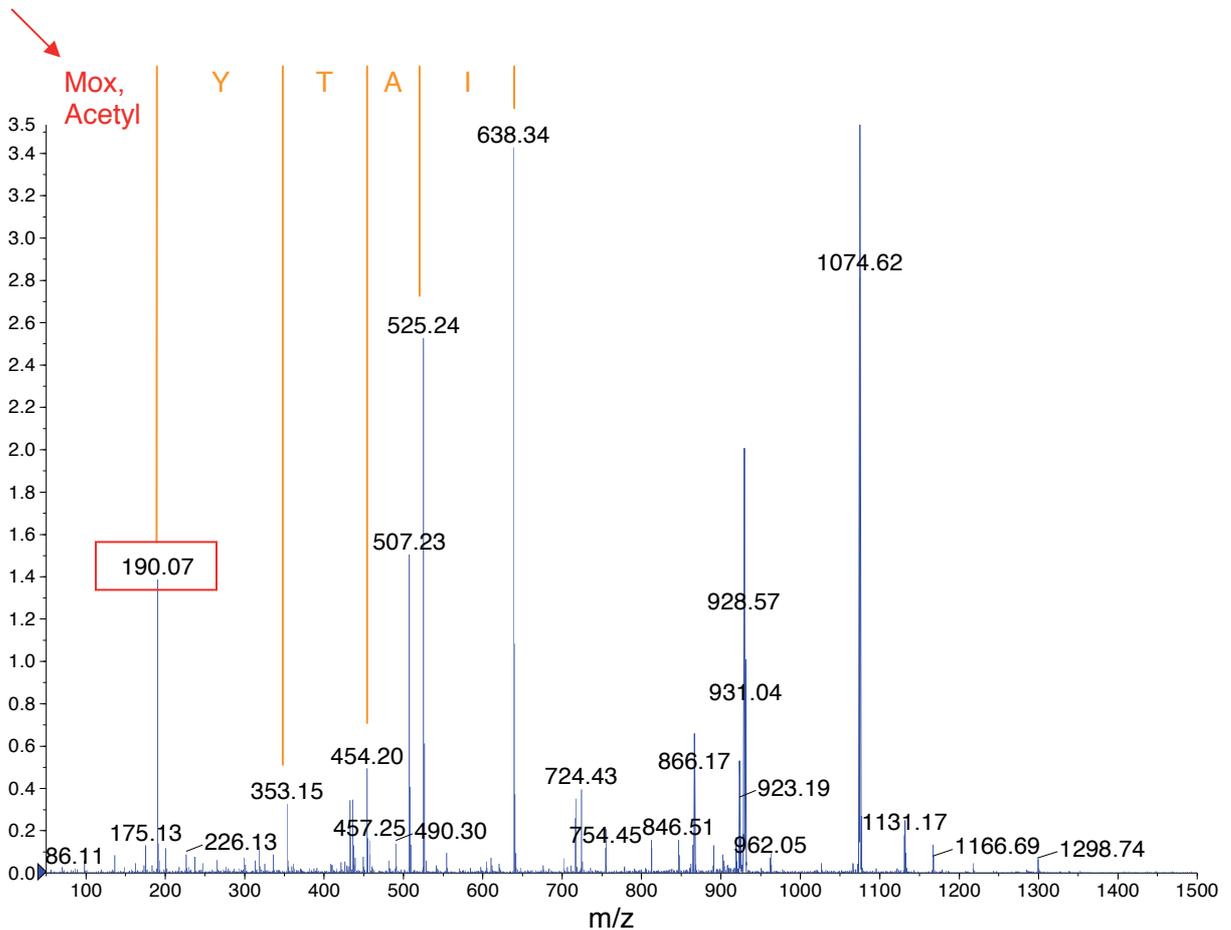
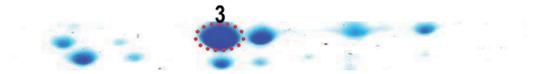


Abb.3.12: MS/MS-Analyse der Spots 3 und 4: Bei der MS/MS-Analyse des 2785,54 Da-Peptids, welches durch MS-Analysen in den Spots 3 und 4 identifizierte werden konnte zeigte sich, dass das Peptid aus den Aminosäuren 1-25 bestehend. Das N-terminale Methionin wies jedoch eine erhöhte Masse von etwa 59 Da auf. Diese Massendifferenz ist durch die N-terminale Acetylierung der CapG-Variante und der Oxidation des Methionins zu erklären.

Da bei beiden Varianten eine N-terminale Acetylierung und Oxidation des Methionins nachgewiesen werden konnte, können diese Modifikationen nicht der Grund für die Bildung der Doppelspots sein. Es waren also weitere MS/MS-Analysen nötig, um den Unterschied zwischen den Spots 3 und 4 zu identifizieren.

Es konnte aus der Probe von Spot 3 ein Peptid mit einer Masse von 1861,00 Da nachgewiesen werden, bei dem es sich um das Peptid bestehend aus den Aminosäuren 320-335 handelte. Durch weitere Fragmentierung dieses Peptids und Analyse der entstandenen Fragmente konnte an der Position 335 eindeutig ein Arginin identifiziert werden (Abb.3.13). Die identifizierte Sequenz des Peptides (320-325) stimmte mit der bekannten Aminosäure-Sequenz des CapG-Proteins überein.

Spot3: 320-335 (R-Variante), $[M+H]^+ = 1861,00$



M_{ox} QYAPNTQVEILPQGR

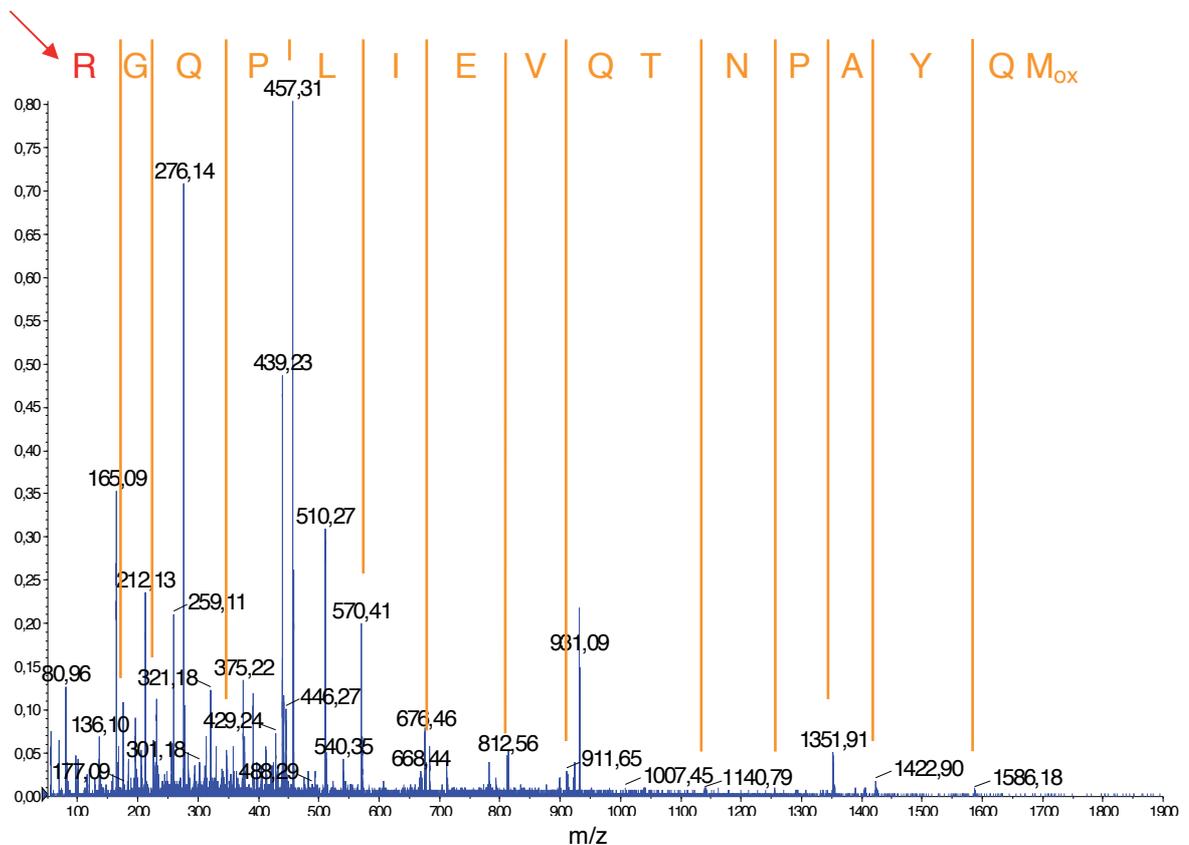
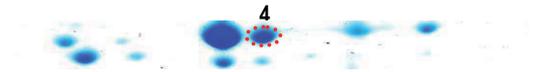


Abb.3.13: MS/MS-Analyse von Spot 3: Der Spot 3 wurde nach Auftrennung durch zweidimensionale Gelelektrophorese im Gel tryptisch verdaut und mittels ESI-MS/MS analysiert. Bei der massenspektrometrischen Analyse von Spot 3 konnte an der Position 335 eindeutig ein Arginin identifiziert werden.

Beim Spot 4 konnte hingegen kein Peptid mit der Masse von 1861,00 Da nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ein Peptid mit der Masse von 2543,35 Da, welches wiederum beim Spot 3 nicht identifiziert werden konnte. Die Analyse zeigte, dass es sich dabei um die Aminosäuren 320-341 handelte (Abb.3.14), wobei an der Position 335 ein Histidin vorliegen muss, um die Masse von 2543,35 Da erklären zu können (Übereinstimmung mit der hypothetischen CapG-Protein Sequenz bei SwissProt). Leider war es nicht möglich die gesamte Aminosäuresequenz des Peptides durch die MS/MS-Analyse darzustellen. Entscheidend ist jedoch, dass der Austausch von Arginin zu Histidin eine tryptische Spaltung hinter der Aminosäure 335 verhindert und daher kein Fragment mit der Masse von 1861,00 Da beim Spot 4 entstehen und nachgewiesen werden konnte. Der Austausch von Arginin zu Histidin hat nach den Angaben des Vorhersageprogramms IP-Calculator (<http://isoelectric.ovh.org/>) eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes von 0,06 zur Folge, was ebenfalls mit der beobachteten Varianz im isoelektrischen Punkt der beiden Varianten übereinstimmt.

Spot 4: 320-341 (H-Variante), $[M+H]^+ = 2543,35$ Da



M_{ox} QYAPNTQVEILPQHESPIFK

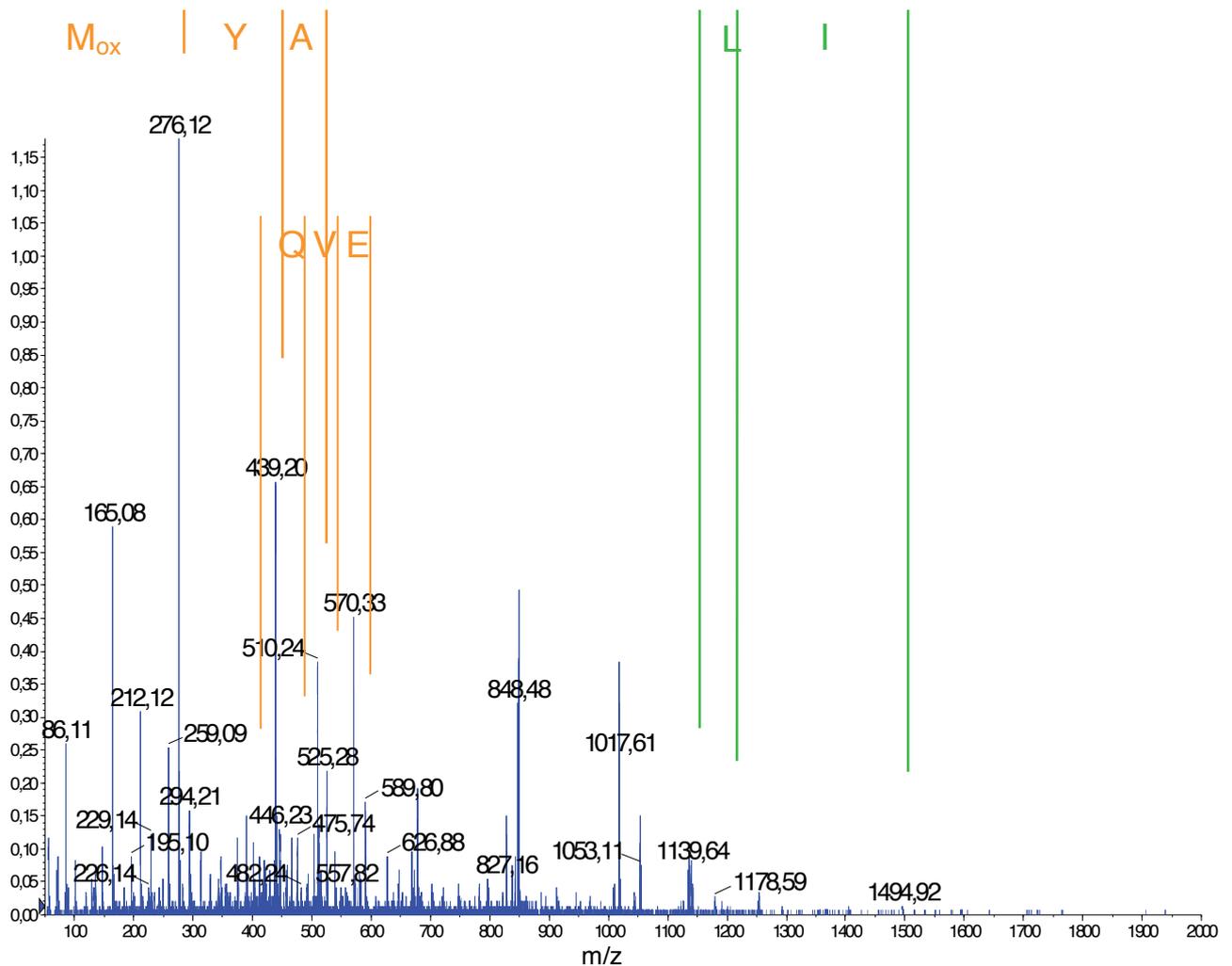


Abb.3.14: MS/MS-Analyse von Spot 4: Bei der massenspektrometrischen Analyse des Spots 4 konnte kein Fragment mit der Masse von 1861,00 Da nachgewiesen werden, hingegen konnte ein Peptid mit der Masse von 2453,35 Da identifiziert werden, bei dem es sich um die Aminosäuren 320-341 handelt. Da bei der CapG-Variante 4 an der Position 335 ein Histidin vorliegt kommt es an dieser Position nicht zu einer tryptischen Spaltung.

Die Analysen zeigten demnach, dass sich die Varianten eines Doppelspots in nur einer Aminosäure an der Position 335 unterscheiden. Die basischere Variante der Doppelspots wies an der Position 335 die Aminosäure Arginin (R), die saurere Variante an dieser Stelle ein Histidin (H) auf. Datenbankrecherchen zeigten, dass der Austausch der Aminosäuren auf ein Single-nucleotid-Polymorphism („SNP rs6886“) zurückzuführen ist.

Die Varianten wurden dementsprechend neu benannt (siehe Abb.3.15), die Variante des Doppelspots, die an der Position 335 ein Arginin aufweist wurde als „R“, die Variante mit Histidin als „H“ bezeichnet.

Eine Modifikation der Spots 3 (2R) und 4 (2H) in Form von Phosphorylierung, die zu einer Verschiebung in den saureren Bereich führt, konnte nicht identifiziert werden (Abb. 3.6).

Analysen der Spots 1 (1R) und 1s (1Rs) sollten deshalb eine Erklärung für die Verschiebung des isoelektrischen Punktes in den basischeren Bereich der Varianten 1R, 1H, 1Rs und 1Hs liefern.

Auffallend war, dass bei beiden Varianten (1R und 1Rs) kein „normaler„ CapG N-terminus (Peptid 1-25) mit der Masse von 2785,54 Da durch die massenspektrometrischen Analysen nachgewiesen werden konnte. Hingegen konnte bei der Probe des Spots 1R ein Peptid mit der Masse von 2364,10 Da und bei der Probe des Spots 1Rs ein Peptid mit der Masse von 2034,23 Da identifiziert werden. Die weitere Analyse zeigte, dass es sich hier zwar ebenfalls um den N-terminalen Bereich von CapG handelte, jedoch waren die identifizierten Massen nur durch das Fehlen der ersten drei Aminosäuren ($\text{Ac-M}_{\text{ox}}\text{QY} = 389,14$ Da) und zwei Oxidationen bzw. der ersten sechs Aminosäuren des Peptides 1-25 zu erklären. Bei dem 2034,23 Da-Peptid musste zudem eine Pyroglutamatbildung vorliegen, da zwischen dem gemessenen Peptid und dem theoretischen Peptid (7-25) eine Differenz von 17 Da vorlag. Da durch die Abspaltung der ersten 6 Aminosäuren der Variante 1Rs am N-terminalen Ende ein Glutamin vorliegt, kommt es zu einer Ringbildung des Glutamins und so zu einem Verlust von 17,03 Da.

Die Analyse des Spots 4R zeigte, dass das Peptid aus den Aminosäuren 320-348 eine Massendifferenz von 79,9 Da zu dem theoretischen Peptid aufwies. Diese Differenz deutet auf eine Phosphorylierung hin. Da in der Sequenz jedoch mehrere Aminosäuren vorliegen, die phosphoryliert werden können war eine weitere Fragmentierung und Analyse des Peptides nötig. Die MS/MS-Analyse zeigte, dass das Serin₃₃₇ eine Phosphorylierung aufweist. Diese Ergebnisse lieferten ebenfalls die Erklärung für den fehlenden letzten Spot (4H). Die Variante 4R ist an dem Serinrest₃₃₇ phosphoryliert, durch die Phosphorylierung einer basischen Variante (wahrscheinlich 3R) kommt es zu einer Verschiebung in den sauren Bereich wodurch die Variante 4R entsteht. Das Erkennungsmotiv u.a. für die Protein-Kinase-C lautet: „RES“. Die Variante 3H kann demnach nicht an der Aminosäure 337 phosphoryliert werden und es kommt zu keiner Variante 4H mit einem saureren isoelektrischen Punkt. Das Fehlen des letzten Spots beruht also auf der Zerstörung des Kinase-Erkennungsmotives durch eine Aminosäure-Varianz in der CapG-Sequenz, die auf einen SNP zurückzuführen ist (Abb. 3.15).

Die Modifizierung von CapG, die zu den Varianten 2Rs-4Rs (3s-7s) führt konnte nicht eindeutig geklärt werden. Da es sich auch hier um verkürzte Varianten handelt, wäre ein C-terminaler Abbau eine mögliche Erklärung. Da bei der massenspektrometrischen Analyse dieser Spots jedoch der C-terminus nicht abgedeckt wurde, konnte diese Theorie aber noch nicht bestätigt werden. Es konnte jedoch auch bisher keine andere Modifikation in anderen Bereichen identifiziert werden, die die Bildung dieser Varianten erklärt.

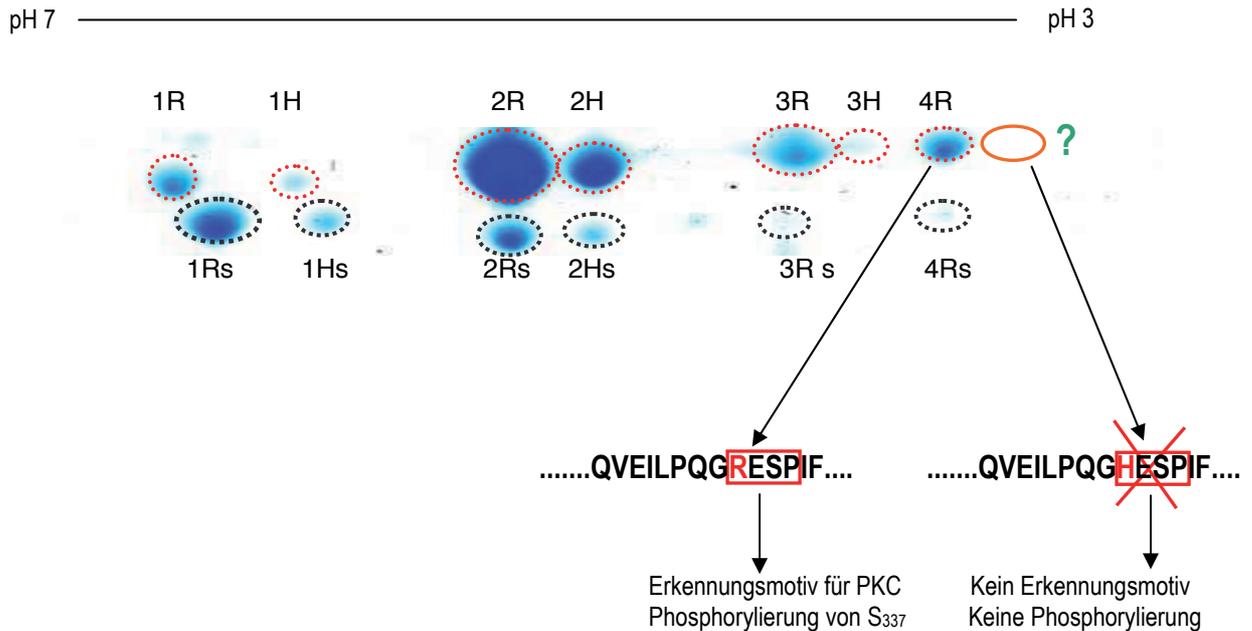


Abb.3.15: Destruktion des Kinase-Erkennungsmotives durch Austausch von R (Arg) zu H (His): Das durch Phenylsepharose angereicherte CapG wurde mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese getrennt und mit Coomassie gefärbt. Die verschiedenen CapG-Varianten sind rot und schwarz umrandet. Alle Varianten, außer die 4R-Variante liegen also Doppelspots vor. Dies kann durch den Austausch von R zu H in den Histidin-Varianten erklärt werden. Dieser Austausch führt zur Destruktion des Kinase-Erkennungsmotives, wodurch nicht zu einer Phosphorylierung der His-Variante kommt. Das Fehlen des letzten Doppelspots ist also auf die genetische Varianz der CapG-Sequenz (SNP rs6886) zurückzuführen, durch welche entweder eine Arg oder His -Variante codiert wird.

In der Tabelle 3.2 sind die bislang identifizierten Modifikationen der jeweiligen Spots aufgelistet. Die Varianten 2R und 2H sind N-terminal acetyliert und unterscheiden sich nur durch die Aminosäure (Arginin oder Histidin) an der Position 335. Durch einen Abbau der ersten drei N-terminalen Aminosäuren einschließlich des N-Acetyls kommt es zu einer Verschiebung in den basischen Bereich und so zur Bildung der Varianten 1R und 1H. Bei den Varianten 1Rs und 1Hs konnte ein N-terminaler Abbau von sechs Aminosäuren und eine Pyroglutamatbildung nachgewiesen werden.

Tabelle 3.2: Isoelektrische Punkte und identifizierte Modifikationen der Spots: Dargestellt sind die Bezeichnungen der verschiedenen mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese getrennten CapG-Varianten, deren isoelektrische Punkte und die durch MS/MS-Analysen identifizierte Modifikationen. X= noch nicht identifizierte Phosphorylierung an der gleichen Position; (x) = Nomenklatur der Spots vor Identifizierung von R/H.

Spot	IP	IP	Variante	Modifikation
1R	(1)	6,07	Arginin	N-terminaler Abbau 3AS
1Rs	(1s)	6,05	Arginin	N-terminaler Abbau 6AS, pGlu
1H	(2)	6,0	Histidin	N-terminaler Abbau 3AS
1Hs	(2s)	5,98	Histidin	N-terminaler Abbau 6AS, pGlu
2R	(3)	5,88	Arginin	N-terminale Acetylierung
2H	(4)	5,82	Histidin	N-terminale Acetylierung
3R	(5)	5,69	Arginin	N-terminale Acetylierung, Phosphorylierung X
3H	(6)	5,66	His	N-terminale Acetylierung, Phosphorylierung X
4R	(7)	5,61	Arg,	N-terminale Acetylierung, Phosphorylierung S ₃₃₇

Durch eine Phosphatase-Behandlung (Abb 3.10) konnte gezeigt werden, dass die Varianten 3R, 3H und 4R durch Phosphorylierung zustande kommen, wobei nur die Phosphorylierungsstelle des Spots 4R massenspektrometrisch identifiziert werden konnte. Bei der massenspektrometrischen Analyse des Spots 3R konnte die Phosphorylierungsstelle bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

3.9 Ausschluss potentieller Phosphorylierungsstellen durch Mutagenese

Da die massenspektrometrischen Analysen nicht zur Identifizierung der Phosphorylierungsstelle der Varianten 3R und 3H führten, wurden durch die Programme NetPhosK und PhosphoMotif Finder (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>; http://www.hprd.org/PhosphoMotif_finder) weitere sieben (S69/70, S103, T151, S200, T213, T240) potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert (Abb. 3.16). Auch durch gezielte Suche nach diesen Phosphorylierungsvarianten bei der massenspektrometrischen Analyse des Spots 3R und der direkt tryptisch verdauten CapG-Probe konnte die Phosphorylierungsstelle nicht identifiziert werden. Aus diesem Grund sollte der Austausch potentieller Phosphorylierungsstellen zeigen, ob eine dieser tatsächlich bei den Spots 3R und 3H phosphoryliert vorliegt.

N-terminal

MYTAIPQSGSPFFPGSVQDPGLHVWRVEKLPVPAQENQGVFFSGDSYLVLHNGPEEVSHLHLWIGQSSRDE
 QGACAVLAVHLNLTLLGERPVQHREVOGNESDLFMSYFPRGLKYQEGGVESAFHKTSTGAPAAIKKLYQVKGKK
 NIRAL¹ERALNWD²SFNTGDCFILD³LGQNI⁴FAWCGGKSNILERNKARDLALAIRD⁵SERQGAQVEIV⁶LDGEEPAE
 MIQVLGPKPALKEGNPEEDL⁷TADKANAQAAALYKVSDATGQMNLTKVADSSPFALELLISDDCFVLNGLCGK
 IYIWKGRKANERQAAALQVAEGFISRMQYAPNTQVEILPQGRE⁸SPIFKQFFKDWK

C-terminal

Abb.3.16: Potentielle Phosphorylierungsstellen: Die mit unterschiedlichen Farben markierten potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden durch mehrere Vorhersageprogrammen (NetPhosK 1.0, 2.0 und PhosphoMotif Finder) vorhergesagt

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung lag die (codierende) CapG-Sequenz (1044 bp) in dem Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) (5432) genannt pcDNA-CapG vor. Die codierende Sequenz wurde unter Verwendung von XhoI und EcoRI in das Plasmid kloniert. Die Mutagenese der CapG Sequenz erfolgte in diesem Vektor. Nach der Mutagenese wurden die CapG-Sequenzen bestimmt, um sicher zustellen, dass neben den gewünschten Mutationen keine weiteren Veränderungen in der CapG-Sequenz vorliegen. Nach gezieltem Austausch (4.2) der Serin- und Threoninreste zu Alanin und transienter Expression in der Zelllinie T47D wurden die Proteinextrakte durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blot analysiert (Abb. 3.18). Der Austausch eines Serin- oder Threoninrests des CapG-Proteins der im Spot 3R phosphoryliert vorliegt sollte zum Fehlen dieses Spots nach zwei-dimensionaler Auftrennung der Probe führen. Die MaCa-Zelllinie T47D wurde für diese Versuche verwendet, weil diese homozygot für die His-Variante ist (siehe dHPLC-Analyse 3.12). Die

transfizierte CapG-Mut(Sx/Tx) –DNA codiert hingegen für die Arginin-Variante. Das endogene (His-Varianten) und das nach der Transfektion exprimierte (Arg-Varianten) CapG kann in der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese demnach voneinander unterschieden werden.

Das setzte jedoch voraus, dass eine bestimmte Menge des pcDNA-CapGMut(Sx/Tx)-Vektors durch die transiente Transfektion (2.11) in die Zellen gelangt und dadurch eine ausreichende Menge des mutierten CapGs exprimiert wird, um das Fehlen oder Vorhandensein der Phosphorylierungsvariante (3R) eindeutig unterscheiden zu können.

Die Zunahme der CapG-Expression wurde nach transients Transfektion mit verschiedenen Mengen des Plasmids (2,5 μ g, 3,5 μ g und 5 μ g) und nach verschiedenen Zeitabständen (18 h, 42 h und 66 h) getestet (Abb.3.17).

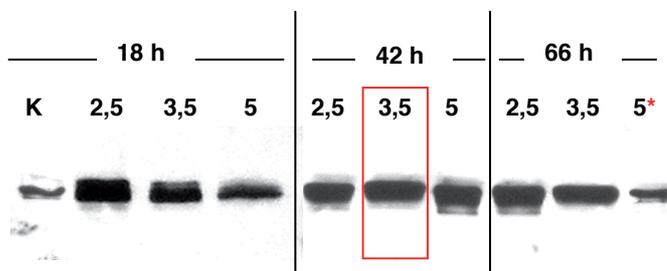


Abb.3.17: Transiente Expression von pcDNA-CapGMut_{69/70} in T47D Zellen: es wurden verschiedene Mengen des Plasmids eingesetzt und unterschiedliche Zeitabstände getestet. Nach 18 h konnte eine deutliche Zunahme der CapG-Expression im Vergleich zur Kontrolle (K = T47-D ohne Plasmid) nachgewiesen werden. Nach 42 h konnte die höchste Expression von CapG in den mit 3,5 μ g Plasmid transfizierte Zellen detektiert werden. Bei den mit 5 μ g Plasmid transfizierten Zellen starben viele der Zellen ab. Bei der mit * gekennzeichneten Probe lagen nach Extraktion der Proteine keine 20 μ g vor, weshalb nur ca. 7 μ g aufgetragen werden konnten.

Bei allen eingesetzten Plasmidmengen konnte man nach 18 und 42 h eine deutliche Zunahme der CapG-Expression nachweisen, die bei 3,5 μ g am deutlichsten war. Die Zunahme der Expression nach weiteren 24 h (Zeitpunkt: 66 h) war nur sehr gering, weshalb bei den weiteren Versuchen die Proteine 42 h nach Transfektion mit 3,5 μ g des Plasmids extrahiert wurden. Bei den mit 5 μ g Plasmid transfizierten Zellen und der höheren Menge an eingesetztem Transfektionsreagenz ist ein Großteil der Zellen abgestorben, weshalb nur etwa 7 μ g extrahierte Proteine aufgetragen werden konnten.

Von allen pcDNA-CapGMut(Sx/Tx)-Plasmiden wurden demnach 3,5 μ g für die Transfektion eingesetzt und die Proteine 42 h später extrahiert und durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb.3.19).

In allen Proben konnten die Arg-Variante mit dem isoelektrischen Punkt von 5,6 (rot umrandet) trotz Mutation nachgewiesen werden. Bei fast allen Proben war der Anteil an exogenem CapG (Arg-Varianten) höher als der Anteil an endogenem CapG (His-Variante). Das liegt an der geringeren Expression von CapG bei der Zelllinie T47D im Vergleich mit der Zelllinie MDA-MB 231. Nur die Probe CapGMut-T240 zeigte einen etwas

höheren Anteil an endogenem CapG (His-Varianten), trotzdem reichte der Anteil an transient exprimiertem CapG aus, um die Phosphorylierungsvariante 3R nachweisen und so eine Phosphorylierung am Threonin₂₄₀ ebenfalls ausschließen zu können. Die transiente Expression und die anschließende zwei-dimensionale Auftrennung der Proben zeigten demnach, dass keine der sieben potentiellen Phosphorylierungsstellen bei CapG phosphoryliert vorliegt.

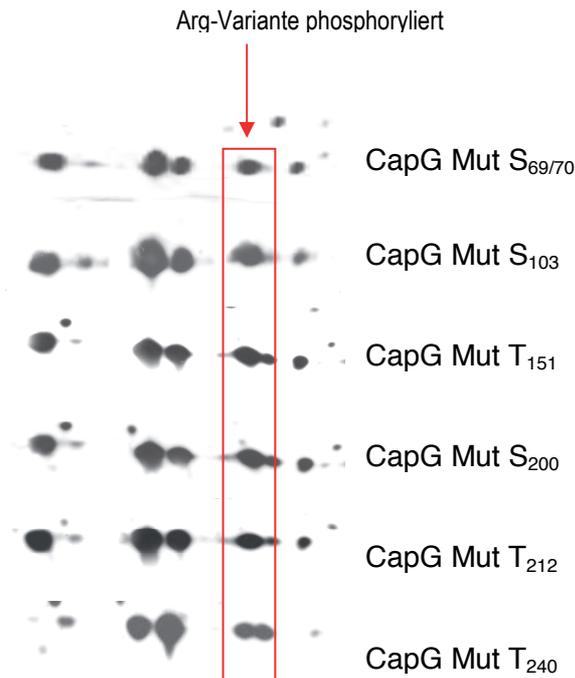


Abb.3.18: Ausschluss potentieller Phosphorylierungsstellen: In das CapG-pCDNA-Konstrukt wurden gezielt Mutationen eingeführt, und dadurch bei der Expression insgesamt sieben Serin- und Threoninreste (S69/70; S103; T151; S200; T212 und T 240) durch Alanin ersetzt. Der Austausch von Serin oder Threonin zu Alanin würde eine Phosphorylierung an dieser Stelle unterdrücken, was bei der zwei-dimensionalen Auftrennung der Proben (je 350 µg Gesamtprotein) zum Fehlen des Spots 3R führen würde. Die Analysen zeigten, dass keine der sieben potentiellen Phosphorylierungsstellen im CapG-Protein phosphoryliert vorliegen. Trotz Austausch gegen Alanin konnte die Variante 3R in allen Probe nachgewiesen werden.

3.10 N-terminale Abspaltung: eine posttranslationale CapG-Modifikation

Die Abspaltung terminaler Aminosäuren kann sowohl in einer spezifischen posttranslationalen Modifikation, als auch in einem unspezifischen Abbau durch Proteasen während der Proteinaufreinigung begründet sein. Verschiedene Kontrollen sollten zeigen, ob ein unspezifischer Abbau von CapG während der Anreicherung zu den Varianten 1R, 1H, 1Rs und 1Hs ausgeschlossen werden kann. Die Proteinextraktion und die chromatographische Anreicherung von CapG wurden stets unter der Verwendung von Protease-Inhibitoren und bei 4°C durchgeführt, was den proteolytischen Abbau der Proteine verhindern soll. Der Anteil der Varianten 1R/H und 1Rs/1Hs am Gesamt-CapG lag nach der Anreicherung immer bei ca. 18%, was für eine primäre und spezifische Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren spricht.

Für eine weitere Untersuchung wurden frisch isolierte Leukozyten direkt in TCA aufgenommen. Die zwei-dimensionale Auftrennung der Varianten und der anschließende Western Blot zeigten, dass sowohl die Varianten 1R und 1H (N-terminaler Abbau von 3 Aminosäuren), als auch die Varianten 1Rs und 1Hs (N-terminaler Abbau von 6 Aminosäuren und Pyroglutamatbildung) vorliegen. Das bedeutet, dass es wahrscheinlich nicht während der Aufreinigung des Proteins zu einem N-terminalen Abbau kommt. Ebenfalls hatte die An-/und Abwesenheit von einem Proteasen-Inhibitoren-Mix im Equilibrierungspuffer, indem die Proteine für die Rehydratisierung des IEF-Streifens gelöst wurden, keinen Einfluss auf den Anteil der N-terminal verkürzten CapG-Varianten. Hingegen nahm der Anteil an den Varianten 2s-7s ab.

Die in Abbildung 3.9 markierten Varianten (schwarze Pfeile) konnten nach Aufnahme der Leukozyten in Equilibrierungspuffer, zwei-dimensionale Gelelektrophorese und Western Blot nicht nachgewiesen werden, was die Annahme dass es sich bei diesen Varianten um während der Aufreinigung entstandene Modifikationen oder Abbauprodukte von CapG handelt bestärkt.

3.11 Ausschluss N-terminaler Phosphorylierungsstellen

Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese wurde auch hier der pcDNA-CapG Vektor genutzt. Alle möglichen Phosphorylierungsstellen (Y_2 , S_8 , S_{10} und S_{15} ; T_3 siehe 3.14) im N-terminalen Bereich des CapG-Proteins wurden als Folge der Mutagenese (2.4.2) durch Alanin ersetzt. Die Auswirkung auf die posttranslationale Modifikation, insbesondere die auf den Spot 3R, wurden im Anschluss wieder durch transiente Transfektion des mutierten Plasmids, Auftrennung durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese und Immunoblot analysiert.

Bei allen Transfektanten konnte die Variante 3R nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung des N-terminalen Bereiches des CapG-Proteins scheint demnach ausgeschlossen werden zu können.

3.12 dHPLC zur SNP-Analyse

Die Analyse mittels dHPLC dient als äußerst sensitive Klassierungsmethode für Gen-Fragmente im größeren Umfang. Die Methode basiert auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplex-DNA in einem Acetonitrilgradienten. Das Reagenz Triethylammoniumacetat (TEAA) führt zu einer Bindung der DNA-Stränge mit der Säulenmatrix. Diese Bindung wird mit steigender Konzentration von Acetonitril immer schwächer, bis die DNA schließlich bei einer bestimmten Acetonitrilkonzentration von der Säule eluiert wird. Geschieht das bei einer optimalen Analysetemperatur, werden dabei die Homo- und Heteroduplexe zu unterschiedlichen Zeitpunkten eluiert.

Für die Analyse wurde das Exon 10 von CapG mittels PCR amplifiziert und anschließend mittels dHPLC analysiert. Entscheidend für die Analyse war die Bestimmung der optimalen Analysetemperatur, das heißt die Temperatur bei der das unterschiedliche Schmelzverhalten am größten ist. Diese wurde experimentell anhand von drei verschiedenen Leukozytenproben bestimmt, die durch zwei-dimensionaler Gelelektrophorese als Arg-Homozygot, His-Homozygot und Heterozygot identifiziert werden konnten. Abbildung 3.19 zeigt die übereinander gelagerten Elutionsprofile der drei verschiedenen Leukozytenproben bei 62°C und 64°C. Bei einer Analysetemperatur von 64°C ist das unterschiedliche Schmelzverhalten der drei Proben am deutlichsten, weshalb diese Temperatur für die weiteren Analysen verwendet wurde.

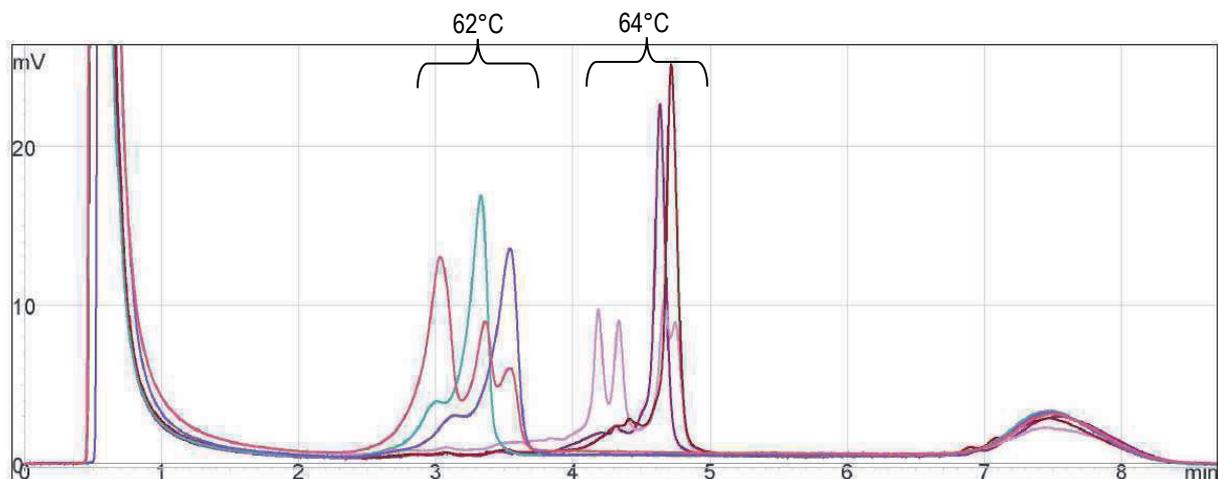


Abb.3.19: Bestimmung der optimalen Analysetemperatur: Das Elutionsverhalten der PCR-Produkte (Exon 10) von drei verschiedene Leukozyten DNA-Proben wurde mittels dHPLC analysiert. Bei einer Analysetemperatur von 64°C ist das unterschiedliche Schmelzverhalten der drei Proben (Arg-Homozygot; His-Homozygot und Heterozygot) am deutlichsten.

Insgesamt wurden die DNA-Proben von 113 Mammakarzinom-, 80 Ovarialkarzinom-, 12 Tubenkarzinom-Patientinnen und acht Mammakarzinom-Zelllinien bezüglich des CapG-SNPs analysiert. Laut HapMap-Projekt (Verzeichnis bekannter genetischer Varianten im humanem Genom: <http://www.hapmap.org/>) sind die Genotyp-Frequenzen für SNP rs6886 in der europäischen Bevölkerung folgendermaßen verteilt: R/R = 43%; R/H = 48%; H/H = 8%. Die HPLC-Analysen sollten zeigen, ob bei den untersuchten Proben eine Abweichung in der Verteilung vorliegt. Die ermittelten Genotypen bezüglich des CapG-SNPs sind in der Tabelle 3.3 angegeben. Bei den Mammakarzinom-Proben konnte nur eine geringe Abweichung zu der in der Datenbank angegebenen Verteilung nachgewiesen werden. Die Ovarialkarzinom-Patientinnen zeigten hingegen häufiger einen homozygoten Genotyp für die Histidin-Variante, wobei der Anteil an Heterozygoten abnahm. Diese Verschiebung wurde bei den Tubenkarzinomen noch deutlicher. Anstatt 8% waren hier 42% der Patientinnen homozygot für die Histidin-Variante.

Tabelle 3.3: Genotyp-Frequenzen für den CapG SNP rs6886 laut Datenbank(HapMap) und in den untersuchten Mamma-, Ovarial- und Tubenkarzinom-Patientinnen

Genotyp	Datenbank	MaCas	OvCas	TuCas
Heterozygot	48%	46%	36%	8%
Homozygot Arg	43%	47%	44%	50%
Homozygot His	8%	5%	20%	42%

Von den untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien zeigte nur die T47D einen homozygoten Genotyp für die Histidin-Variante und die Hec-1A für die Arginin-Variante. Die anderen Zelllinien waren alle heterozygot für den untersuchten CapG-SNP.

3.13 Keine unterschiedliche Capping-Eigenschaft der Arginin- und Histidin-Varianten

Die durch die Anionenaustauscher-Chromatographie (MonoQ; siehe 3.7) getrennten Arginin und Histidin-Varianten wurden bezüglich ihrer Eigenschaft Actinfilamente zu cappen untersucht. Die Hemmung der Actin-Polymerisation von CapG ist dosisabhängig, wie das Einsetzen von verschiedenen CapG-Mengen (1,5, 3 und 6 μg) zeigte. Die Auswirkung auf die Actin-Polymerisation unterscheidet sich dabei bei den beiden Varianten nicht.

3.14 Mutagenese von CapG und die Auswirkung auf die posttranslationale Modifikation und Funktion

Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese diente hier ebenfalls pcDNA-CapG. In der Abbildung 3.20 sind die Mutationen der CapG-Sequenz und die dadurch veränderten Aminosäuren angegeben. Die mutierten CapG-Sequenzen (CapG-R; CapGMut3,7-R; CapGMut3,3/337-R, und CapGMut337-R) wurden später aus den pcDNA-Vektoren amplifiziert und in den S11-IN Vektor kloniert. Dazu wurden spezielle Primer genutzt, der Forwärts-Primer war komplementär zur T7-Promotorsequenz und der Rückwärts-Primer, der für das 3'-Ende der CapG-Sequenz codiert und als Überhang die Erkennungssequenz für EcoRI trug. Da zwischen der T7-Promotor- und der CapG-Sequenz eine EcoRI-Schnittstelle lag, konnte über die beiden EcoRI-Restriktionsschnittstellen die mutierten CapG-Sequenzen in den Vektor S11-IN kloniert und in *E.coli* amplifiziert werden.

Bevor die Expressionsplamide in die Zelllinien BT-20 und MDA-MB 231 transfiziert werden konnten, musste durch eine Kontrollrestriktion mit SphI die richtige Orientierung der CapG-Sequenzen bestätigt und durch eine weitere Sequenzierung das Auftreten von unerwünschten Mutationen ausgeschlossen werden.

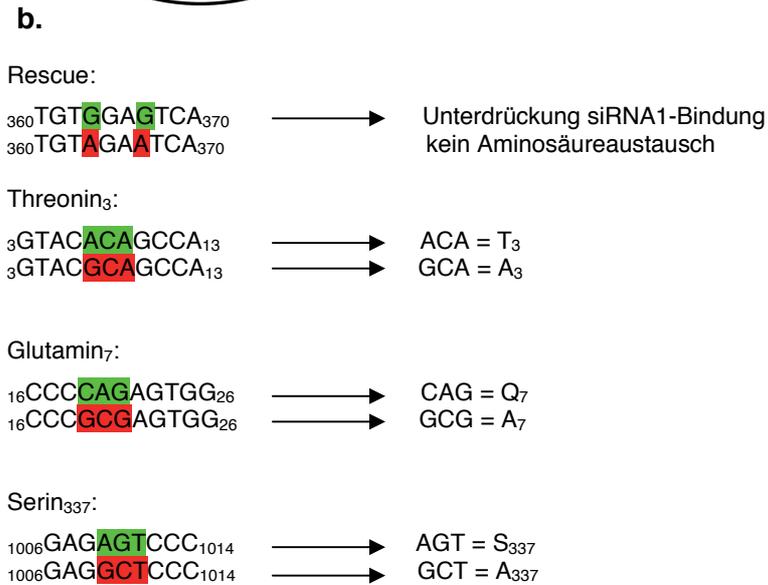
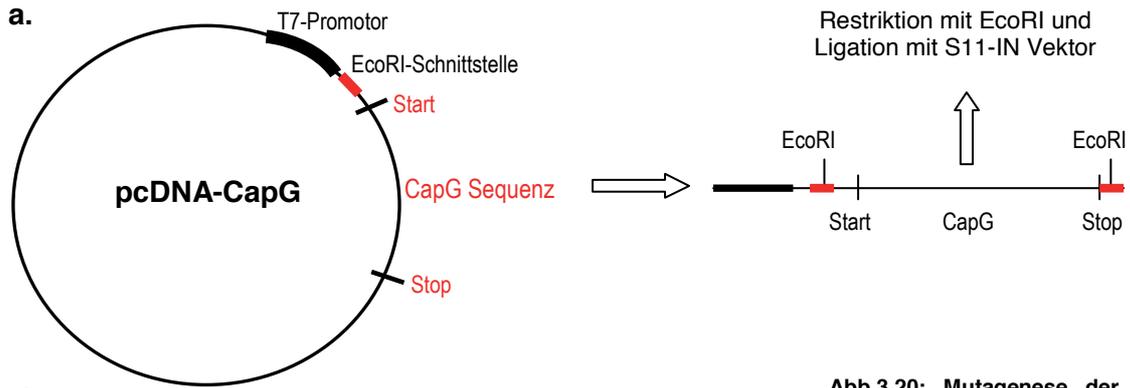


Abb.3.20: Mutagenese der CapG-Sequenz und Klonierung in den retroviralen Vektor S11-IN:

a. Nach der Insertion der CapG-Sequenz in den pcDNA-Vektor lag zwischen dieser und dem T7-Promotor eine EcoRI-Schnittstelle. Nach einer PCR mit T7 und CapG-EcoRI Primern konnte nach einer Restriktion mit EcoRI die CapG-Sequenz in den S11-IN Vektor kloniert werden.

b. Die Mutation der Basen 363 und 366 soll die Bindung der siRNA1 an die transkribierte und mutierte CapG-mRNA verhindern und so die Unterdrückung des ausschließlich endogenen CapGs ermöglichen. Durch den Austausch der Aminosäuren Threonin (ACA), Glutamin (CAG) und Serin (AGT) zu Alanin (GCN) kann in weiteren Versuchen die Bedeutung dieser Aminosäuren für die posttranslationale Modifikation und Funktion von CapG getestet werden.

Nach der stabilen Transfektion der verschiedenen S11-IN Konstrukte und Selektion der nicht transfizierten Zellen sollte die Zunahme der CapG-Expression in den BT-20 (Abb.3.21) und MDA-MB 231 (Abb.3.22) Zellen durch Immunoblot-Analysen gezeigt werden.

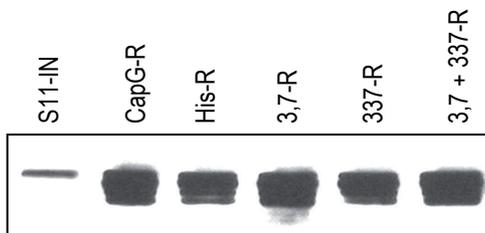


Abb.3.21: CapG-Expression in den BT-20 Transfektanten: CapG-Expression nach stabiler Transfektion mit den Vektoren: S11-IN (Kontrolle), S11-CapG-Arg-R-IN (CapG-R), S11-CapH-His-R-IN (His-R), S11-CapGMut 3,7-R-IN (3,7-R), S11-CapGMut 337-R-IN (337-R) und S11-CapGMut 3,7 + 337-R-IN (3,7 + 337-R). Der Kontrollvektor enthielt keine CapG-Sequenz, bei dem detektierten CapG handelt es sich demnach um das endogene CapG. Durch die virale Transfektion konnte die Expression von CapG bei allen anderen BT-20 Transfektanten deutlich erhöht werden.

Da die MDA-MB 231 Zellen eine hohe endogene CapG Expression aufweisen wurden die Transfektanten vor der Analyse mit siRNA1 behandelt. Die exogene CapG-Expression

(welche durch siRNA1-Behandlung nicht unterdrückt wird) kann dadurch von der endogenen CapG-Expression unterschieden werden.

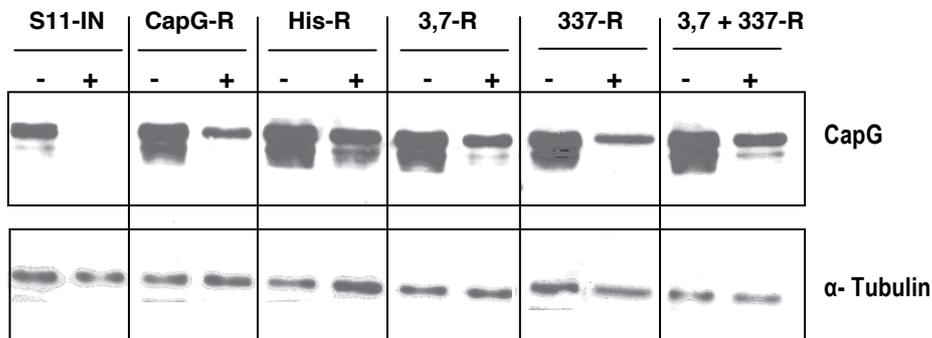
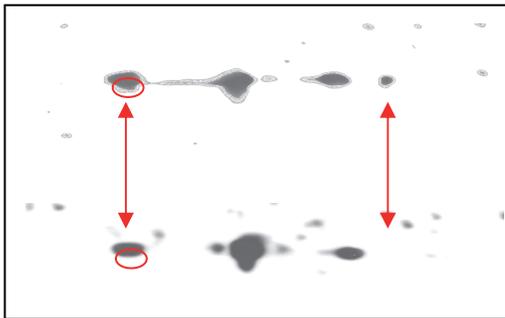


Abb.3.22: Unterdrückung des endogenen nicht des transfizierten CapGs durch siRNA: Durch eine Behandlung mit einer 12,5 nM siRNA1-Lösung (+) konnte die Expression des endogenen (ursprünglich in der Zelle exprimierte) CapGs unterdrückt werden, was bei der Kontrolle S11-IN (-) deutlich wird. Das exogene (transfizierte) CapG wird durch die Einführung einer Mutation in der siRNA-Bindungsstelle trotz siRNA-Behandlung in allen MDA-MB 231-Tansfektanten exprimiert. Die reduzierte CapG-Menge bei den mit siRNA behandelten Transfektanten ist demnach auf die Unterdrückung der Expression des endogenen CapGs zurück zuführen. Es wurden 15 µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Ladungskontrolle diente α-Tubulin.

Bei der Kontrolle (S11-IN) kann nach der siRNA1-Behandlung (+) kein CapG mehr nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass durch die siRNA1-Behandlung die Expression des endogenen CapG-Proteins komplett unterdrückt wurde. Bei den anderen Transfektanten ohne siRNA1-Behandlung lag eine deutlich höhere Menge an CapG vor, was durch die zusätzliche Expression des exogenen CapGs erklärt werden kann. Auch nach der siRNA1-Behandlung dieser Transfektanten konnte noch CapG detektiert werden. Das detektierte CapG entspricht dem exogenen CapG, welches durch den Rescue trotz siRNA exprimiert wird.

Die zwei-dimensionale Auftrennung des mutierten CapGs (T₃, Q₇ und S₃₃₇) sollte zeigen, welche Auswirkungen die Mutationen auf die posttranslationale Modifikationen haben. Der Vergleich des Spotsystems des mutierten CapGs (Arg-Variante) mit dem des nicht mutierten CapGs (CapG-R; Arg-Variante) zeigte, dass die Bildung des Spots 4R, also die Phosphorylierung an S₃₃₇ unterdrückt wurde. Hingegen konnte die Abspaltung am N-terminalen Ende des CapG-Proteins durch die Mutation des Threonin-Rests nicht unterdrückt werden. Die um sechs Aminosäuren verkürzte Variante (rot umrandet) schien in der Mutante jedoch nicht mehr detektiert werden zu können.



MDA-MB 231 S11-CapG-R-IN
+siRNA1; 5 Tage

MDA-MB 231 S11-CapGMut3,7/337-R-IN
+siRNA1; 5 Tage

Abb.3.23: Einfluss der eingeführten Mutationen auf die posttranslationale Modifikation von CapG: Dargestellt sind die in den MDA-MB 231 Transfektanten exprimierte CapG-Varianten nach einer fünftägigen siRNA1-Behandlung. Bei der MDA-MB 231 S11-CapG-R-IN wird die Arginin-Variante des CapG-Proteins exprimiert. In den BT-20 S11-CapGMut3,7/337-R-IN Zellen wird CapG exprimiert, welches anstelle der Aminosäuren Threonin₃, Glutamin₇ und Serin₃₃₇ jeweils ein Alanin aufweist. Der gezielte Austausch der Aminosäuren Threonin₃ und Glutamin₇ zu Alanin führte nicht zu einer Unterdrückung der N-terminalen Abspaltung, jedoch schien die um sechs Aminosäuren verkürzte Variante nicht mehr detektiert werden zu können (rot umrandet). Die Phosphorylierung von Serin₃₃₇ wurde durch die Mutagenese hingegen unterdrückt, wodurch die CapG-Variante mit dem sauersten isoelektrischen Punkt (4R) fehlt.

Bei den subzellulären Fraktionierungen der MDA-MB 231 (Abb. 3.24) und BT-20 (nicht gezeigt) Transfektanten konnte kein Unterschied in der Verteilung der mutierten CapG-Proteinvarianten nachgewiesen werden. Die Arginin (CapG-R) und Histidin- (His-R) Varianten zeigten ebenfalls die gleichen Anteile an nucleärem und cytoplasmatischem CapG. Dies war zu erwarten, da bei vorherigen subzellulären Fraktionierungen und der anschließenden zwei-dimensionalen Auftrennung der cytoplasmatischen und nucleären Proben (siehe 3.5) kein Unterschied in der Verteilung der Arginin und Histidin-Varianten vorlag.

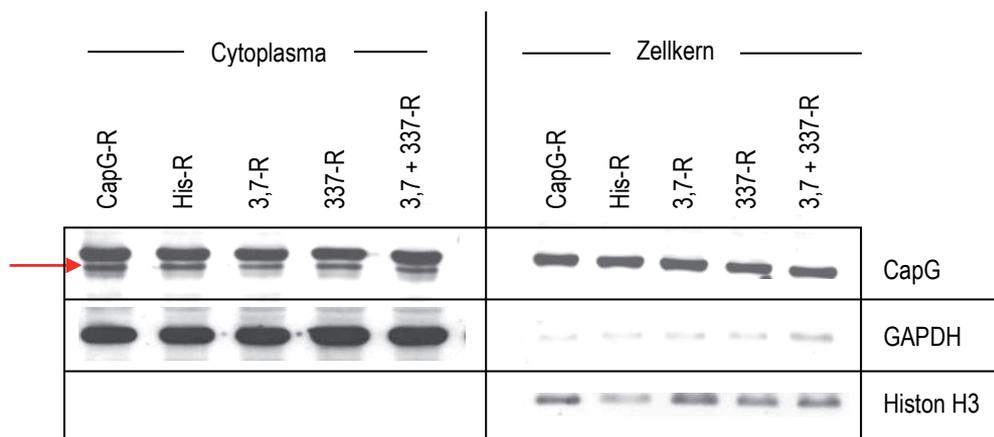


Abb.3.24: Die eingeführten Mutationen oder das Vorliegen von His oder Arg an der Aminosäureposition 335 haben keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von CapG: Die verschiedenen MDA-MB 231 Transfektanten wurden bezüglich der Verteilung des exprimierten CapG-Proteins durch subzelluläre Fraktionierung und Western Blot analysiert. Die endogene CapG-Expression wurde zuvor durch siRNA-Behandlung unterdrückt. Es zeigte sich, dass der Austausch von Arginin zu Histidin an der Position 335 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des CapG-Proteins hat. Beide Transfektanten (CapG-R und His-R) zeigten gleiche Anteile an nucleärem und cytoplasmatischem CapG. Der Austausch der Aminosäuren Threonin₃, Glutamin₇ (3,7-R) und Serin₃₃₇ (337-R) und die Kombination aller drei (3,7 + 337-R) hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung des exprimierten CapG-Proteins. Für die Kompartimentierungskontrolle wurden GAPDH (cytoplasmatisches Protein) und Histon H3 (nucleäres Protein) genutzt. In den cytoplasmatischen Fraktionen konnte kein Histon H3 detektiert werden. Die nucleären Fraktionen zeigte nur einen sehr geringen Anteil an GAPDH, was für eine erfolgreiche Fraktionierung spricht.

Die N-terminal verkürzten CapG-Varianten konnten hingegen nicht im Zellkern nachgewiesen werden. Auch hier konnte durch die Immunoblot-Analyse in den cytoplasmatischen Fraktionen eine verkürzte CapG-Variante detektiert werden (Abb.3.24; roter Pfeil), die in der nucleären Fraktion nicht vorlag. Ob der Anteil an nucleärem CapG durch die Unterdrückung der N-terminalen Abspaltung erhöht wird konnte leider nicht untersucht werden, da die Abspaltung durch den Austausch nicht unterdrückt werden konnte.

Die MDA-MB 231 Transfektanten wurden nach einer siRNA1-Behandlung bezüglich ihres invasiven Potentials getestet. Die Transfektanten, die CapG-R (Sequenz codiert für die Arginin Variante von CapG und weist eine Mutation in der siRNA1-Bindungsstelle auf) und CapGMut3,7-R (Arginin-Variante; T₃ und Q₇ durch Alanin ersetzt) exprimierten, zeigten nach der siRNA1-Behandlung einen mit der MDA-MB 231 (ohne siRNA1-Behandlung) vergleichbaren Anteil an invasiven Zellen.

Die Histidin-Variante (CapG-His-R) wie auch die CapGMut337-R (Unterdrückung der Serin₃₃₇-Phosphorylierung durch Austausch mit Alanin) und CapGMut3,7+337-R exprimierenden Transfektanten zeigten eine etwas geringere Menge an invasiven Zellen. Bezogen auf die CapG-R exprimierenden MDA-MB 231 Zellen konnten nur ca. 60-65% dieser Zellen durch das Matrigel wandern.

4 Diskussion

Die Migration von metastatischen Zellen wird als eine amöboide Bewegung beschrieben, eine Form der Bewegung, für die eine koordinierte Modulation des Actincytoskeletts notwendig ist [Folger *et al.*, 1999]. An dieser Modulation sind Actin-bindende Proteine beteiligt, die mit dem Actinnetzwerk interagieren, es modulieren und so den Umbau kontrollieren [Lauffenburger *et al.*, 1996]. Es gibt bislang viele Hinweise dafür, dass Actin-bindende Proteine u.a. CapG eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung eines Tumors spielen. Bislang konnte u.a. eine Erhöhung der CapG-Expression in Okular-Melanomen [Van Ginkel *et al.*, 1998], in Glioblastomen [Lal *et al.*, 1999], in ovariellen Adenokarzinomen [Pantheen *et al.*, 2008], in Pankreaskarzinomen [Thompson *et al.*, 2008] und in Mammakarzinomen [Dahl *et al.*, 2005] nachgewiesen werden.

Ein Aspekt dieser Arbeit war die Überprüfung der Expression von CapG in verschiedenen MaCa-Zelllinien. Dafür wurde die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Eine relative Quantifizierung der spezifischen Templates erfolgte durch die Real-Time PCR. Die Real-Time PCR ist eine sehr spezifische, sensitive und reproduzierbare Methode und ist anderen quantitativen Methoden, bei denen z.B. die finalen Mengen verglichen werden, vorzuziehen [Freeman *et al.*, 1999]. GAPDH und Actin dienten als Housekeeping-Gene, wodurch die Ergebnisse für die jeweiligen Proben unter Verwendung der ΔCt -Formel miteinander verglichen werden konnten.

Um die Ergebnisse der Real-Time PCR abzusichern, wurden die verwendeten Primer auf ihre Spezifität getestet. Dabei konnte durch die Ermittlung der Schmelztemperatur der PCR-Produkte nach der Real-Time PCR gezeigt werden, dass es sich um spezifische Amplifikate handelte. Die ermittelten Schmelzpunkte für die doppelsträngigen Produkte stimmten mit denen durch das Programm Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) berechneten Werte für die gewünschten PCR-Produkte überein.

In vier von sieben Mammakarzinom-Zelllinien konnte eine erhöhte Expression von CapG, im Vergleich zu der Mammaepithel-Zelllinie MCF-12A, nachgewiesen werden. Die MDA-MB 231 Zellen wies eine 10-fach erhöhte Expression von CapG auf. Hingegen zeigten die Zelllinien ZR-75-1, SKBR-3 und BT-20 eine geringere Expression von CapG, als MCF-12A. Dahl *et al.* (2005) konnten ebenfalls durch CHIP-Analysen in 31% (n=50) und durch Real-Time PCR in 54% (n=24) der untersuchten Gewebeproben von Patientinnen, die ein invasiv duktales Mammakarzinom aufwiesen, eine erhöhte CapG-Expression nachweisen.

CapG wurde als überexprimiert bezeichnet, wenn mindestens 20% des Tumorgewebes das Protein doppelt so stark exprimierten, wie das entsprechende Normalgewebe.

Die durch Real-Time PCR ermittelte Anzahl der MaCas und der MaCa-Zelllinien, die eine CapG-Überexpression aufweisen liegen demnach bei 54% bzw. 57%.

Mammakarzinome zeichnen sich durch eine hohe Metastasierungsrate aus. Weitere Daten zeigen, dass Tumore die häufig Metastasen bilden, wie Glioblastome und Melanome auch eine erhöhte CapG-Expression besitzen. Beispielsweise zeigten Expressionsanalysen, dass Glioblastome eine um das 8-fache erhöhte CapG mRNA-Menge aufweisen [Lal *et al.*, 1999]. Es stellt sich die Frage, ob ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von CapG und dem Metastasierungs- bzw. Invasionspotential, besteht. Es wäre auch möglich, dass die Expression von CapG nur in einem indirekten Zusammenhang dazu steht.

De Corte zeigte, dass eine moderate Erhöhung der CapG-Expression die Invasion von Nierenepithel (MDCK)-Zellen in eine Kollagen Typ I-Matrix erhöht [De Corte *et al.*, 2004].

Um zu untersuchen, ob dies auch bei den MaCa-Zelllinien zutrifft, wurden zwei Zelllinien ausgewählt, die sich in ihrer CapG-Expression deutlich voneinander unterscheiden. Die BT-20 Zellen, wiesen eine ca. zehnfach geringere RNA-Menge an CapG auf als die MDA-MB 231 Zellen, welche ein im Vergleich zu anderen Mammakarzinom-Zelllinien hohes Invasionspotential aufweisen [Renz *et al.*, 2008]. Diese Eigenschaft stimmt mit der Annahme überein, dass die Expression von CapG einen Einfluss auf die Mobilität und Invasivität der MaCa-Zellen hat.

Durch ihre unbegrenzte Lebensdauer und leichte Kultivierung sind Zelllinien für funktionelle Versuche sehr gut geeignet. Es soll hier jedoch angemerkt werden, dass die Repräsentativität von Zelllinien ein Problem darstellt. Die Kultivierung von Zellen eines Tumors wird vorgenommen, um die Mechanismen der Entstehung und Entwicklung eines Tumors besser untersuchen zu können. Trotz der beachtlichen Rolle, die Zelllinien in der Forschung spielen, werden sie oft als ein nicht repräsentatives Modell für den Tumor angesehen. Die Heterogenität eines Tumors wird durch die Zelllinien nur schlecht wiedergespiegelt, da die Kultivierungskonditionen zur erheblichen Eliminierung von einigen Tumorzellen führen. Die genetische Instabilität von Tumorzellen, führt oft zu erheblichen Unterschieden einer Kultur, was zu so genannten Sub-Populationen führt. Dieses verhindert die Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die in verschiedenen Laboren gewonnen werden [Lacroix & Leclercq, 2004].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Invasivität der metastatisch aktiven Zelllinie (MDA-MB 231) durch siRNA dosisabhängig reduziert wird. Nach einer fünftägigen

Behandlung der Zellen mit einer 12,5 nM siRNA1-Lösung war durch Western Blot-Analyse kein CapG mehr nachweisbar und die Invasivität der MDA-MB Zellen sank auf ca. 13 % (verglichen mit den Kontrollzellen ohne siRNA1-Behandlung). Die siRNA1 wurde für die Versuche ausgewählt, da diese im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten siRNAs2 und 3, zu der deutlichsten Unterdrückung der CapG-Expression geführt hat.

Dass die Unterdrückung der CapG-Expression einen deutlichen Einfluss auf die Invasivität von Karzinomzellen hat wurde ebenfalls von Thompson *et al.* (2006) gezeigt. Die Pankreaskarzinom-Zelllinien Panc-1, Suit-2 und MiaPaCa-2 wiesen nach der Behandlung mit siRNA eine beträchtliche Reduktion des Invasionspotentials auf. Die Art, wie die Zellmobilität beeinflusst wurde war dabei jedoch zellspezifisch. Die Zelllinie Suit-1 zeigte nach der siRNA-Behandlung sowohl im Invasionsassay, als auch im Wundheilungsassay eine deutliche Beeinträchtigung. Bei den Zelllinien Panc-1 und MiaPaCa-2 hatte die reduzierte CapG-Expression entweder keinen Einfluss auf die Migration der Zellen im Invasionsassay, bzw. führte zu keiner geringeren Rate in der Wundschließung. CapG scheint demnach in unterschiedlicher Weise an der Regulation der Mobilität beteiligt zu sein, oder weitere Faktoren spielen dabei eine Rolle [Thompson *et al.*, 2006].

Bei der Zelllinie BT-20 konnte das Invasionspotential durch eine ca. sechsfache Erhöhung der CapG-Proteinmenge, mittels viraler Transfektion und stabiler Expression von CapG, deutlich gesteigert werden. Die Ergebnisse deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der CapG-Expression und der Invasivität der MDA-MB 231 und der BT-20 Zellen hin. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass die Zelllinie T47D ebenfalls eine erhöhte CapG-Expression aufweist ohne ein hohes Invasionspotential zu besitzen [Lacroix and Leclercq, 2004]. Demnach scheint zwar die Expression von CapG einen entscheidenden Einfluss auf die Invasivität der Zelllinien zu haben, es müssen aber noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Erst wenn auch diese erfüllt sind, führt eine hohe CapG-Expression auch zu einer erhöhten Invasivität.

Ein bedeutender Faktor ist dabei offenbar die Lokalisation von CapG, wie bereits von De Corte *et al.* (2004) gezeigt wurde. Durch die Kopplung einer NES (Kernexportsignal) von Fragmin an CapG (NES-CapG) wurde die Anreicherung von CapG im Zellkern verhindert [Van Impe *et al.*, 2003] und dadurch die Kollageninvasion von MDCK Zellen inhibiert. Mutationen, die keine Auswirkung auf die Export-Aktivität der NES hatten führten nicht zur Invasion der Zellen. Im Gegensatz dazu führte die Unterdrückung des Exports durch den Austausch entscheidender Isoleucin-Reste zu einer Akkumulation von CapG im Zellkern und damit zur Invasion der Zellen in eine Kollagenmatrix. Dies führte zur Annahme, dass

die Lokalisation von CapG im Zellkern mit einem invasiven Phänotypen im Zusammenhang steht [De Corte *et al.*, 2004].

Die subzelluläre Fraktionierung der Zelllinien MDA-MB 231, BT-20 und BT-20 S11-CapG-IN zeigte, dass bei den MDA-MB 231 Zellen mehr als 50% des CapG-Proteins im Zellkern vorliegt. Bei den BT-20 Zellen wurde kein nucleäres CapG nachgewiesen. Auch eine Erhöhung der Probenmenge der nucleären Fraktion führte zu keinem Nachweis von CapG im Zellkern mittels Western Blot. Die Zelllinie BT-20 S11-CapG-IN zeigte ebenfalls einen hohen Anteil an nucleärem CapG, jedoch lag mehr cytoplasmatisches CapG vor. Bei den MDA-MB 231 Zellen scheint bei etwa gleicher CapG-Menge ein höherer Anteil von CapG im Zellkern vorzuliegen, als bei der BT-20 S11-CapG-IN Transfektanten. Durch die Überexpression von CapG in den BT-20 Zellen kam es dennoch zu einer starken Akkumulation von CapG im Zellkern und zu einer Steigerung des Invasionspotentials. Der geringere nucleäre CapG-Anteil bei den BT-20 Transfektanten, im Vergleich zu dem der MDA-MB 231 Zellen, könnte die geringere Invasivität der Zellen trotz einer deutlich gesteigerten CapG-Expression erklären. Dies unterstützt die oben genannten Ergebnisse für MDCK Zellen, bei denen die Menge an nucleärem CapG mit dem Invasionspotential der Zelle korreliert.

Zudem ist während der subzellulären Fraktionierung und dem anschließenden Western Blot aufgefallen, dass mehrer CapG-Banden detektiert wurden (Abb. 3.4 rote Pfeile), die sich in den Kompartimenten unterschiedlich verteilen. Um das genauer zu untersuchen wurde eine weitere Fraktionierung durchgeführt, bei der das Aufbrechen der Kerne während der Zentrifugation durch ein Sucrosekissen verhindert werden sollte.

Für die Fraktionierung und auch für die spätere Aufreinigung von CapG dienten humane Leukozyten als Ausgangsmaterial. Die Trennung der cytoplasmatischen und nucleären Proteine wurde nach der subzellulären Fraktionierung stets im Western Blot durch Kompartimentierungskontrollen überprüft. Dabei waren keine oder nur sehr geringe Anteile cytoplasmatischer Proteine im Zellkern und umgekehrt nachweisbar.

Auch bei den Leukozyten konnte eine Abweichung in der Bandenanordnung der beiden Fraktionen nach SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot und ein hoher nucleärer CapG-Anteil nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für den hohen Anteil an nucleärem CapG bei den Leukozyten könnte die Funktion dieser Zellen sein. Als Leukozyten fasst man verschiedene Zelltypen zusammen, die zelluläre Elemente des menschlichen Immunsystems darstellen. Im Gegensatz zu Erythrozyten sind Leukozyten amöboid beweglich und können aus dem Blutstrom in verschiedene Zielgewebe einwandern. Diesen Vorgang bezeichnet man als transepitheliale Migration. Das deutet darauf hin, dass Leukozyten große Ähnlichkeiten zu metastatischen Zellen aufweisen

Die zwei-dimensionale Auftrennung der cytoplasmatischen und nucleären Fraktion und ein anschließender Western Blot zeigten, dass sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern mehrere CapG-Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (IEP) vorlagen. Die Varianten wiesen isoelektrische Punkte zwischen 6,1 und 5,6 auf und trennten sich in einer Art „Perlenschnur“ auf. Dabei waren, bis auf Ausnahme des Spots mit dem sauersten isoelektrischen Punkt, alle Varianten als Doppelspots angeordnet.

Diese Doppelspots wurden ebenfalls von Thompson *et al.* (2006) beschrieben. Die CapG-Varianten verschiedener Pankreaskarzinomproben und Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese getrennt und durch Western Blot Analyse als CapG identifiziert. Es wurden mehrere CapG-Varianten detektiert, die durch MALDI-TOF MS-Analysen als CapG identifiziert werden konnten. Der Grund für die Bildung dieser Paare konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Der Vergleich des Spotmusters der cytoplasmatischen und nucleären Proben zeigte, dass die beiden basischsten Spots nur im Cytoplasma vorlagen. Die anderen schienen im Cytoplasma und im Zellkern in vergleichbaren Mengen vorzuliegen.

Die verschiedenen Spots bestätigten, dass es verschiedene CapG-Varianten gibt, welche sich durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese in deutliche Spots auftrennen lassen. Die dabei ermittelten unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der CapG-Varianten deuten auf mehrere posttranslationale Modifikationen von CapG hin.

Um zu untersuchen, welche Modifikationen zu den unterschiedlichen CapG-Spots führen und welchen Einfluss sie auf die subzelluläre Lokalisation und Funktion des Proteins haben, mussten diese zunächst identifiziert werden.

Publizierte Daten weisen auf eine Phosphorylierung des CapG-Proteins an Serin- und Threoninresten hin. Dabei wurden Fibroblastenzellen der Maus als Versuchsmaterial verwendet. Die Analyse mit radioaktiv markiertem Schwefel (^{35}S) führte nach Immunopräzipitation und zwei-dimensionaler Auftrennung des CapG-Proteins zu einem Nachweis von drei Proteinspots (a-c), wobei das Signal des Spots mit dem sauersten isoelektrischen Punkt (6,5) sehr schwach war. Wurde Anstelle des radioaktiv markierten Schwefels Phosphat (^{32}P) genutzt, konnten hingegen vier deutliche Spots (a-d) detektiert werden. Der zusätzliche Spot (d) wies einen saureren IEP, als die durch ^{35}S -Markierung identifizierte sauerste Variante auf. Nach der ^{32}P -Markierung zeigte der Spot c ein deutlich stärkeres Signal, als der Spot b. Der Anteil der Variante b am gesamten CapG war jedoch deutlich höher, wie durch die ^{35}S -Markierung gezeigt wurde. Das deutet auf eine Zunahme des Phosphorylierungs-Statuses von der Variante b zur c-Variante hin. Der Anteil an phosphoryliertem CapG wurde auf insgesamt 25 +/- 7% geschätzt und wurde durch eine Phosphatase-Behandlung nahezu komplett eliminiert [Onoda and Yin, 1993].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Intensitäten der sauren CapG-Spots (IEP 5,7-5,6) durch die Isolierung der Gesamtproteine aus MDA-MB 231 Zellen unter Verwendung von Phosphatase-Inhibitoren deutlich gesteigert wird. Zudem führte eine Phosphatase-Behandlung des Proteinextrakts zu einer deutlichen Reduktion der sauren CapG-Varianten. Diese Ergebnisse decken sich mit den publizierten Daten, dass die saureren Varianten phosphoryliert sind und etwa einen Anteil von 30% am Gesamt-CapG haben. Die gewonnenen Daten deuten jedoch nur auf eine Phosphorylierung der Varianten mit den isoelektrischen Punkten von 5,7 bis 5,6 hin. Die Mengen der CapG-Varianten mit den isoelektrischen Punkten zwischen 6,07 und 5,8 konnten durch die Phosphatase-Behandlung nicht reduziert werden bzw. nahmen anscheinend sogar zu (Abb. 3.6). Es wurden hier demnach deutlich mehr CapG-Varianten nachgewiesen, die neben der Phosphorylierung noch weitere Modifikationen aufzuweisen scheinen. Durch massenspektrometrische Analysen sollten die Phosphorylierungsstellen und mögliche weitere Modifikationen identifiziert werden.

Für eine massenspektrometrische Analyse der Spots, musste CapG zunächst angereichert und durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese getrennt werden. Für die Anreicherung von CapG wurde ein chromatographisches Verfahren genutzt, welches auf einer Ca^{2+} -abhängigen Interaktion von CapG mit der Phenylsepharosematrix beruht und 1990 beschrieben wurde [Johnston *et al.*, 1990]. Durch diese Methode werden jedoch auch weitere Ca^{2+} -abhängige Proteine, wie Calmodulin isoliert. Aus ca. 1,5 g löslicher Proteine (Extrakt) wurde ca. ein mg CapG gewonnen. CapG hatte einen Anteil von ca. 30% am Eluat der Chromatographie. Die neben CapG angereicherten Proteine stellten kein Problem dar, da vor der massenspektrometrischen Analyse die Proteine des Eluats zunächst zwei-dimensional elektrophoretisch aufgetrennt und so voneinander separiert wurden.

Bei der zwei-dimensionalen Auftrennung durch die vorgefertigten Immobilon-Streifen war eine gute Separation der verschiedenen Spots möglich, was eine Differenzierung zwischen den Doppelspots, die eine Differenz von 0,06 in ihren isoelektrischen Punkten aufwiesen, erleichterte. Zunächst wurde der Grund für die Bildung dieser Doppelspots durch massenspektrometrische Analysen geklärt werden.

In beiden Spots konnte eine N-terminale Acetylierung (Differenz von 43 Da) nachgewiesen werden, die zu einem saureren isoelektrischen Punkt des Proteins führt und so die Differenz zwischen den theoretischen (6,18 und 5,96) und den ermittelten isoelektrischen Punkten von 5,88 und 5,82 der am stärksten exprimierten Varianten 3 und 4 (2R und 2H) erklärt. Bei Onoda *et al.* nahm die basische Variante mit einem IEP von 6,7 den größten Anteil am gesamten CapG ein [Onoda and Yin, 1993]. Das unmodifizierte

CapG-Protein aus der Maus weißt nach den Vorhersagen (IP-Calculator) im Gegensatz zum humanen CapG einen IEP von 7,2 auf. Das deutet darauf hin, dass die von Onoda und Yin (1993) identifizierte basische Variante (a), ebenfalls eine N-terminale Acetylierung aufwies, was die Verschiebung des IEPs von 7,2 zu 6,7 erklärt.

Bei der Analyse des Spots 3 (2R) konnte ein Peptid mit der Masse von 1861,00 Da identifiziert werden, welches den Aminosäuren 320-335 zugeordnet werden konnte. Die in der MS/MS-Analyse bestimmte Sequenz des Peptides 320-335 stimmte mit der bekannten Aminosäure-Sequenz des CapG-Proteins überein und schien zunächst nicht für den unterschiedlichen isoelektrischen Punkt der Spots 3 (2R) und 4 (2H) verantwortlich zu sein. Die massenspektrometrische Analyse des Spots 4 (2H) zeigte jedoch, dass in dieser Variante an der Position 335 ein Histidin anstelle eines Arginins vorliegt. Die Auswirkung dieses Aminosäureaustausches auf den isoelektrischen Punkt beträgt theoretisch 0,06 (IP-Calculator). Dieser Unterschied stimmt genau mit der ermittelten IEP-Differenz der beiden Spots bei der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese überein. Die CapG-Varianten die an der Position 335 ein Arginin aufweisen werden im Folgenden nur noch mit „R“ und die saurere Variante, welche an der Position 335 ein Histidin aufweist als „H“ bezeichnet. Der Austausch der Aminosäuren ist in einer bereits beschriebenen (rs6886) genetischen Varianz (single-nucleotide polymorphism; SNP) des humanem CapGs begründet. Die Histidin-Variante wurde hier jedoch erstmals auf Proteinebene nachgewiesen und identifiziert. In dieser Arbeit wurde zudem eine Genotypisierung bezüglich dieses Polymorphismus u.a. bei acht Mammakarzinom-Zelllinien durchgeführt. Dabei codierten nur die Zelllinien T47D und Hec1A homozygot für die Histidin- bzw. die Arginin-Variante, die anderen Zelllinien u.a. auch die MDA-MB 231 und BT-20, waren hingegen heterozygot.

Bei der massenspektrometrischen Analyse des Spots 4R konnte am Serinrest₃₃₇ eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dadurch konnte auch das Fehlen des letzten Doppelspots (Variante 4H) erklärt werden. Das Erkennungsmotiv u.a. für die PKC lautet „RES“, die Histidin-Variante weist an dieser Position die Sequenz „HES“ auf. Dadurch kommt es zur Zerstörung des Kinase-Erkennungsmotivs und zu keiner Phosphorylierung der Histidin-Variante an dieser Position.

Die genetische Varianz führt demnach zu einem Austausch einer Aminosäure in einer Erkennungssequenz von CapG, die für die Phosphorylierung des Proteins entscheidend ist.

Bei den massenspektrometrischen Analysen der Spots 1R und 1H konnte kein Peptid, welches den ersten 25 Aminosäuren des CapG-Proteins (2785,54 Da) entspricht, sondern nur eine Peptid bestehend aus den Aminosäuren 4-25 (2364,10 Da) identifiziert werden.

Bei den Spots 1Rs und 1Hs konnte hingegen ein Peptid detektiert werden, welches den Aminosäuren 7-25 (2034,23 Da) entspricht. Die Verschiebung der isoelektrischen Punkte der Varianten 1R, 1H, 1Rs und 1Hs ist dadurch zu erklären, dass es durch die N-terminale Abspaltung der ersten drei bzw. sechs Aminosäuren ebenfalls zur Abspaltung des N-terminal acetylierten Methionins (M-Ac) kommt. Eine Acetylierung resultiert, wie bereits erwähnt, in einer Anordnung der Variante im saureren pH-Bereich während der isoelektrischen Fokussierung. Die Abspaltung oder die Inhibition der N-terminalen Acetylierung führt dementsprechend zu einer Verschiebung der Variante in den basischeren Bereich [Kimura *et al.*, 2000].

Bei den nach der 35S-Markierung identifizierten CapG-Varianten der Maus [Onoda and Yin, 1993] konnte neben dem anscheinend N-terminal acetyliertem CapG (IEP 6,7) keine weitere basischere Variante detektiert werden. Die zwei-dimensionale Auftrennung der CapG-Varianten der Maus nach der Behandlung mit Phosphatase war leider deutlich schlechter, als die des humanen CapGs in der vorliegenden Arbeit. Das könnte an der schlechteren Auftrennung des Proteins, durch die Verwendung selbst gegossener Gele für die erste Dimension, liegen. Durch die Reduktion der sauren CapG-Varianten schien jedoch eine neue basische Variante detektiert werden zu können, auf die jedoch nicht eingegangen wurde. Diese müsste dem hier nachgewiesenen N-terminal verkürzten CapG entsprechen.

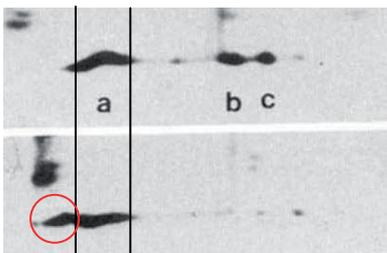


Abb.4.1: CapG-Varianten der Maus nach Phosphatase-Behandlung, zwei-dimensionaler Gelelektrophorese und Western Blot [Onoda and Yin, 1993]: Nach der Phosphatase-Behandlung von CapG (unten) lässt sich eine neue basische Variante (rot umrandet) detektieren. Das könnte auf eine N-terminal verkürzte CapG-Variante der Maus hindeuten.

Bei der Variante 1Rs konnte neben der Abspaltung der ersten sechs Aminosäuren eine N-terminale Pyroglutamatbildung nachgewiesen werden. Ein Pyroglutamat entsteht, wenn die Seitenkette eines N-terminalen Glutamins oder Glutamats mit dem Aminoterminus des Protein-Rückrats einen Ring bildet [Busby *et al.*, 1987].

Pyroglutamatbildung:

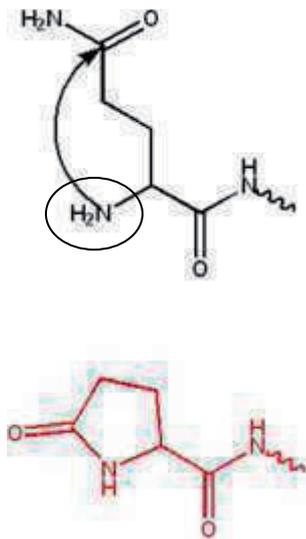


Abb.4.2: Bildung von Pyroglutamat: Durch die Abspaltung von sechs Aminosäuren des CapG-Proteins kommt es zu einem N-ständigen Glutamin. Dieses bildet mit der NH_2 -Gruppe (umrandet) des Proteinerückgrats einen Lactam-Ring wobei ein NH_3 -Molekül (17 Da) frei wird. Im Falle eines Glutamats würde bei einer Ringbildung anstelle eines Ammoniaks- ein Wassermolekül (16 Da) freigesetzt werden.

Durch massenspektrometrische Analyse konnte demnach eine N-terminale Acetylierung, eine Aminosäurevarianz (begründet in einem SNP), die Phosphorylierung von Serin₃₃₇ und die N-terminale Abspaltung von drei bzw. sechs Aminosäuren und eine Pyroglutamatbildung nachgewiesen werden. Die Phosphorylierungsstelle der Variante des Spots 3R wurde hingegen bislang nicht identifiziert.

Trotz hochsensitiver Nachweismethoden kommt es vor, dass Modifikationen nicht nachgewiesen werden können. Die Identifizierung und Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen werden durch mehrere Aspekte erschwert: Wegen der regulatorischen Funktion von posttranslationalen Modifikationen liegt innerhalb der Zelle meist nur ein geringer Anteil eines Proteins entsprechend verändert vor. Zudem sind die Modifikationen an den Seitenketten der Aminosäuren oft sehr instabil, was während der Proteinanreicherung und der Identifizierung durch massenspektrometrische Analysen zu Verlusten der Modifikationen führen kann [Seo and Lee, 2004]. Der Anteil der Varianten 3R und 3H am Gesamt-CapG lag bei ca. 12 %. Nach der Anreicherung von CapG und zwei-dimensionaler Gelelektrophorese konnte die Phosphorylierungsvariante noch nachgewiesen werden, es könnte jedoch u.a. während des tryptischen Verdaus zu einer Abspaltung der Phosphatgruppe gekommen sein.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Phosphorylierungsstelle aufgrund der unvollständigen Sequenzabdeckung nicht nachgewiesen werden konnte. Die Proteinabdeckung der Varianten 3R und 3H lag bei ca. 60 %, die von Spot 4R bei 40 %. Die Identifizierung der Phosphorylierungsstelle Serin₃₃₇ könnte zum einen darin begründet sein, dass die Phosphorylierung unter den Analysebedingungen stabiler ist, als die

Phosphorylierungsstelle der Varianten 3R und 3H. Zum anderen wäre es aber auch möglich, dass nur die Sequenzabdeckung für die Identifizierung entscheidend war.

Da die Identifizierung der zweiten Phosphorylierungsstelle von CapG (Spot 3R) durch massenspektrometrische Analysen nicht möglich war, sollte der Austausch von sieben potentiellen Phosphorylierungsstellen (ermittelt mit den Programmen NetPhos 2.0 und PhospFinder) gegen Alanin zeigen, ob diese im CapG-Protein phosphoryliert werden. Die Mutagenese eines der Serin- oder Threoninreste unterdrückt die Phosphorylierung, was sich nach der zwei-dimensionalen Auftrennung der Varianten durch das Fehlen des Spots 3R bemerkbar machen sollte. Um das mutierte exogene CapG vom endogenen CapG unterscheiden zu können, wurde für die Mutagenese die CapG Sequenz verwendet, die ein Arginin an der Aminosäureposition 335 codiert. Für die transiente Transfektion wurde hingegen eine MaCa-Zelllinie genutzt, welche homozygot für die Histidin-Variante codiert (T47D). Alle CapGMut(S_x/T_x)-Transfektanten (S_{69/70}A, S₁₀₃A; T₁₅₁A; S₂₀₀A; T₂₁₃A; T₂₄₀A) wiesen die Variante 3R auf. Das bedeutet, dass keine der sieben potentiellen Phosphorylierungsstellen bei CapG phosphoryliert wird.

Die Herausforderung nach der Bestimmung von posttranslationalen Modifikationen liegt darin, diese in einen physiologisch relevanten Kontext zu setzen.

Stabile Modifikationen, wie die Bildung von Disulfidbrücken und die Glykosylierung sind für die Reifung eines neu synthetisierten hin zum funktionellen Protein essentiell. Viele weitere Modifikationen sind transient und spielen entscheidende Rollen in der Regulierung von Proteinen. Die meisten eukaryotischen Proteine weisen nur eine Art der posttranslationalen Modifikation auf. Anstelle von Einzel-Modifikationen kommt es bei einigen Proteinen jedoch zu einer so genannten „Mehrfach-Stellen-Modifikation“. Die Menge an posttranslationalen Modifikationen eines Proteins korreliert dabei häufig mit der biologischen Bedeutung und der Komplexität des entsprechenden Organismus [Yang, 2005]. Besitzt ein Protein eine oder mehrere verschiedene Modifikationen kann sich die Diversität der Genprodukte drastisch erhöhen. Durch Allel-Variationen, mRNA Spleißen und posttranslationalen Modifikationen kann aus dem humanen Genom, welches nur ca. 22,000 Gene codiert, hunderttausende verschiedene Genprodukte generiert werden. Jedoch liegt in einer Zelle eines spezifischen Gewebes unter normalen physiologischen Bedingungen nur eine gewisse Teilmenge der diversen Proteine vor [Jensen, 2006]. Auf die funktionelle Bedeutung der hier identifizierten Modifikationen von CapG, soll im Weiteren eingegangen werden.

Während einer Proteinaufreinigung und der weiteren Charakterisierung kann es neben dem Verlust von Modifikationen, wie der Phosphorylierung, auch zu einer unspezifischen

Degradation des Proteins durch Proteasen kommen. Die Präparation von CapG wurde ausschließlich bei 4°C und unter der Verwendung von Protease-Inhibitoren durchgeführt. Zudem sollte durch weitere Versuche ausgeschlossen werden, dass die N-terminale Abspaltung bei den Varianten 1R, 1H, 1Rs und 1Hs erst während der Anreicherung des CapG-Proteins entstehen. Dazu wurden frisch isolierte intakte Leukozyten direkt in TCA aufgenommen. Die zwei-dimensionale Auftrennung der Varianten und der anschließende Western blot zeigten, dass sowohl die Varianten 1R und 1H (N-terminaler Abbau von drei Aminosäuren), als auch die Varianten 1Rs und 1Hs (N-terminaler Abbau von sechs Aminosäuren und Pyroglutamatbildung) vorliegen. Das bedeutet, dass es wahrscheinlich nicht während der Aufreinigung des Proteins zu einem N-terminalen Abbau kommt.

Zudem kann es während der Beladung der IEF-Streifen mit der Probe zu einem Abbau der Proteine durch noch aktive Proteasen kommen [Finnie and Svensson, 2002]. Dabei reicht bereits die Verwendung von Protease-Inhibitoren aus, um die Degradation der Proteine zu verhindern. Da es sich bei den durch zwei-dimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennten CapG-Proben um bereits weit fortgeschrittene Aufreinigungen handelte, sollte der Großteil an Proteasen bereits aus der Probe entfernt worden sein. Ein Vergleich zeigte, dass die Zugabe von Protease-Inhibitoren zum Equilibrierungs-/Probenpuffer keinen Einfluss auf das Mengenverhältnis der CapG-Varianten nach der zwei-dimensionalen Gelelektrophorese hatte. Die Abwesenheit von den Inhibitoren führte demnach nicht zu einer Zunahme der Varianten 1R, 1H, 1Rs und 1Hs.

Eine Analyse von BT-20 Transfektanten, die entweder das CapG-GFP oder das GFP-CapG Fusionsproteinen exprimierten bestätigten diese Ergebnisse. Bei den CapG-GFP-Protein exprimierenden Transfektanten konnte nach der SDS-Gelelektrophorese sowohl mit dem CapG als auch mit dem GFP-Antikörper nur eine Bande bei ca. 70 kDa, die dem Fusionsprotein entspricht, nachgewiesen werden. Hingegen konnte bei den GFP-CapG exprimierenden Transfektanten neben der 70-kDa Bande zusätzlich eine Bande bei ca. 30 kDa mit dem GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass es bei dem GFP-CapG, jedoch nicht bei dem CapG-GFP Fusionsprotein zwischen GFP und CapG zu einer Spaltung kommt. Diese muss ziemlich nah an der Fusionsstelle liegen, da sonst die Größe des abgespaltenen GFPs kleiner oder größer als 30 kDa sein müsste (nicht publizierte Daten).

Die Abspaltung der N-terminalen drei bzw. sechs Aminosäuren findet demnach nicht während der Aufreinigung und der weiteren Charakterisierung von CapG statt, sondern scheint ein Prozess in der noch lebenden Zelle zur posttranslationalen Modifikation des CapG-Proteins zu sein.

Die N-terminale Abspaltung von drei und sechs Aminosäuren konnte ebenfalls beim α B-Crystallins identifiziert werden. Die posttranslationale Modifikation von α B-Crystallin steht

im Verdacht an der Aggregation von löslichen Linsen-Proteinen und an dem damit verbundenen Verlust der Transparenz beteiligt zu sein. Der N-terminale Bereich von α B-Crystallin scheint eine Chaperon-ähnliche Funktion zu erfüllen und dessen Abspaltung nahm mit dem Alter der untersuchten Personen zu. Die Abspaltung von N-terminale Aminosäuren könnte diese Funktion beeinflussen und zur falschen Faltung der Linsen-Proteine beitragen [Kamei *et al.*, 1997].

Bei CapG scheint die N-terminale Abspaltung einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins zu haben. Onoda und Yin (1993) publizierten, dass in Makrophagen etwa 30% des gesamten CapGs im Kern lokalisiert ist. Dabei schien phosphoryliertes CapG vorzugsweise im Zellkern vorzuliegen, was zu der Annahme führte, dass die Phosphorylierung von CapG mit einer Lokalisation im Zellkern in Zusammenhang steht [Onoda and Yin, 1993]. Diese Beobachtung wurde seitdem nicht mehr bestätigt und konnte auch in diese Arbeit nicht mehr gezeigt werden. Es wurden verschiedene Methoden zur subzellulären Fraktionierung getestet, jedoch immer mit dem gleichen Ergebnis: die Verteilung vom N-terminal acetyliertem CapG und die Phosphorylierungsvarianten konnten stets im Cytoplasma und Zellkern nachgewiesen werden.

Der einzige Unterschied in der Verteilung zeigte das N-terminal verkürzte CapG, welches mit einer cytoplasmatischen Lokalisation korrelierte. Diese Ergebnisse passen zu den bereits publizierten Daten, dass das Anhängen einer GFP-Sequenz an das N-terminale Ende von CapG zu einer cytoplasmatischen Lokalisation von CapG führt [De Corte *et al.*, 2004].

Auch die Spaltung nach drei bzw. sechs Aminosäuren der CapG-Sequenz und die damit verbundene Trennung des GFP-CapG Fusionsprotein, hätte keine Akkumulation des CapGs im Zellkern zur Folge. Die N-terminal verkürzten Varianten werden offenbar nicht in den Zellkern transportiert. Die N-terminale Fusion von GFP führt demnach zur Unterdrückung der nucleären Anreicherung von CapG auch wenn GFP abgespalten wird. Vieles deutet demnach auf eine Beteiligung des N-terminus bei der Translokation von CapG hin. Deletionsversuche sollen zudem gezeigt haben, dass mehrere Bereiche des CapG-Proteins entscheidend für die Lokalisation sind [Gettemans *et al.*, 2005]. Da diese Daten nur als nicht publiziert angegeben wurden kann nicht gesagt werden, ob sie den hier gewonnenen Ergebnissen widersprechen, oder diese bestätigen.

Gezeigt wurde jedoch, dass der Zellkern-Import von CapG Energie-verbrauchend und Importin- β , jedoch nicht Importin- α abhängig ist [De Corte *et al.*, 2004]. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Kern-Transport-Faktor (NTF2) und das G-Protein Ran-GDP den nucleären Transport von CapG kontrollieren und CapG dazu an dem Kernporenprotein Nucleoporin62 (Nup62) bindet [Van Impe *et al.*, 2008]. Die Interaktion von CapG mit Nup62 alleine reicht nicht für eine nucleäre Akkumulation von CapG aus.

Es wäre jedoch möglich, dass die Assoziation mit Nup62 CapG in der näheren Umgebung von NTF2 im zentralen Kanal des NPCs (Kernporenkomplex) lokalisiert. Die Interaktion mit Ran führt wahrscheinlich zu einer Stabilisierung des Komplexes mit NTF2 und zum nucleären Import des Komplexes.

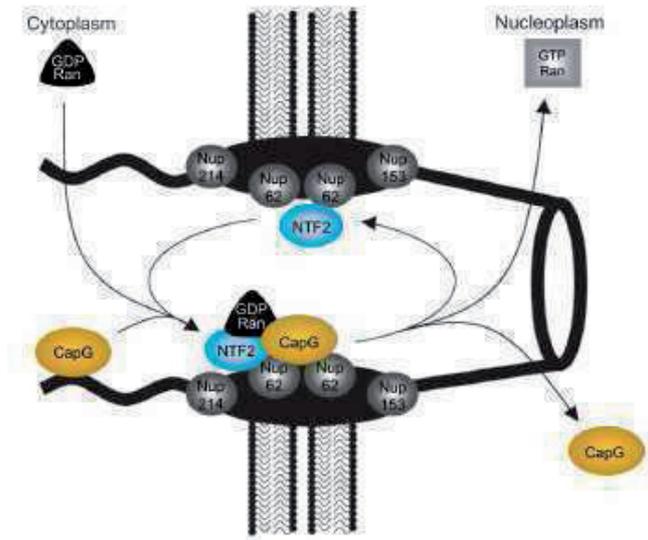


Abb. 4.3: Der nucleäre Transport von CapG wird über Ran und NTF2 reguliert. Zudem konnte gezeigt werden, dass an der CapG Translokation das Nucleoporin62 beteiligt ist. Wahrscheinlich führt die Assoziation mit Nup62 zur Rekrutierung von CapG in die direkte Umgebung und so zur Bindung von NTF2. Ran scheint den Komplex zusätzlich zu stabilisieren [Van Impe *et al.*, 2008]

Es wäre möglich, dass der N-terminus eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von CapG und den am nucleären Import beteiligten Proteinen spielt.

Auffällig war zudem, dass keine verkürzten Varianten des phosphorylierten CapGs nachgewiesen werden konnten. Die N-terminale Abspaltung von drei bzw. sechs Aminosäuren müsste zu einer Verschiebung von ca. 0,19 Einheiten in den basischeren Bereich führen. Bei der Variante 3R würde das einem isoelektrischen Punkt von 5,88 entsprechen. Dieser Spot würde also durch den Spot 2R überlagert werden. Da die Phosphorylierungsstelle von 3R nicht detektiert werden konnte, konnte auch nicht durch MS-Analyse kontrolliert werden, ob Anteile der N-terminal verkürzten phosphorylierten Variante mit im Spot 2R enthalten ist. Die N-terminale Abspaltung von der Variante 4R hätte einen isoelektrischen Punkt von 5,80 zur Folge. In diesem Bereich konnten jedoch kein Spot von CapG nachgewiesen werden. Da die Menge an phosphoryliertem CapG jedoch deutlich geringer war, als das des nicht modifizierten CapGs (nur N-terminal acetyliert) könnte es auch ein Mengenproblem sein. Die Erhöhung der CapG-Menge für die zwei-dimensionale Gelelektrophorese und ein anschließender Western Blot führte jedoch auch nicht zu einer Detektion eines Spots im erwarteten pH-Bereich. Eine N-terminale Verkürzung der phosphorylierten Varianten ist demnach unwahrscheinlich.

Da die N-terminal verkürzten Varianten offenbar mit einer cytoplasmatischen Lokalisation im Zusammenhang stehen, würde der Anteil an phosphoryliertem CapG indirekt die Menge an nucleärem CapG beeinflussen. Das könnte auch die besonders geringe Menge

an N-terminal gespaltenem CapG in der Zelllinie MDA-MB 231 erklären. Diese weist nämlich einen sehr hohen Anteil an phosphoryliertem und nucleären CapG auf. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Phosphorylierung einen „Schutz“ vor der N-terminalen Abspaltung darstellt.

Dass die Phosphorylierung einen Einfluss auf die N-terminale Abspaltung haben kann, konnte bereits beim Transmembranprotein NogoB, welches an der Gefäßneubildung [Acevedo *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2006] und der Regulation der Apoptose [Tagami *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001] beteiligt ist, gezeigt werden. NogoB wird während der Apoptose durch die Caspase-7 N-terminal verkürzt, wobei keine typische Erkennungssequenz vorlag. Bei der phosphorylierten NogoB-Variante konnte hingegen, wie auch beim CapG, keine N-terminale Abspaltung nachgewiesen werden. Durch massenspektrometrische Analysen und zielgerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Serin₁₆, welches innerhalb der Spaltstelle liegt, die N-terminalen Abspaltung verhindert [Schweigreiter *et al.*, 2007].

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der N-terminalen Phosphorylierung und der unterdrückten Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren des CapG-Proteins besteht wurden alle N-terminalen (Aminosäuren 1-25) möglichen Phosphorylierungsstellen durch Alanin ersetzt. Die Ergebnisse von Onoda und Yin (1993) zur Auftrennung der Phosphoaminopeptide von CapG durch Dünnschichtchromatographie, deuteten auf eine ausschließliche Phosphorylierung von Serin- und Threoninreste hin.

De Corte *et al.*, (1996) zeigten jedoch, dass CapG durch pp60^{c-src} *in vitro* phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung wird dabei deutlich durch die Bindung von CapG an Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) erhöht. Neben CapG war ebenfalls bei Gelsolin, Profilin und Fragmin eine PIP₂-abhängige Phosphorylierung durch die Tyrosin-Kinase nachweisbar, was auf eine mögliche grundlegende Rolle zur Regulierung von Actin-bindenden Proteinen hindeutet [De Corte *et al.*, 1996]. Die Phosphorylierungsstellen wurden jedoch nicht beschrieben.

Wie in der Einleitung erwähnt konnte in mehreren Karzinomen eine reduzierte Gelsolin-Expression nachgewiesen werden. Die reduzierte Expression von Gelsolin könnte zu einer erhöhten Bindung von CapG an PIP₂ und so zu einer erhöhten Phosphorylierungsrate von CapG, führen. Eine dadurch mögliche Erhöhung des im Kern lokalisierten CapGs könnte so die Malignität dieser Tumore steigern. Bevor CapG am Kern-Actin binden könnte, müsste PIP₂ jedoch wieder entfernt werden, da dieses die Bindung von CapG an Actin verhindert.

Aus den genannten Gründen, wurden nicht nur die N-terminalen Serin- (S8, S10 und S15) und der N-terminale Threoninrest (T3) mittels gezielter Mutagenese durch Alanin ersetzt, sondern auch Tyrosin₂. Wie bei der Analyse der sieben potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden auch hier die T47D Zellen für die transiente Transfektion genutzt. Nach der Mutagenese konnte in allen Fällen die Variante 3R nachgewiesen werden. Obwohl eine hohe Anzahl an möglichen Phosphorylierungsstellen am N-Terminus vorlagen, konnte eine Phosphorylierung dieser Aminosäuren nicht bestätigt werden.

Die nächste Frage die sich stellte war, ob es sich bei der N-terminalen Pyroglutamatbildung um eine posttranslationale Modifikation handelt, oder ob diese auf die Aufreinigung und den Nachweise durch massenspektrometrische Analysen zurückzuführen ist. Pyroglutamat (pyroGlu) wird vorwiegend aus N-terminalem Glutamin während der Prohormon-Reifung unter Abspaltung von Ammoniak gebildet [Abraham and Podell, 1981; Fischer and Spiess, 1987]. Die Glutaminyl-Zyklase scheint die Transformation von N-terminalen Glutaminyl-Resten in Pyroglutamat während der posttranslationalen Reifung einiger sekretorischer Peptide und Proteine zu katalysieren [Busby *et al.*, 1987; Fischer and Spiess, 1987]. In den entsprechenden Hormonen wird die Pyroglutamatgruppe zur Rezeptorbindung und/oder zum Schutz vor dem Abbau durch Aminopeptidasen benötigt [Radzicka *et al.*, 1996]. Eine N-terminale Pyroglutamatbildung konnte ebenfalls beim Amyloid β -Peptid [Saido *et al.*, 1995], welches möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Alzheimer spielt, gezeigt werden. Bei der RNase 3 bildet das Pyroglutamat mit Lys9 und Ile96 Wasserstoffbrücken und fixiert dadurch die N-terminale α -Helix [Lou *et al.*, 2006]. Ein Beispiel für die Bildung und Funktion von Pyroglutamat bei cytoplasmatischen Proteinen liegt bislang nicht vor.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Pyroglutamat auch nicht-enzymatisch durch eine Ringbildung der N-terminalen Glutaminylreste unter verschiedenen physiochemischen Bedingungen [Blombäck *et al.*, 1967] aber auch während der Analyse von Proteinen entstehen kann [Thiede *et al.*, 2000]. Nach tryptischem Verdau im Gel und massenspektrometrischer Analyse von 104 Proteinen aus menschlichen Jurkat T-Zellen und aus dem *Myobakterium* zeigten alle Peptide mit einem N-terminalen Glutamin ein Pyroglutamat. In den meisten Fällen wurden jedoch ebenfalls auch nicht modifiziertes Glutamat nachgewiesen [Thiede *et al.*, 2000], was bei der massenspektrometrischen Analyse des Spots 1Rs nicht der Fall war.

Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich beim identifizierten N-terminalen Pyroglutamat um eine posttranslationale Modifikation des CapG Proteins handelt oder ob dieses während der Aufreinigung und Analyse des Proteins entstanden ist. Als

posttranslationale Modifikation könnte die Pyroglutamat-Bildung den weiteren Abbau der verkürzten CapG-Varianten durch Aminopeptidasen nach der Abspaltung der ersten sechs N-terminalen Aminosäuren, einschließlich des acetylierten Methionins, verhindern. Nach dem Austausch von Glutamat₇ gegen Alanin schien die um sechs Aminosäuren verkürzte Variante nicht mehr detektiert werden zu können (Abb. 3.23). Da die beiden N-terminal verkürzten Varianten oft nur schlecht voneinander getrennt werden konnte, war eine Differenzierung nur schlecht möglich. Durch weitere Versuche soll diese Annahme überprüft werden.

Die N-terminal um drei Aminosäuren verkürzte Variante scheint trotz fehlender Acetylierung und Pyroglutamatbildung eine gewisse Stabilität aufzuweisen, da diese stets nachgewiesen werden konnte.

Die Abspaltung des N-terminalen Methioninrests und die N-terminale Acetylierung sind die meist verbreiteten Modifikationen die bei eukaryotischen Proteinen vorkommen [Polevoda and Sherman, 2000]. Die N-terminale Acetylierung wird von einer großen Anzahl so genannter N-Acetyltransferasen (NATs) katalysiert [Polevoda *et al.*, 1999]. Die N-terminale Acetylierung geschieht bei Polypeptiden eukaryotischen Ursprungs sowohl kotranslational [Driessen *et al.*, 1985; Persson *et al.*, 1985; Polevoda and Sherman, 2000] als auch posttranslational [Dockray, 1987; MacRae, 1997; Smyth *et al.*, 1979]. Es wird vermutet, dass die N-terminale Acetylierung vor der Degradation durch Aminopeptidasen schützt [Jörnvall, 1975]. In Eukaryoten sind 85% der Proteine N-terminal acetyliert [Driessen *et al.*, 1985].

Um die Bedeutung der durch die massenspektrometrischen Analysen identifizierten CapG-Modifikationen auf die CapG-Proteinfunktion zu testen wurde versucht, diese durch gezielte Mutationen und Aminosäureaustausch zu unterdrücken. Ein Problem dabei stellte die Beeinflussung der N-terminalen Abspaltung dar. Diese wird (bspw. bei Caspasen) durch Signalsequenzen reguliert, die oft Variationen tolerieren. Wie oben bereits erwähnt, kann die Phosphorylierung zu einer Unterdrückung der N-terminalen Abspaltung führen. Da direkt an der ersten Spaltstelle ein Threonin vorlag, und eine Phosphorylierung die N-terminale Abspaltung zu verhindern scheint, könnte dieses für die Regulation entscheidend sein. Die Phosphorylierung von Threonin₃ konnte jedoch in den weiteren Analysen ausgeschlossen werden.

Die N-terminale Pyroglutamatbildung und die Phosphorylierung an Serin₃₃₇ sollte hingegen durch Austausch des Glutamins bzw. des Serins gegen Alanin unterdrückt werden können. Die N-terminale Acetylierung kann nicht durch Aminosäureaustausch verhindert werden, da eine Mutation zu einer Zerstörung des Startcodons geführt und so die Expression des Proteins verhindert hätte. Die mutierten CapG- bzw. die Arg/His-

codierenden Sequenzen wurden unter Verwendung des retroviralen Vektors S11-IN in das Genom von BT-20 und MDA-MB 231 Zellen integriert und stabil exprimiert. Die Expression von CapG konnte in den BT-20 Transfektanten deutlich gesteigert werden. Eine Analyse der CapG-Expression nach siRNA1-Behandlung der verschiedenen MDA-MB 231 Transfektanten zeigte, dass auch alle MDA-MB 231 Transfektanten eine deutlich erhöhte CapG-Expression aufwiesen, die durch siRNA1-Behandlung um ca. die Hälfte reduziert werden konnte. Die Reduzierung durch die siRNA spiegelt dabei die Menge an endogen exprimiertem CapG wieder. Durch die Einführung des Rescues in die CapG-cDNA-Sequenz kann die siRNA1 durch eine Mutation in der Bindungsstelle, nicht mehr an die mRNA binden und so die Expression unterdrücken. So kann nur das exogene CapG exprimiert werden, wodurch die Auswirkung des mutierten CapGs auf die Funktion besser untersucht werden kann.

Das in der MDA-MB 231 exprimierte mutierte CapG (Aminosäuren 3,7 und 337 durch Alanin ersetzt) zeigte einen vergleichbaren Anteil an N-terminal verkürzten Varianten, wie das nicht mutierte CapG. Durch den Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin konnte die N-terminale Verkürzung nicht unterdrückt werden. Threonin₃ ist demnach für die N-terminale Verkürzung nicht entscheidend. Die Variante 4R konnte hingegen nicht mehr detektiert werden (siehe Abbildung 3.23).

Auch hier zeigte sich wieder, dass durch die siRNA1 nur das endogen exprimierte CapG unterdrückt wurde. Eine Detektion der endogenen Histidin-Varianten war nach der siRNA1-Behandlung nämlich nicht mehr möglich.

Die in dieser Arbeit identifizierten Modifikationen und die potentiellen Phosphorylierungsstellen sind in der Abbildung 4.4, die eine 3D-Struktur modifiziert nach Zhang *et al.* (2006) zeigt, dargestellt. Da eine kristallographische Charakterisierung des nativen CapG-Proteins bislang nicht existiert, ist eine Kristallographie der CapG-Mutante (CapG-Sev), bei welcher die Aminosäuren 84-91 und 124-137 durch die Actin-bindende Helix-Sequenzen bzw. das WH2-enthaltende Segments von Gelsolin ersetzt wurden, dargestellt. Die WH (WASP-Homology) 2-Domäne ist ein ca. 35 Aminosäuren langes G-Actin bindendes Motiv [Paunola *et al.*, 2002]. Der Austausch dieser Sequenzen führte zu einer deutlich messbaren Fragmentationsaktivität des CapGs-Sevs [Zhang *et al.*, 2006]. Der Grund warum Gelsolin im Gegensatz zu CapG Actinfilamente schneiden kann liegt demnach wahrscheinlich in der Varianz dieser Sequenzen begründet.

Dargestellt ist die Ca²⁺-bindende aktive Form des Proteins [Zhang *et al.*, 2006]. CapG besitzt zwei Ca²⁺-Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität [Young *et al.*, 1994] und wird wie Gelsolin durch mikromolare Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert [Southwick and DiNubile, 1986]. Die Ca²⁺-Bindung in der S1-Domäne (Gly45 und Asp46) führt zu einer

Entfaltung der inaktiven globulären Konformation des CapG-Proteins. Die S1-Domäne entfernt sich dadurch von den sonst eng verbundenen Domänen S2 und S3, wodurch die Actin-Bindungsstellen offen gelegt werden. Die zweite Bindungsstelle ist in der S3-Domäne lokalisiert und besteht aus den Aminosäuren Asp279, Asp280 und Glu304 [Zhang *et al.*, 2006].

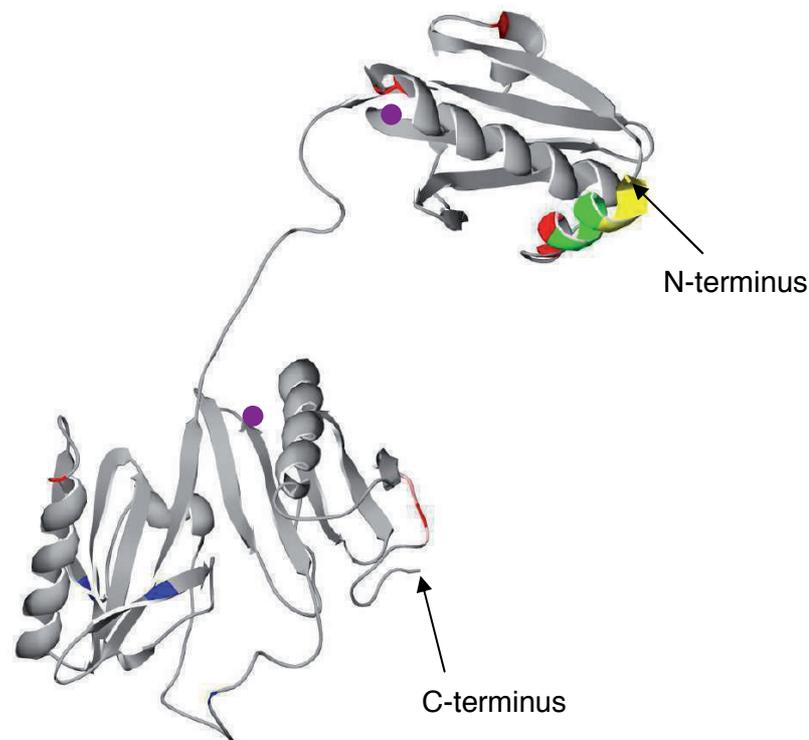


Abb.4.4: 3D-Struktur von CapG modifiziert nach Zhang (2006). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Modifikationen (die ersten N-terminalen drei und sechs Aminosäuren sind gelb bzw. grün dargestellt; Erkennungsmotiv für die Phosphorylierung an Serin₃₃₇ (rot) einschließlich des Arginins₃₃₅ sind hellrot markiert) sowie die potentiellen Phosphorylierungsstellen (Serin rot und Threonin blau), die durch Alanin ersetzt wurden, sind in der Abbildung markiert. Das gebundene Ca²⁺ ist violett dargestellt.

Die Messungen der capping-Aktivität nach proteolytischer Fragmentation von CapG (in S1 und S2/S3) und nach Herstellung N- und C-terminal verkürzter Varianten (N-terminale Verkürzung von: 22, 38, 131 und 192 Aminosäuren bzw. C-terminale Verkürzung von: 100, 158 und 220 Aminosäuren) zeigte, dass alle drei Domänen inklusive des N- und C-terminalen Bereichs von CapG für diese entscheidend sind. Das Fehlen der dritten Domäne hatte jedoch keinen Einfluss auf die PIP₂-Regulation der Capping-Aktivität von CapG. Die PIP₂-Bindungsstelle ist demnach in den ersten beiden Domänen lokalisiert [Yu *et al.*, 1990]. Die PIP₂-Bindung führt zu einer Dissoziation des CapGs vom F-Actin auch dann, wenn die Ca²⁺-Konzentration nicht im nanomolaren Bereich liegt [Southwick and

DiNubile, 1986]. CapG kann ebenfalls Ca^{2+} -abhängig G-Actin binden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstelle in der ersten Domäne des Proteins lokalisiert ist [Yu *et al.*, 1991].

Die identifizierten Modifikationen sind am N-terminalen und C-terminalen Ende von CapG lokalisiert. Beide Bereiche sind für die Capping-Aktivität des Proteins entscheidend. Es wäre möglich, dass die Modifikationen eine Auswirkung auf die Eigenschaft von CapG am schnell-wachsenden Ende der Actin-Filamente zu binden, haben.

Im Invasionsassay zeigten die Transfektanten, bei denen das Serin₃₃₇ durch ein Alanin ersetzt wurde (CapG-Mut3,7-R und CapGMut3,7/337-R) ein geringeres Invasionspotential, als die anderen Transfektanten. Bei der Histidin-Variante kommt es ebenfalls nicht zu einer Phosphorylierung am Serin₃₃₇. Die MDA-MB 231 Zellen, die die Histidin-Variante (His) exprimierten, zeigten ebenfalls eine geringere Invasivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die geringere Invasivität auf die unterdrückte Phosphorylierung des Serins₃₃₇ zurückzuführen ist. Das könnte auch das geringe Invasionspotential der homozygot für die Histidin-Variante codierenden T47D Zellen erklären, die trotz hoher CapG-Expression ein vergleichsweise geringes Invasionspotential aufweisen. Diese Ergebnisse müssen allerdings durch weitere Versuche noch abgesichert werden. Beispielsweise könnte die Identifizierung der anderen Phosphorylierungsstelle und deren Austausch gegen Alanin zeigen, ob die komplette Unterdrückung der Phosphorylierung von CapG die Invasivität noch weiter reduziert.

Bei der Genotypisierung von 113 Mammakarzinom-, 80 Ovarialkarzinom- und 12 Tubenkarzinom-Patientinnen codierten bei letzteren anstatt 8% (Anteil in der europäischen Bevölkerung) 42% der Patientinnen (n=12) homozygot für die Histidin-Variante. Führt die Expression der Histidin-Variante zu einem geringeren Invasionspotential der Zellen, würde man in Karzinomen eher eine Abnahme dieses Genotyps erwarten. Es wird jedoch diskutiert, dass viele Ovarialkarzinome eigentlich Absiedlungen entarteter Tubenzellen darstellen [Piek *et al.*, 2008]. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass nach einer Tubenligation (Verschließung der Eileiter) deutlich weniger Karzinome des Ovars auftreten [Narod *et al.*, 2001]. Die verminderte Invasivität der Tubenzellen bei Patientinnen mit einem homozygoten Genotyp für die Histidin-Variante könnte so das Risiko an einem Tubenkarzinom zu erkranken erhöhen, da die Zellen im Tuben verbleiben.

Bei der Analyse der Transfektanten bezüglich ihres Invasionspotentials zeigte sich ebenfalls, dass die Expression von CapG-R den invasiven Phänotyp der MDA-MB 231 Zellen nach der siRNA-Behandlung komplementiert. Ein Problem bei der Unterdrückung

der Expression durch siRNAs ist aber, dass auch spezifische siRNAs manchmal unspezifische Effekte hervorrufen können, so dass auch die Expression anderer Proteine beeinflusst wird (Off-Target Effekt) [Lin *et al.*, 2005]. Dieser entsteht durch die Translationshemmung von Proteinen, die eine ähnliche Nukleotidsequenz besitzen wie das eigentliche Zielgen und dann die Ergebnisse verfälschen. Am Beispiel von CapG könnte die Behandlung der MDA-MB 231 Zellen mit siRNA1 ebenfalls zur Unterdrückung der Translation eines Proteins der Gelsolin-Familie führen, welches an der Invasion der Zelle beteiligt ist. Die verringerte Invasivität der Zellen würde damit nur fälschlicherweise der verringerten CapG-Expression zugesprochen werden. Um dies auszuschließen wurde als Kontrolle nicht nur der Einfluss der Unterdrückten CapG-Expression, sondern auch der Einfluss der erhöhten CapG-Expression in den BT-20 Zellen untersucht. Zudem zeigten die „Rescue-Analysen“, dass die reduzierte Invasivität der mit siRNA1-behandelten Zellen auf die unterdrückte CapG-Expression zurückzuführen ist. Die MDA-MB 231 Zellen, die CapG-R exprimierten (wessen Expression nicht durch die siRNA1 Behandlung unterdrückt wird), zeigten nämlich eine vergleichbare Invasivität wie die nicht mit siRNA1 behandelten MDA-MB 231 Zellen. Sollte die siRNA1 Behandlung zur einer unerwünschten Unterdrückung der Expression weiterer Proteine führen, haben diese keinen Einfluss auf die Invasivität. Ansonsten könnte die Expression von CapG-R nicht den invasiven Phänotyp trotz siRNA1-Behandlung komplementieren.

CapG ist zum einen als ein Actin-bindendes Protein an der Organisation des Actin-Cytoskeletts beteiligt, was die cytoplasmatische Lokalisation von CapG erklärt. Ein Anstieg der cytoplasmatischen CapG-Menge würde zu einer Erhöhung der Actin-Dynamik führen. Zudem konnte CapG im Zellkern nachgewiesen werden. Da CapG ein Actin-modulierendes Protein ist, liegt eine Interaktion des CapGs mit dem nucleären Actin nahe. Monomeres Actin übernimmt wahrscheinlich strukturelle und regulatorische Funktionen bei der RNA-Polymerase-Maschinerie und der Chromatin-Umorganisation. Die Eigenschaft des Actins bei der ATP-Hydrolyse die Konformation zu ändern, wird zum Beispiel für die Kontrolle der Funktion des Chromatin-Umorganisations-Komplexes genutzt [Zhao *et al.*, 1998]. Es wäre möglich, dass CapG im Zellkern an nucleärem Actin des BAF-Komplexes, der ein Chromatin-Umgestaltungs-Komplex darstellt, bindet und so bei der Kontrolle der Chromosomenkondensation mitwirkt. Es könnten so bestimmte Gene oder Gen-Cluster aktiviert werden, die zu einer erhöhten Zelllokomotion führen. Dies ist jedoch nur eine Vermutung und konnte bislang nicht bestätigt werden [De Corte *et al.*, 2004].

Kürzlich konnte CapG zudem im Nucleolus detektiert werden [Hubert *et al.*, 2009]. Der Nucleolus ist das Zellkompartiment, indem die rRNA-Gene abgelesen, die rRNA

prozessiert und die Ribosomen-Untereinheiten zusammengelagert werden [Boisvert *et al.*, 2007]. Die Lokalisation von CapG im Nukleolus deutet auf eine Rolle von CapG bei der rRNA-Transkription hin.

Die in dieser Arbeit identifizierten Modifikationen könnten die verschiedenen Funktionen, die das CapG-Protein offenbar aufweist, regulieren. Die N-terminale Abspaltung von CapG korreliert mit der cytoplasmatischen Lokalisation des Proteins. Es wäre möglich, dass die N-terminal verkürzten Varianten, einschließlich des N-terminalen Pyroglutamats, einen Einfluss auf die Interaktion mit dem Actin-Cytoskelett haben. Zudem könnte über die Abspaltung und die Phosphorylierung, welche die N-terminale Abspaltung anscheinend unterdrückt, der nucleäre Anteil an CapG reguliert werden.

Da die unterdrückte Phosphorylierung von Serin₃₃₇ (Variante 4R) eine Reduktion des Invasionspotentials der MDA-MB 231 Zellen zur Folge hatte, scheinen die phosphorylierten Varianten und so auch das Vorhandensein einer Histidin bzw. Arginin-Variante von CapG einen Einfluss auf den invasiven Phänotyp dieser Zelle zu haben. Die an Serin₃₃₇ phosphorylierte Variante konnte sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern detektiert werden. Erste Analysen zeigten jedoch keine Unterschiede der beiden Varianten bezüglich Ihrer Capping-Eigenschaft. Da die nucleäre Lokalisation entscheidend für den invasiven Phänotyp zu sein scheint, wäre möglich, dass das am Serin₃₃₇ phosphorylierte CapG an Kern-Actin bindet und so einen Einfluss auf die Transkriptionskontrolle hat. Die Phosphorylierung könnte auch einen weiteren Transport in den Nucleolus fördern oder verhindern, wodurch auch diese Modifikation einen Einfluss auf die Lokalisation hätte.

Abweichungen in den CapG-Modifikation bei transformierten Zellen, wie beispielsweise eine erhöhte Phosphorylierung und ein geringerer Anteil an N-terminal verkürzten Varianten, könnte demnach zu einer gesteigerten Akkumulation von CapG im Zellkern führen und damit zu einer Steigerung des metastatischen Potentials einer Zelle führen.

5. Zusammenfassung

Die Überexpression des Actin-modulierenden Proteins CapG konnte bei einer Reihe von Karzinomen, u.a. beim Mammakarzinom, gezeigt werden. CapG ist sowohl ein cytoplasmatisches als auch ein nucleäres Protein. Untersuchungen an Macrophagen- und Nierenepithel-Zelllinien haben ergeben, dass neben einer Erhöhung der CapG-Expression offenbar auch die Lokalisation im Zellkern und eine Phosphorylierung von CapG für das metastatische Potential von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen Mammakarzinom-Zelllinien untersucht von denen 60% eine erhöhte CapG Expression aufwiesen. Als Maß für das metastatische Potential wurde ein Invasionsassay verwendet. Durch die Manipulation der CapG-Expression konnte das Invasionspotential zweier Zelllinien deutlich beeinflusst werden. (1) Die Invasivität der metastatisch aktiven Zelllinie (MDA-MB 231) wurde durch siRNA dosisabhängig reduziert. (2) Führt eine Überexpression von CapG bei der gering invasiven Zelllinie (BT-20), durch stabile Transfektion, zu einer deutlichen Steigerung der Invasivität. Der Anteil an nucleärem CapG bei den MDA-MB 231 Zellen lag bei über 50%. Die CapG-Überexpression führte bei der BT-20 zu einer ebenfalls hohen CapG-Menge im Zellkern.

Nach einer zwei-dimensionalen elektrophoretischen Auftrennung cytoplasmatischer und nucleärer CapG-Varianten aus humanen Leukozyten, konnten insgesamt 11 deutliche Spots identifiziert werden. Dabei waren 10 Spots in Doppelspots, mit Unterschieden im isoelektrischen Punkt (IEP) von 0,06, angeordnet. Eine Hemmung der Phosphatasen und eine Phosphatase-Behandlung gaben erste Hinweise auf eine Phosphorylierung der saureren CapG-Spots. Durch massenspektrometrische Analysen zeigte sich, dass die CapG-Variante mit dem sauersten IEP, welche als einzige nicht als Doppelspot angeordnet war, eine Phosphorylierung an Serin337 aufweist. Es konnte hier erstmals gezeigt werden, dass die Bildung eines Doppelspots durch den Austausch von Arginin zu Histidin an der Position 335 zustande kommt. Der Austausch ist in einer, beim Menschen bereits beschriebenen, genetischen Varianz begründet. Durch den Austausch von Arginin zu Histidin wird das Erkennungsmotiv für die Phosphorylierung an Serin337 zerstört, wodurch es nur zu einer Phosphorylierung der Arginin-Variante an dieser Position kommt, was den fehlenden Doppelspot der letzten CapG-Variante erklärt.

Eine weitere Phosphorylierungsstelle konnte durch massenspektrometrische Analysen nicht identifiziert werden. Durch Aminosäureaustausch konnten jedoch sieben potentielle Phosphorylierungsstellen ausgeschlossen werden. Die Unterdrückung der Phosphorylierung an Serin337 (CapGMut337) führte nicht zu einer unterschiedlichen

subzellulären Verteilung des CapG-Proteins. MDA-MB 231 Zellen, die nach stabiler Expression nur die Histidin- oder CapGMut337-Varianten exprimierten wiesen jedoch ein geringeres Invasionspotential auf, als die Transfektanten, die die Arginin-Varianten exprimierten.

Bei den basischen Varianten von CapG konnte eine Abspaltung der ersten drei bzw. ersten sechs Aminosäuren und eine Pyroglutamatbildung massenspektrometrisch identifiziert werden. Diese Varianten wurden nicht im Zellkern detektiert, die anderen Varianten wiesen hingegen einen vergleichbaren nucleären und cytoplasmatischen Anteil auf, was auf eine Funktion des N-terminalen Bereichs von CapG bei der nucleären Translokation hindeutet. Das Fehlen von N-terminal verkürzten phosphorylierten CapG-Varianten führte zu der Annahme, dass die Abspaltung durch eine Phosphorylierung unterdrückt und damit die nucleäre Lokalisation von CapG begünstigt wird.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die N-terminale Verkürzung und die unterschiedliche Phosphorylierung der Histidin- und Arginin-Varianten von CapG die nucleäre Translokation des Proteins bzw. das Invasionspotential einer Zellen beeinflussen.

6. Summary

Analyses of CapG-modifications and their relevance for metastasis of breast carcinoma

Overexpression of the actin-modulating protein CapG could be shown in a number of carcinomas e.g. in breast carcinomas. CapG is both, a cytoplasmic and nuclear localized protein. Analyses on macrophages- and kidney epithelial cell lines revealed that besides increased expression of CapG also its nuclear localisation is important for the metastatic potential of cells.

Approximately 60% of the analysed breast carcinoma cell lines exhibits an increased expression level of CapG. To evaluate the metastatic potential of cells a Matrigel invasion assay was used. Manipulative alterations in CapG-expression considerably affected the invasive potential of two cell lines. (1) Invasiveness of the metastatic cell line (MDA-MB 231) was reduced by siRNA in a dose-dependent manner, (2) CapG-overexpression in stable transfectants of non invasive BT-20 cells results in an increase of invasive potential. The MDA-MB 231 exhibits more than 50% of CapG in the nucleus. CapG-overexpression in BT-20 CapG transfectants leads also to a high amount of nuclear CapG.

After two-dimensional gel electrophoresis of cytoplasmic and nuclear CapG isolated from human leucocytes, eleven distinct spots could be identified. The pattern showed five double-spots with differences in their isoelectric points (pI) of 0,06, respectively. Both, inhibition of phosphatases activity and phosphatase-treatment indicate that acidic variants are caused by phosphorylation of CapG. The most acidic variant of CapG represented by a single spot is phosphorylated at serine337, as revealed by mass spectrometry. It could be shown for the first time that CapG variants of the double-spots only vary in the amino acid at the position 335, an exchange from arginine to histidine due to a single-nucleotide polymorphism which has already been described in humans. Replacement of arginine results in a destruction of the consensus sequence for serine337-phosphorylation, explaining this single spot due to the exclusive phosphorylation of the CapG-arginine337 variant.

Comprehensive analyses by mass spectrometry failed to identify another phosphorylation site. By mutation analyses seven potential phosphorylation sites were excluded. Inhibition of serine337 phosphorylation (CapGMut337) revealed that this modification doesn't affect intracellular distribution of CapG-protein. However MDA-MB 231 cells expressing the

histidine- or CapGMut337-variants exhibit a lower invasive potential compared to MDA-MB 231 cells, homozygous for the arginine-variant.

Mass spectrometry analyses identified an N-terminal truncation of three or six amino acids and the formation of pyroglutamate of the most basic variants. In contrast to the other CapG-variants which show similar amounts of nuclear and cytoplasmic CapG, truncated variants were not detected in the nucleus indicating that N-terminus of CapG is involved in nuclear translocation.

Furthermore N-terminal truncation was not seen in phosphorylated variants of CapG supporting the idea that phosphorylation preventing N-terminal truncation contributes to the nuclear localisation of CapG.

The results of this study suggest that N-terminal truncation and the different phosphorylation of the CapG arginine- and histidine variants have an impact on nuclear translocation of the protein and the invasive potential of cells.

8. Literaturangaben

Abraham G. N. and Podell D. N. (1981) Pyroglutamic acid. Non-metabolic formation, function in proteins and peptides, and characteristics of the enzymes effecting its removal. *Mol Cell Biochem.* 38(1):181-190

Acevedo L., Yu J., Erdjument-Bromage H., Miao R. Q., Kim J. E., Fulton D., Tempst P., Strittmatter S. M. and Sessa W. C. (2004) A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nat Med.* 10(4):382-388

Arber S., Barbayannis F. A., Hanser H., Schneider C., Stanyon C. A., Bernard O. and Caroni P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 393(6687):805-809

Asch H. L., Winston J. S., Edge S. B., Stomper P. C. and Ash B. B. (1999) Down-regulation of Gelsolin expression in human breast ductal carcinoma in situ with and without invasion. *Breast Cancer Res.* 55(2):179-188

Belmont L. D., Orlova A., Drubin D. G. and Egelman E. H. (1999) A change in actin conformation associated with filament instability after Pi release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(1):29-34

Blombäck B., Blombäck M., Hessel B. and Iwanaga S. (1967) Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. *Nature.* 215(5109):1445-1448

Boisvert F. M., van Koningsbruggen S., Navascues J. and Lamond AI. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(7):574-585

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

Busby W. H. Jr., Quackenbush G. E., Humm J., Youngblood W. W. and Kizer J. S. (1987) An enzyme(s) that converts glutaminy-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. *J Biol Chem.* 262(18):8532-8536

Carlier M. F. (1991) Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem.* 266(1):1-4

Carlsson L., Nyström L. E., Sundkvist I., Markey F. and Lindberg U. (1977) Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol.* 115:465-483

- Chaponnier C., Janmey P. A. and Yin H. L. (1986) The actin filament-severing domain of plasma gelsolin. *J Cell Biol.* 103(4):1473-1481
- Chen H., Bernstin B. W. and Bamburg J. R. (2000) Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem Sci.* 25(1):19-23
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159
- Cunningham C. C, Stossel T. P and Kwiatkowski D. J. (1991) Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science.* 251(4998):1233-1236
- Dabiri G. A., Young C. L., Rosenbloom J. and Southwick F. S. (1992) Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. A unique member of the gelsolin/villin family expressed primarily in macrophages. *J Biol Chem.* 267(23):16545-16552
- Dahl E., Sadr-Nabavi A., Klopfacki E., Betz B., Grube S., Kreutzfeld R., Himmelfarb M., An H. X., Gelling S., Klamann I., Hinzmann B., Kristiansen G., Grützmann R., Kuner R., Petschke B., Rhiem K., Wiechen K., Sers C., Wiestler O., Schneider A., Höfler H., Nährig J., Dietel M., Schäfer R., Rosenthal A., Schmutzler R., Dürst M., Meindl A. and Niederacher D. (2005) Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *J Pathol.* 205(1):21-28
- De Corte V., Gettemans J. and Vandekerckhove J. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate specifically stimulates PP60(c-src) catalyzed phosphorylation of gelsolin and related actin-binding proteins. *FEBS.* 401(2-3):191-196
- De Corte V., Van Impe K., Bruyneel E., Boucherie C., Mareel M., Vandekerckhove J. and Gettemans J. (2004) Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *J Cell Sci.* 117(22):5283-5292
- Dockray G. J. (1987) The biosynthesis of regulatory peptides. *Am Rev Respir Dis.* 136(2):9-15
- Driessen H. P., de Jong W. W., Tesser G. I. and Bloemendal H. (1985) The mechanism of N-terminal acetylation of proteins. *CRC Crit Rev Biochem.* 18(4):281-325
- Egly J. M., Miyamoto N. G., Monocollin V. and Chambon P. (1984) Is actin a transcription initiation factor of RNA polymerase B? *EMBO J.* 3(10):2363-2371
- Fan Q. Y. and Lu Y. P. (1989) The study of giant cell tumors in bone. *Orthopedics.* 12(4):619-625
- Finnie C. and Svensson B. (2002) Proteolysis during the isoelectric focusing step of two-dimensional gel electrophoresis may be a common problem. *Anal Biochem.* 311(2): 182-186

- Fischer W. H. and Spiess J. (1987) Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84(11):3628-32
- Folger P. A., Berg W. J., DeJesus Z., Fong Y., Pardee J. D. (1999) A mammalian severin replaces gelsolin in transformed epithelial cells. *Cancer Res*. 59(20):5349-5355
- Fornerod M., Ohno M., Yoshida M. and Mattaj I. W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*. 90(6):1051-1060
- Freeman T. C., Lee K. and Richardson P. J. (1999) Analysis of gene expression in single cells. *Curr Opin Biotechnol*. 10(6): 579-582.
- Fujita H., Okada F., Hamada J., Hosokawa M., Moriuchi T., Koya R. C. and Kuzumaki N. (2001) Gelsolin functions as a metastasis suppressor in B16-BL6 mouse melanoma cells and requirement of the Carboxyl-Terminus for its effect. *Int J Cancer*. 93(6):773-780
- Gettemans J., Van Impe K., Delanote V., Hubert T., Vandekerckhove J. and De Corte V. (2005) Nuclear Actin-Binding Proteins as Modulators of Gene Transcription. *Traffic*. 6(10):847-857
- Giebing T., Hinssen H. and D'Haese J. (1994) The complete sequence of a 40-kDa actin-modulating protein from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Eur J Biochem*. 225(3):773-779
- Giesemann T., Rathke-Hartlieb S., Rothkegel M., Bartsch J. W., Buchmeier S. and Jockusch H. (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem*. 274(53):37908-37914
- Goldstein A. L., Slater F. D. and White A. (1966) Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci USA*. 56(3):1010-1017
- Heukeshoven J. and Dernick R. (1988) Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development. *Electrophoresis*. 9(1):60-61
- Holmes K. C., Popp D., Gebhard W. and Kabsch W. (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature*. 347(6288):44-49.
- Hubert T., Van Impe K., Vandekerckhove J. and Gettemans J. (2008) The F-actin filament capping protein CapG is a bone fide nucleolar protein. *Bioch Biophys Res Comm*. 377(2):699-704

- Janke J., Schlüter K., Jandrig B., Theile M., Kölbl K., Arnold W., Grinstein E., Schwartz A., Estevez-Schwarz L., Schlag P. M., Jockusch B. M. and Scherneck S. (2000) Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med.* 191(10):1675-1685
- Jensen O. N. (2006) Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(6):391-403
- Johnston P. A., Yu F. X., Reynolds G. A., Yin H. L., Moonmaw C. R., Slaughter C. A. and Sudhof T. C. (1990) Purification and expression of gCap39. An intracellular and secreted Ca²⁺(+)-dependent actin-binding protein enriched in mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 265(29):17946-17952
- Jörnvall H. (1975) Acetylation of Protein N-terminal amino groups structural observations on alpha-amino acetylated proteins. *J Theor Biol.* 55(1):1-12
- Kahari V. M. and Saarialho-Kere U. (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med.* 31(1):34-45
- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D. and Smith A. E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell.* 39(3):499-509
- Kamei A., Iwase H. and Masuda K. (1996) Cleavage of amino acid residue(s) from the N-terminal region of alpha A- and alpha B-crystallins in human crystalline lens during aging. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(2):373-378
- Kimura Y., Takaoka M., Tanaka S., Sassa H., Tanaka K., Plevoda B., Sherman F. and Hirano H. (2000) N(alpha)-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20 S proteasome. *J Biol Chem.* 275(7):4635-4639
- Kirschner M. W. (1980) Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo. *J Cell Biol.* 86(1):330-334
- Kobayashi T., Okada F., Fujii N., Tomita N., Ito S., Tazawa H., Aoyama T., Choi S. K., Shibata T., Fujita H. and Hosokawa M. (2002) Thymosin-beta4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells. *Am J Path.* 160(3):869-882
- Kwiatkowski D. J., Janmey P. A., Mole J. E. and Yin H. L. (1985) Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin. *J Biol Chem.* 260(28):15232-15238
- Kwiatkowski D. J., Stossel T. P., Orkin S. H., Mole J. E., Colten H. R. and Yin H. L. (1986) Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature.* 323(6087):455-458
- Lacroix M. and Leclercq G. (2004) Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 83(3):249-289

- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685
- Lal A., Lash A. E., Altschul F. S., Velculescu V., Zhang L., McLendon E. R., Marra A. M., Prange C., Morin J. P., Polyak K., Papadopoulos N., Vogelstein B., Kinzler W. K., Strausberg L. R., Riggins J. G. (1999) A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res*. 59(21):5403-5407
- Lane N. J. (1969) Intranuclear fibrillar bodies in actinomycin D-treated oocytes. *J Cell Biol*. 40(1):286-291
- Lanford R. E. and Butel J. S. (1984) Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell*. 37(3):801-813
- Lauffenburger D. and Horwitz A. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 84(3):359-69
- Lee H. K., Driscoll D., Asch H., Asch B. and Zhang P. J. (1999) Downregulated gelsolin expression in hyperplastic and neoplastic lesions of the prostate. *Prostate*. 40(1):14-19
- Li Q., Qi B., Oka K., Shimakage M., Yoshioka N., Inoue H., Hakura A., Kodama K., Stanbridge E. J. and Yutsudo M. (2001) Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. *Oncogene*. 20(30):3929-3936
- Lin X., Ruan X., Anderson M. G., McDowell J. A., Kroeger P. E., Fesik S. W. and Shen Y. (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res*. 33(14):4527-4535
- Livak F. and Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-408
- Lou Y. C., Huang Y. C., Pan Y. R., Chen C. and Liao Y. D. (2006) Roles of N-terminal pyroglutamate in maintaining structural integrity and pKa values of catalytic histidine residues in bullfrog ribonuclease 3. *J Mol Biol*. 355(3):409-421
- McDonald D., Carrero G., Andrin C., de Vries G. and Hendzel M. J. (2006) Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J Cell Biol*. 172(4):541-552
- McManus M. J., Lingle W. L., Salisbury J. L. and Maihle N. J. (1997) A transformation-associated complex involving tyrosine kinase signal adapter proteins and caldesmon links v-erbB signaling to actin stress fiber disassembly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(21):11351-11356
- MacRae T. H. (1997) Tubulin post-translational modifications-enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem*. 244(2):265-278

- Meyer T. and Hart I. R. (1998) Mechanisms of tumor metastasis. *Eur J Cancer*. 34(2):214-221
- Miao R. Q., Gao Y., Harrison K. D., Prendergast J., Acevedo L. M., Yu J., Hu F., Strittmatter S. M. and Sessa W. C. (2006) Identification of a receptor necessary for Nogo-B stimulated chemotaxis and morphogenesis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(29):10997-1002
- Miralles F. and Visa N. (2006) Actin in transcription regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 18(3):261-266
- Mitchison T. J. and Cramer L. P. (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*. 84(3):371-379
- Narod S. A., Sun P., Ghadirian P., Lynch H., Isaacs C., Garber J., Weber B., Karlan B., Fishman D., Rosen B., Tung N. and Neuhausen S. L. (2001) Tubal ligation and risk of ovarian cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations: a case-control study. *Lancet*. 357(9267):1467-1470
- Nebi G., Meuer S. C. and Samstag Y. (1996) Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J Biol Chem*. 271(42):26276-26280
- Nishida E., Lida K., Yonezawa N., Koyasu S., Yahara I. and Sakai H. (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84(15):5262-5266.
- Noske A., Denkert C., Schober H., Sers C., Zhumabayeva B., Weichert W., Dietel M. and Wiechen K. (2005) Loss of Gelsolin expression in human ovarian carcinomas. *Eur J Cancer*. 41(3):461-469
- Onoda K. and Yin H. L. (1993) gCap39 is phosphorylated. Stimulation by okadaic acid and preferential association with nuclei. *J Biol Chem*. 268(6):4106-4112
- Pantaloni D., Le Clairche C. and Carlier M. F. (2001) Mechanism of actin-based motility. *Science*. 292(5521):1502-1506
- Parkin D. M., Bray F., Ferlay J. and Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 55(2):74-108.
- Parthen K., Levan K., Osterberg L., Claesson I., Fallenius G., Sundfeldt K. and Horvath G. (2008) Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 123(9):2130-2137
- Paunola E., Mattila P. K. and Lappalainen P. (2002) WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett*. 20(1):92-97

- Paushkin S., Gubitza A. K., Massenet S. and Dreyfuss G. (2002) The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.* 14(3):305-312
- Persson B., Flinta C., von Heijne G. and Jörnvall H. (1985) Structures of N-terminally acetylated proteins. *Eur J Biochem.* 152(3):523-527
- Piek J. M. J., van Diest P. J. and Verheijen R. H. M. (2008) Ovarian Carcinogenesis: An Alternative Hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 622:79-87
- Pisani P., Parkin D. M., Bray F. and Ferlay J. (1999) Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer.* 83(1):18-29
- Pollard, T. D. and Cooper J. A. (1986) Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem.* 55:987-1035
- Pollard V. W., Michael W. M., Nakielnny S., Siomi M. C., Wang F. and Dreyfuss G. (1996) A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell.* 86(5):985-994
- Pollard T. D. and Earnshaw W. C. (2007) Cell Biology.
- Polevoda B. and Sherman F. (2000) N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Biol Chem.* 275(47):36479-36482
- Polevoda B., Norbeck J., Takakura H., Blomberg A. and Sherman F. (1999) Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 18(21):6155-6168
- Pope B., Way M. and Weeds A. G. (1991) Two of the three actin-binding domains of gelsolin bind to the same subdomain of actin. Implications of capping and severing mechanisms. *FEBS Lett.* 280(1):70-74
- Prendergast G. C. and Ziff E. B. (1991) Mch 1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization in vivo. *EMBO.* 10(4):757-766
- Radzicka A. and Wolfenden R. (1996) Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases. *J Am Chem Soc.* 118:6105-6109
- Rao J., Seligson D., Visapaa H., Horvath S., Eeva M., Michel K., Pantuck A., Beldegrun A. and Palotie A. (2002) Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers gelsolin and E-cadherin in urothelial carcinoma. *Cancer.* 95(6):1247-1257
- Renz M., Betz B., Niederacher D., Bender H. G. and Langowski J. (2007) Invasive breast cancer cells exhibit increased mobility of the actin-binding protein CapG. *Int J Cancer.* 122:1476-1482

- Ruegg J., Holsboer F., Turck C. and Rein T. (2004) Cofilin 1 is revealed as an inhibitor of glucocorticoid receptor by analysis of hormone-resistant cells. *Mol Cell Biol.* 24(21):9371-9382
- Rungger D., Rungger-Brandle E., Chaponnier C. and Gabbiani G. (1979) Intranuclear injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosomal condensation. *Nature.* 282(5736):320-321
- Saido T. C., Iwatsubo T., Mann D. M., Shimada H., Ihara Y. and Kawashima S. (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron.* 14(2):457-466
- Saiki I. (1997) Cell adhesion molecules and cancer metastasis. *Jpn J Pharmacol.* 75(3):215-242
- Saito T., Lamy F., Roger P. P., Lecocq R. and Dumont J. E. (1994) Characterization and identification as cofilin and destrin of two thyrotropin- and phorbol ester-regulated phosphoproteins in thyroid cells. *Exp Cell Res.* 212(1):49-61
- Samstag Y., Eckerskorn C., Wesselborg S., Henning S., Wallich R. and Meuer S. C. (1994) Costimulatory signals for human T-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(10):4494-4498
- Schafer D. A. and Cooper J. A. (1995) Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:497-518
- Scheer U., Hinssen H., Franke W. W. and Jockusch B. M. (1984) Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell.* 39(1):111-122
- Schmollich M. (2006) Das Mammakarzinom: Diagnostik und Therapie.
- Schweigreiter R., Stasyk T., Contarini I., Frauscher S., Oertle T., Klimaschewski L., Huber L. A. and Bandtlow C. E. (2007) *Proteomics.* 7(24):4457-4467
- Seo J. and Lee K. J. (2004) Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol.* 37(1):35-44
- Sepodi J., Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Pedroza E., Huang W. Y. and Schally A. V. (1978) Cyclic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone with significant biological activities. *J Med Chem.* 21(9):993-995
- Shieh D. B., Godleski J., Herndon J. E. 2nd, Azuma T., Mercer H., Sugarbaker D. J. and Kwiatkowski D. J. (1999) Cell motility as a prognostic factor in Stage I nonsmall cell lung carcinoma: the role of gelsolin expression. *Cancer.* 85(1):47-57.

- Smith S. S., Kelly K. H. and Jockusch B. M. (1979) Actin co-purifies with RNA polymerase II. *Biochem Biophys Res Commun.* 86(1):161-166
- Smyth D.G., Massey D. E., Zakarina S. and Finnie M. D. (1979) Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of alpha-N-acetyl peptides. *Nature.* 279(5710):252-254
- Southwick F. S. and DiNubile M. J. (1986) Rabbit alveolar macrophages contain a Ca²⁺-sensitive, 41,000-dalton protein which reversibly blocks the "barbed" ends of actin filaments but does not sever them. *J Biol Chem.* 261(30):14191-14195
- Sporn M. B. (1996) The war on cancer. *Lancet.* 347(9012):1377-1381.
- Stade K., Ford C. S., Gurthrie C. and Weis K. (1997) Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell.* 90(6):1041-1050
- Stossel T. P., Chaponnier C., Ezzell R. M., Hartwig J. H., Janmey P. A., Kwiatkowski D. J., Lind S. E., Smith D. B., Southwick F. S., Yin H. L. and Zaner K. S. (1985) Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol.* 1:353-402
- Suntharalingam M. and Wente S. R. (2003) Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell.* 4(6):775-789
- Tagami S., Eguchi Y., Kinoshita M., Takeda M. and Tsujimoto Y. (2000) A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene.* 19(50):5736-5746
- Tanaka M., Sazawa A., Shinohara N., Kobayashi Y., Fujioka Y., Koyanagi T. and Kuzumaki N. (1999) Gelsolin gene therapy by retrovirus producer cells or human bladder cancer in nude mice. *Cancer Gene Ther.* 6(5):482-487
- Thiede B, Lamer S, Mattow J, Siejak F, Dimmler C, Rudel T, Jungblut PR. (2000) Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 14(6):496-502
- Thompson CC, Ashcroft FJ, Patel S, Saraga G, Vimalachandran D, Prime W, Campbell F, Dodson A, Jenkins RE, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T, Yin HL, Costello E. (2008) Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family-capping proteins, which contribute to their cell motility. *Gut.* 56(1):95-106
- Ting H. J., Yeh S., Nishimura K. and Chang C. (2002) Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(2):661-666
- Tullberg K. F. and Burger M. M. (1985) Selection of B16 melanoma cells with increased metastatic potential and low intercellular cohesion using Nuclepore filters. *Invasion Metastasis.* 5(1):1-15.

- Vandekerckhove J., Bauw G., Vancompernelle K., Honore B. and Celis J. (1990) Comparative two-dimensional gel analysis and microsequencing identifies gelsolin as one of the most prominent downregulated markers of transformed human fibroblast and epithelial cells. *J Cell Biol.* 111(1):95-102
- Van Ginkel P. R., Gee R. L., Walker T. M., Hu D. N., Heizmann C. W. and Polans A. S. (1998) The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma. *Biochim Biophys Acta.* 1448(2):290-297
- Van Impe K., De Corte V., Eichinger L., Bruyneel E., Mareel M., Vandekerckhove J. and Gettemans J. (2003) The nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins. *J Biol Chem.* 278(20):17945-17953
- Van Impe K., Hubert T., De Corte V., Vanloo B., Boucherie C., Vandekerckhove J. and Gettemans J. (2008) A New Role for Nuclear Transport Factor 2 and Ran: Nuclear Import of CapG. *Traffic.* 9(5):695-707
- Wang Z., Danielsen A. J., Maihle N. J. and McManus M. J. (1999) Tyrosine phosphorylation of caldesmon is required for binding to the Shc.Grb2 complex. *J Biol Chem.* 274(47):33807-33813.
- Wanger M. and Wegner A. (1983) Similar affinities of ADP and ATP for G-actin at physiological salt concentrations. *FEBS Lett.* 1983 Oct 3;162(1):112-116.
- Way M., Gooch J., Pope B. and Weeds A. G. (1989) Expression of human plasma gelsolin in *Escherichia coli* and dissection of actin binding sites by segmental deletion mutagenesis. *J Cell Biol.* 109(2):593-605.
- Wegner A. (1976) Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol.* 108(1):139-150
- Weins A., Schwarz K., Faul C., Barisoni L., Linke W. A. and Mundel P. (2001) Differentiation- and stress-dependent nuclear cytoplasmic redistribution of myopodin, a novel actin-bundling protein. *J Cell Biol.* 155(3):393-404
- Wen W., Harootunian A. T., Adams S. R., Feramisco J., Tsien R. Y., Meinkoth J. L. and Taylor S. S. (1994) Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem.* 269(51):32214-32220
- Winston J. S., Asch H. L., Zhang P. J., Edge S. B., Hyland A., and Asch B. B. (2001) Downregulation of gelsolin correlates with the progression to breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 65(1):11-21.
- Wu X., Yoo Y., Okuhama N. N., Tucker P. W, Liu G. and Guan J. L. (2006) Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nat Cell Biol.* 8(7):756-763

- Yang X. J. (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene*. 24(10):1653-62.
- Ye J., Zhao J., Hoffmann-Rohrer U. and Grummt I. (2008) Nuclear Myosin I acts in concert with polymeric actin to drive RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 22(3):322-330
- Yoo Y., Wu X. and Guan J. L. (2007) A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *J Biol Chem*. 282(10):7616-7623
- Yu F. X., Johnston P. A., Sudhof T. C. and Yin H. L. (1990) gCap39, a calcium ion- and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein. *Science*. 250(4986):1413-1415
- Zhang S., Kohler C., Hemmerich P. and Grosse F. (2004) Nuclear DNA helicase II (RNA helicase II) binds to an F-actin containing shell that surrounds the nucleolus. *Exp Cell Res*. 293(2):248-258
- Zhang Y., Vorobiev M. S., Gibson G. B., Hao B., Sidhu S. G., Mishra S. V., Yarmola G. E., Bubb R. M., Almo C. S. and Southwick F. S. (2006) A CapG gain-of-function mutant reveals critical structural and functional determinants for actin filament severing. *EMBO*. 25:4458-4467
- Zhao K., Wang W., Rando O. J., Xue Y., Swiderek K., Kuo A. and Crabtree G.R. (1998) Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signalling. *Cell*. 95(5):625-636

8. Anhang

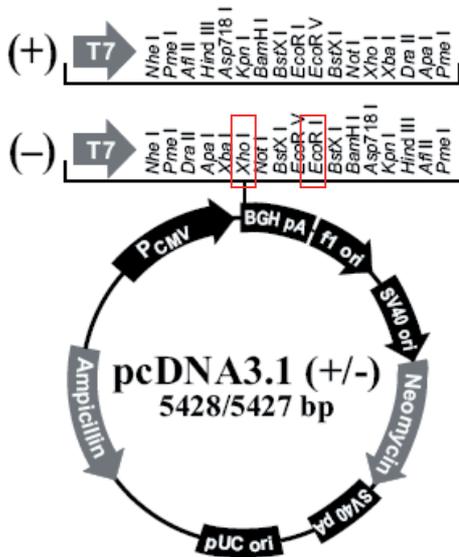
8.1. Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar ($\mu\text{mol/l}$)
A	Adenin
ABP	Actin-bindende Proteine
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	Androgen-Rezeptor
Arp2/3	Actin-related protein 2/3
AS	Aminosäuren (amino acids)
ATP	Adenosintriphosphat
BAF	Brg- or hBrm-associated factor
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
C_c	kritische Konzentration der Actinfilament-Enden
C	Cytosin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
D	Domäne Gelsolin
Da	Dalton
dATP	desoxyadenintriphosphat
dCTP	desoxycytosintriphosphat
dGTP	desoxyguanintriphosphat
dH_2O	destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
dHPLC	denaturing high performance liquid chromatography
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonulceic acid)
dNTPs	2'Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxythymintriphosphat

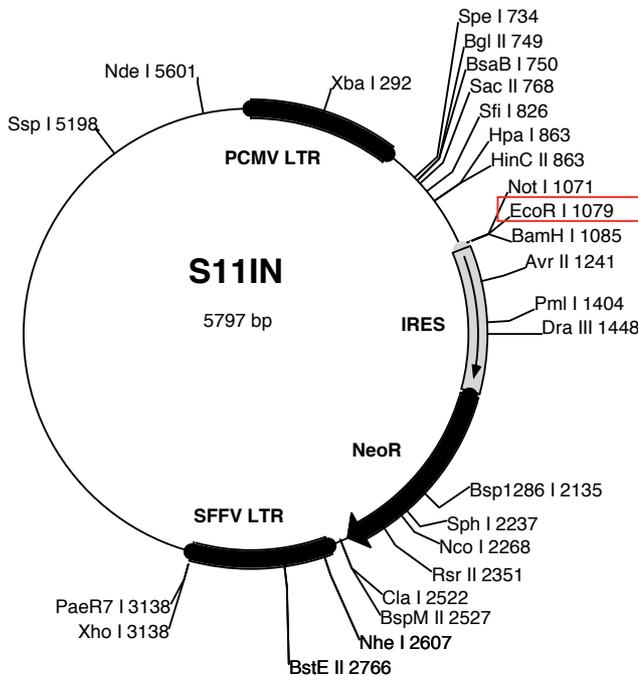
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
et al.	und andere
F-Actin	filamentöses Actin
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
G-Actin	globuläres Actin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
Hepes	(N-2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
kb	Kilo Basenpaare (kilo basepairs)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LTR	long terminal repeat
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MaCa	Mammakarzinom
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MTT	(3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5, diphenyl tetrazolium bromid
N-Terminus	Amino-Terminus
n	Anzahl
NES	nuclear export signal
ng	Nanogramm
NLS	nuclear localisation signal
nm	Nanometer
NPC	nuclear pore complex
N-WASP	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR/ Real-Time PCR
S	Domäne CapG
s, sec	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SMN	survival of motor neuron
SNP	single nucleotid polymorphism
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure
TEAA	Tetraethylamoniumacetat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming growth factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volt
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WH2	WASP-Homology 2
VASP	Vasodilator-stimulated Phosphoprotein
z.B.	zum Beispiel

8.2. Plasmidkarten



Als Ausgangsmaterial für die Klonierung lag die (codierende) CapG-Sequenz in dem Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) genannt pcDNA-CapG vor. Die codierende Sequenz wurde unter Verwendung von XhoI und EcoRI in das Plasmid kloniert.



Retroviraler Expressionsvektor S11-IN für die stabile Expression von CapG: Die CapG-Sequenzen wurden über die EcoRI-Schnittstelle in das Plasmid kloniert. Der Vektor wurde konstruiert von Kerstin Goettsche und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hanenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Immunologie der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

9. Danksagung

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. D' Haese richten, der mit wertvollen Ratschlägen und viel Geduld wesentlich bei der Erstellung dieser Arbeit mitgewirkt hat.

Herrn Prof. Dr. H. G. Bender und Herrn Prof. Dr. W. Janni danke ich für die Möglichkeit im molekulargenetischen Labor der Frauenklinik der Universitätsklinik Düsseldorf wissenschaftlich arbeiten zu dürfen. Herrn Prof. Dr. W. Janni möchte ich zudem für die Übernahme des Koreferats und für die Vertretung meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf herzlich danken.

Für die wertvollen Tipps, die stete Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn Dr. D. Niederacher.

Bei allen Mitgliedern der Jürgen Manchot Stiftung, besonders bei Herrn T. Manchot, möchte ich mich für die Unterstützung und das mir entgegen gebrachte Vertrauen bedanken.

Für das freundliche Arbeitsklima im MolGenLab bedanke ich mich bei allen Angehörigen der Arbeitsgruppe. Ellen Honisch, Nora Hinssen und Dagmar Hohmann danke ich hierbei besonders für die großartige Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre, welche in dieser Form nicht selbstverständlich sind.

Frau Dr. Beate Betz danke ich für die Unterstützung bei der Bearbeitung der Fragenstellungen aus dem molekulargenetischen Bereich.

Den Mitarbeitern des BMFZs, vor allem Nadine Dyballa, Dr. Werner Bouschen und Dr. Axel Kühlberg, danke ich für die stete Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Sabine Metzger für die massenspektrometrischen Analysen.

Prof. Dr. H. Hanenberg und Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung des retroviralen Expressionsvektors. Bei Constanze Wiek bedanke ich mich für die Hilfe bei der retroviralen Transfektion.

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank. Ein besonderer Dank gilt ebenfalls meinem Freund Alexander Budjin für die Geduld und Unterstützung während der letzten Jahre. Zudem geht ein Dank an meine ganze Familie und an meine Freunde, die ausnahmslos hinter mir gestanden haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich durch Ihre Hilfe enorm entlastet haben.

10. Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 28.04.2009

Nicole Seier