

Funktionelle Analyse der Protease Taspase1 und ihrem Zielprotein Myosin1F

Dissertation zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Lena Kunst

aus Bremerhaven

Februar 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Molekularbiologie II der Universität Duisburg Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Knauer

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2014

INHALT

Inhalt	i
Zusammenfassung	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Krebs.....	3
1.2 Karzinogenese	5
1.3 Leukämogenese.....	7
1.3.1 Chromosomale Translokationen als Ursache von Leukämien.....	8
1.4 Proteasen und Krebs	11
1.4.1 Die Threonin-Aspartase 1 (Taspase1)	12
1.4.2 Taspase1-Zielgene	15
1.5 Mixed lineage leukemia (MLL)	16
1.6 Myosin1F.....	17
1.1 Die Rolle von MLL, Taspase1 und Myosin1F in Tumor- und Leukämogenese.....	20
1.2 Zellmigration& Zytoskelett.....	20
1.3 Fokale Adhäsionen	21
1.4 Myosine	24
1.5 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material.....	27
2.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien	27
2.2 Geräte	27
2.3 Kits	28
2.4 Puffer und Lösungen.....	29
2.5 Antibiotika.....	29
2.6 Antikörper	29
2.7 Oligonukleotide	31
2.8 Vektoren	32
2.9 Bakterienstämme und Kulturbedingungen.....	34
2.10 Zelllinien	34
2.11 Software/ computergestützte Analysen	35
3 Methoden	36
3.1 Analytische Methoden.....	36
3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	36
3.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen.....	36
3.1.4 Bestimmung der Zellzahl von Eukaryotischen Zellen.....	37
3.1.5 Sequenzanalyse zur Verifizierung von Kolnierungsprodukten.....	37
3.1.6 Mikroskopie.....	37
3.2 Zellbiologische Methoden	39
3.2.1 Bakterienkultur.....	39
3.2.2 Zellkultur	41

3.3	Molekularbiologische Methoden	47
3.3.1	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
3.3.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	48
3.3.4	Restriktion von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten.....	48
3.3.5	Dephosphorylierung der 5'-Enden.....	49
3.3.6	Auffüllen der 5'-Enden mit der T4-Polymerase	49
3.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten	49
3.3.8	Oligoannealing.....	50
3.3.9	DNA-Isolierung aus adhärenen Zelllinien	50
3.3.10	RNA-Gele	51
3.3.11	cDNA-Synthese/ Reverse Transkription (RT-PCR).....	51
3.3.12	qPCR-Primerdesign und Primereffizienzbestimmung	52
3.3.13	quantitative-PCR (qPCR)	53
3.4	Biochemische Methoden / Proteine	54
3.4.1	Herstellung von Zellextrakten	54
3.4.2	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese)	55
3.4.3	Coomassiefärbung von SDS-Gelen	57
3.4.4	Westernblot/ Immunoblot.....	57
3.4.5	Immunodetektion von Wester-Blots mittels ECL-System.....	58
3.4.6	Immunodetektion von Wester-Blots mittels Odyssey-System.....	58
3.4.7	Entfernen von an Membranen gebundenen Antikörpern	58
3.4.8	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in E.coli	59
3.4.9	Aufreinigung von heterolog Exprimierten GST-Fusionsproteinen.....	59
3.4.10	Mikroinjektion.....	60
3.4.11	Immunpräzipitation (IP) von Proteinen zum Nachweis von Interaktionen.....	60
3.4.12	Cleavage assay	61
3.4.13	Taspase1-Biosensor Assay	62
3.4.14	Analyse der Zelladhäsion	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Funktionalität der im Myosin1F-Protein vorhandenen Taspase1-Schnittstelle.....	63
4.2	Etablierung und Evaluierung einer RT-PCR zur quantitativen Analyse der Genexpression von Myosin1F und Taspase1 in soliden Tumorzelllinien und Immunzellen	67
4.2.1	Primerdesign und Primereffizienzbestimmung	67
4.2.2	Überprüfung der RNA-Expression von Myosin1f und Taspase1	68
4.3	Untersuchung der Proteinexpression von Myosin1F und Taspase1	70
4.4	Untersuchung der Proteinexpression von Myosin1F und Taspase1 in Immunzellen.....	74
4.5	Analyse von Myosin1F mit GFP-markierten Expressionskonstrukten	75
4.6	Spaltung von Myosin1F durch Taspase1.....	79
4.6.1	Erstellung von Myc-Myosin1F-Konstrukten zur spezifischen Detektion des Myosin1F N-Terminus	81
4.6.2	Untersuchung der Spaltung von Myosin1F durch Taspase1	83
4.6.3	Spaltung von Myosin1F durch aktive Taspase1.....	86
4.6.4	Untersuchung der Spaltprodukte.....	87

4.7	Untersuchung möglicher Wechselwirkungen zwischen Myosin1F und Taspase1	91
4.8	Entwicklung und Etablierung einer Cleavage-IP	94
4.9	Untersuchung des Myosin1F hinsichtlich eines möglichen Kern-Export-Signals (NES)	96
4.9.1	Chemische Exportinhibition	97
4.9.2	Bioinformatische Analyse möglicher Lokalisationssignale	98
4.9.3	Proteinexpression und Mikroinjektion	99
4.10	Myosin1F-Lokalisation während Mitose und Zellteilung	100
4.11	Untersuchung der Myosin1F-Aktin-Interaktion.....	103
4.12	Interaktion von Myosin1F mit Paxillin.....	104
4.13	Interaktion von Myosin1F und Rac1	105
4.14	Interaktion von Myosin1F und Cdc42	107
4.15	Involvierung in zelluläre Signalwege.....	108
4.15.1	Involvierung des Myosin1F in Integrin-vermittelte Signalwege	108
4.15.1	Involvierung des Myosin1F in den EGF-Rezeptor-abhängige Signalweg.....	111
4.15.2	Involvierung des Myosin1F in den PI3-Akt-Signalweg	113
4.16	Die Lokalisation von Myosin1F in der Zelladhäsion.....	115
5	Diskussion	117
5.1	Expression von Taspase1 und Myosin1F in unterschiedlichen Zelltypen	117
5.2	Wechselwirkung zwischen Myosin1F und Taspase1	121
5.3	Nachweis der Myosin1F-Spaltung durch Taspase1	123
5.4	Untersuchung der Myosin1F-Spaltprodukte	128
5.5	Funktionsuntersuchungen von Myosin1F	132
5.5.1	Myosin1F in der Zellteilung.....	132
5.5.2	Die Funktion des Myosin1F in der Zelladhäsion	133
5.5.3	Involvierung des Myosin1F in die Ausbildung von Lamellipodien	134
5.5.4	Einfluss von Taspase auf die Ausbildung von Filopodien	136
5.5.5	Myosin1F in der Signaltransduktion	138
6	Anhang	145
6.1	Abkürzungsverzeichnis	145
6.2	Symbole für Aminosäuren.....	147
6.3	Abbildungsverzeichnis	148
6.4	Tabellenverzeichnis	150
6.5	qPCR-Daten-Primereffizienz.....	152
6.6	Plasmid-Karten.....	153
6.7	Ncbi Gen Accession Numbers der verwendeten Sequenzen.....	156
6.8	Posterpräsentationen	156
6.9	Veröffentlichungen	157
6.10	Vorträge.....	157
6.11	Danksagung	158
6.12	Eidesstattliche Erklärung.....	159
6.13	Lebenslauf.....	160
6.14	Literaturverzeichnis	161

ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung von Proteasen für die medizinische und pharmazeutische Forschung ist wegen deren Beteiligung an vielfältigen (patho)biologischen Vorgängen unumstritten. Ein prominentes Beispiel ist die Threonin Protease Taspase1, die aufgrund ihrer Beteiligung an der Entstehung und Progression von MLL-vermittelten Leukämien sowie der erhöhten Expression in soliden Tumoren biomedizinische Relevanz erlangte. Die detaillierten molekularen Mechanismen und Signalwege über die Taspase1 ihre (patho)biologische Wirkung ausübt, sind jedoch noch unverstanden. Erst kürzlich konnte Myosin1F als Substrat der Taspase1 identifiziert werden. Myosine werden als Aktin-abhängige Motorproteine beschrieben, denen vielfältige Funktionen wie z. B. in der Zellbewegung zukommen. Bei Myosin1F handelt es sich jedoch um ein nur unzureichend charakterisiertes Protein. Es gibt jedoch ebenso wie für Taspase1 erste Hinweise auf eine Relevanz bei der Krebsentstehung.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die (patho)biologische Bedeutung des Taspase1-Myosin1F-Zusammenspiels sowie die Funktion des Myosin1F-Proteins untersucht.

Um erste Informationen über die Genexpression zu erlangen, konnte erfolgreich eine qPCR-Methode für Taspase1 und Myosin1F etabliert werden. Diese bestätigte die erhöhte Taspase1-Expression in Tumorzelllinien und konnte ergänzend deutlich geringere Mengen Taspase1-mRNA in Immunzellen sowie die stark erhöhte Menge Taspase1-mRNA in adhären Zellen im Vergleich zu Suspensionszellen nachweisen. Der Vergleich der Myosin1F und Taspase1 mRNA-Mengen zeigte, dass die Taspase1-Expression weit über dem des Myosin1F liegt, jedoch in adhären Zellen mit der mRNA Expression von Myosin1F korreliert. In Immunzellen liegt hingegen ein gegenteiliger Trend vor. Folglich konnte die Genexpression von Myosin1F und Taspase1 als ein wichtiger Unterschied zwischen adhären und Suspensions-Tumorzellen identifiziert werden. Dies könnte sich auf Unterschiede im Migrationsverhalten der verschiedenen Zelltypen auswirken, da stark migrierende Zellen wie die des Immunsystems eine starke Migration jedoch kaum Adhäsion aufweisen.

Expressionsstudien in Interphasezellen zeigten, dass Myosin1F und die nicht durch Taspase1 spaltbare Variante in Zytosol, an der Membran sowie am Zytoskelett lokalisieren. Analog dazu sind beide Proteine während der Mitose an der Zellmembran und bei Trennung der Tochterzellen zwischen diesen zu finden. Die Mutation in der Taspase1-Schnittstelle im Myosin1F resultiert ebenso wie die Erhöhung der Taspase1-Menge in einer stärker ausgeprägten zytoplasmatischen Lokalisation von Myosin1F.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Spaltung des Volllänge-Myosin1F-Proteins durch Taspase1 nachgewiesen und Hinweise auf die physiologische Bedeutung der Taspase1-

Myosin1F-Wechselwirkung erarbeitet. Für diesen Nachweis wurde u.a. eine als „cleavage-IP“ bezeichnete Methode etabliert, die im Folgenden zur Analyse spezifischer Enzym-Substrat-Spaltungen herangezogen werden kann. Interessanterweise konnte mit dieser Methodik nicht nur die dosisabhängige Enzymaktivität gezeigt werden, sondern eine getrennte Expression der Taspase1 α - und β -Untereinheiten resultierte in einer höheren Hydrolyseaktivität als eine entsprechende Expression des Volllänge-Proteins. Dies weist auf eine limitierende Funktion der intramolekularen *cis*-Spaltung hin.

Weiterführend zeigte sich, dass das durch Spaltung entstehende C-terminale Myosin1F-Fragment stärker als das Volllängekonstrukt im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Das N-terminale Fragment akkumuliert dagegen im Zellkern. Untersuchungen des Spaltprodukts ergaben Hinweise auf ein schwaches, LMB-sensitives NES sowie die Interaktion der Spaltprodukte nach Spaltung des Myosin1F. Dies könnte den Transport des N-terminalen Fragments in den Zellkern regulieren, oder die Bildung eines Multiproteinkomplexes erlauben, wie es für das Taspase1-Substrat MLL bekannt ist.

Funktionsanalysen konnten die Funktion des Myosin1F-Proteins in migratorischen Prozessen adhärenter Tumor- und Nicht-Tumorzellen nachweisen. So verstärkte eine ektope Myosin1F-Expression die Substratadhäsion, welche durch Integrin-stimulierende Substanzen beeinflussbar ist. Myosin1F kolokalisiert dabei mit Integrin α und β sowie Rac1 und Cdc42 und interagiert mit Paxillin, Talin und Aktin. Da es sich bei diesen Proteinen um Marker der frühen fokalen Adhäsionen handelt, scheint Myosin1F dabei eine physiologische Funktion zu spielen. Die Kolokalisation mit Rac1 und Cdc42 deutet zudem auf eine Integrin-vermittelte Filopodienadhäsion zur Stabilisierung von Matrix-Adhäsionspunkten in den Lamellipodien hin. Weiterführend wurde die Beteiligung von Myosin1F an der PI3/Akt-Signalübertragung und die Interaktion mit Akt nachgewiesen sowie die EGF-abhängige Rekrutierung von Myosin1F an die Zellmembran aufgezeigt. Dabei wird die Ausbildung fokaler Adhäsionen scheinbar nicht direkt durch die Myosin1F-Menge in der Zelle beeinflusst, während hingegen die in der Zelle vorliegende Taspase1-Menge von Bedeutung für die Filopodienausbildung ist. Eine gesteigerte Zahl von Filopodien konnte bereits mit erhöhter Invasierung und damit einhergehend verstärkter Aggressivität und deutlich verminderter Überlebensrate in einer Vielzahl unterschiedlicher Krebserkrankungen in Verbindung gebracht werden. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Prozessierung von Myosin1F durch Taspase1 das Adhäsions- und das Migrationsverhalten von Zellen regulieren kann, was nicht nur bei Entwicklungsprozessen, sondern vor allem auch im Hinblick auf Metastasierung von Bedeutung ist. Die Daten weisen somit auf einen bis *dato* unbekanntem (Patho)Mechanismus hin, über den Taspase1 durch Spaltung von Myosin1F das Metastasierungspotenzial solider Tumore beeinflussen kann.

1 EINLEITUNG

1.1 KREBS

Als Krebs wird die bösartige Neubildung von körpereigenen Zellen bezeichnet. Krebs, Krebsgeschwulst, oder Malignom, sind medizinische Ausdrücke für die Bezeichnung maligner (bösartiger) Tumore. Genauer untergliedert man die soliden Tumore in maligne epitheliale Tumore (Karzinome) und maligne mesenchymale Tumore (Sarkome). Im weiteren Sinne werden auch bösartige Hämoblastosen, wie beispielsweise die Leukämie als sogenannter „Blutkrebs“ angegeben. Die Benennung der Neubildungen als Krebs tauchte das erste Mal im 2. Jh. n. Chr. im Hippokratium auf. Der griechische Arzt Hippokrates prägte diesen Namen, da die Auswüchse eines soliden Tumors an die Beine eines Krebses (griechisch: „karkinoma“) erinnerten¹. Europaweit stellen Krebserkrankungen laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) nach Krankheiten des Kreislauftsystems die zweithäufigste Todesursache dar². Jedes Jahr erkranken in Europa 3 Mio. Menschen an Krebs, deutschlandweit rund 490.000 Menschen, 221.000 von ihnen sterben jährlich daran.

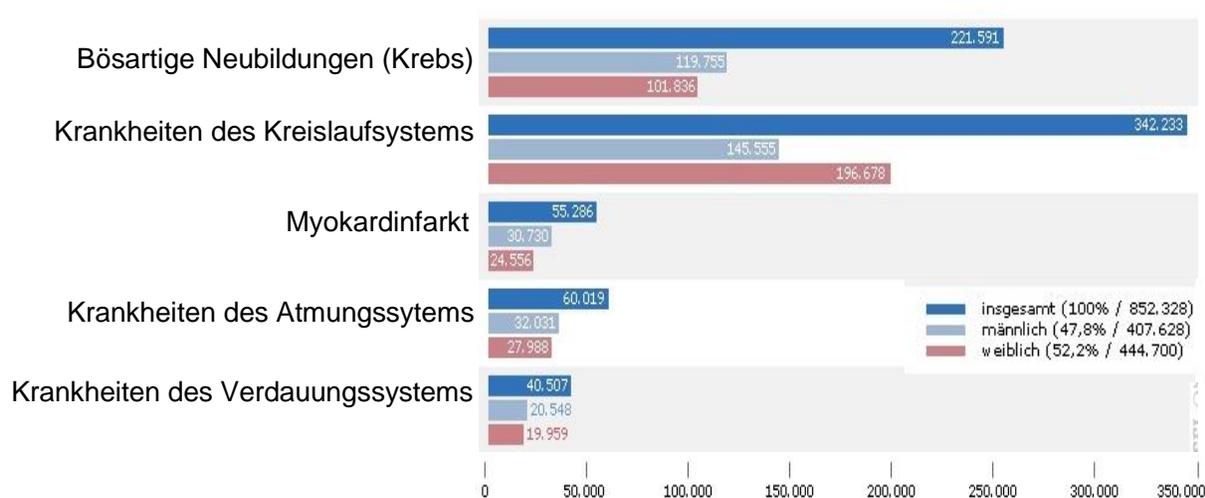


Abb. 1. Häufigste Todesursachen in Deutschland im Jahr 2011

Gezeigt sind die Todesfallzahlen im Jahr 2011 untergliedert nach Todesursachen in Deutschland. Krebs stellt nach Krankheiten des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache dar. Abbildung modifiziert nach der Statistik des Statistischen Bundesamtes (Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden).

¹ www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf

² <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>

Die Zahl der Neubildungen ist weiterhin steigend, nach Expertenschätzungen bis zum Jahr 2050 um 30 Prozent.

Als Grund wird das zunehmende Alter der Menschen vermutet, da die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken mit dem Alter zunimmt. Dabei kann prinzipiell jedes Organ von Krebs befallen werden. Bei Frauen stellt Brustkrebs (28 %) die häufigste Krebsart dar, während Prostatakrebs (20,9%) die häufigste Krebsart bei Männern ist (Ferlay *et al.* 2010). Die häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter sind Leukämien (Blutkrebs), Tumoren des Gehirns und des Rückenmarks sowie Lymphknotenkrebs³.

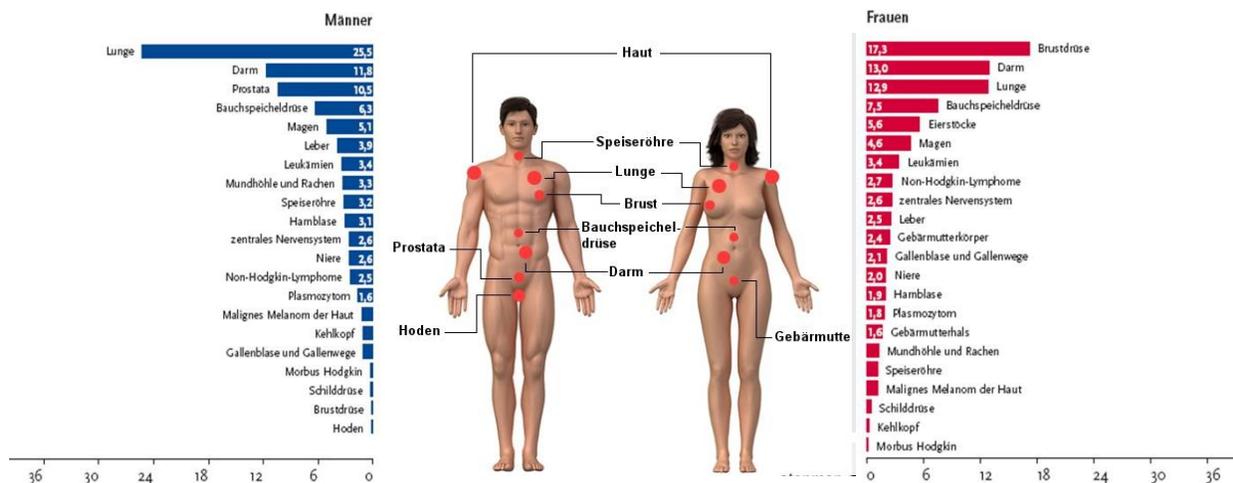


Abb. 2. Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Krebsfälle in Deutschland im Jahr 2008. Gezeigt ist eine prozentuale Auflistung der häufigsten Tumorlokalisationen im Jahre 2008. Während bei Männern die Lunge am häufigsten betroffen ist, ist bei Frauen am häufigsten die Brustdrüse infiziert. Modifiziert nach der amtlichen Todesursachenstatistik. (Quelle: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Foto: Thinkstock/ Montage T-Online.de)

Das Risiko, an Krebs zu erkranken, ist zu 5% durch eine erbliche Prädisposition bedingt³. In den betroffenen Familien tritt die Erkrankung bereits in jungen Jahren und in jeder Generation auf. Des Weiteren erhöhen Umweltfaktoren wie UV- und ionisierende Strahlung, chemische Agenzien wie Asbest oder Zigarettenrauch, chronische Infektionen, erhöhter Alkoholgenuss, eine ungesunde Lebensweise oder biologische Karzinogene wie

³ Deutsche Krebshilfe, Stand: 8/2013

z. B. onkogene Viren (z. B. Eppstein-Bar, oder das Humane Papillomavirus) das Risiko einer Krebserkrankung⁴ (American Cancer Society, 2011).

1.2 KARZINOGENESE

Im gesunden Organismus herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Vermehrung von Zellen (Zellproliferation) und Zelltod. Im Fall einer Krebserkrankung ist dieses Gleichgewicht in Richtung des Zellwachstums verschoben und es kommt zu der ungehinderten Proliferation der Krebszellen. Krebs entsteht folglich durch das unkontrollierte Wachstum entarteter Zellen.

Die Entwicklung von Krebs ist auf die Veränderung einzelner Zellen zurückzuführen. Die Veränderungen entstehen durch die schrittweise Akkumulation vieler genetischer und epigenetischer Aberrationen, welche unter anderem die Kapazität der Tumorzellen zur Proliferation erhöhen und gleichzeitig den programmierten Zelltod (Apoptose) unterdrücken (Hanahan und Weinberg 2000). Im Jahre 2000 beschrieben Hanahan und Weinberg zum ersten Mal sechs biologische Eigenschaften, die (nahezu) jeden Tumor charakterisieren (Hanahan und Weinberg 2000). 2011 wurde diese Auflistung aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse um weitere Eigenschaften ergänzt (Abb. 3).

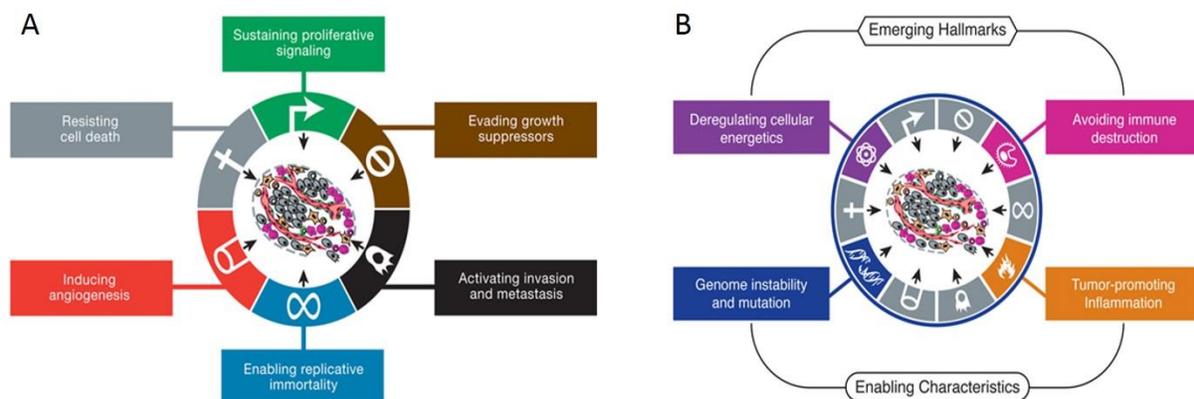


Abb. 3. Die „Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg. Gezeigt sind die ursprünglich im Jahr 2000 postulierte erworbenen Eigenschaften von Krebszellen von Hanahan und Weinberg (A) sowie die im Jahr 2011 hinzugefügten Eigenschaften (B). Weitere Erläuterungen siehe Text. (Quelle: Hanahan und Weinberg,2000/2011).

⁴ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, Abruf 29.07.2012

Als physiologische Veränderungen einer Krebszelle galten zunächst: die Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Vermeidung des programmierten Zelltods (Apoptose), die unlimitierte Fähigkeit zur Replikation (Immortalisierung), die ausreichende Tumorangiogenese (Versorgung mit Blutgefäßen) sowie Gewebeinvasion und Metastasierung von Tumorzellen. Des Weiteren wurden bis heute: die Umprogrammierung des zellulären Energiestoffwechsels zur Unterstützung von andauerndem Wachstum und Vermehrung, die Instabilität des Genoms sowie darin akkumulierte Mutationen, die Vermeidung der Zellzerstörung durch das Immunsystem und tumorfördernde Entzündungsreaktionen als Veränderungen einer Krebszelle anerkannt (Hanahan und Weinberg 2011).

Die Anhäufung dieser, durch Mutationen erworbenen Fähigkeiten erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, der als Tumorgenese bezeichnet wird. Grundlage für den Erwerb der Veränderungen sind die Instabilität des Genoms sowie tumorfördernde Entzündungsreaktionen (Hanahan und Weinberg 2011). Bereits im Jahre 2009 konnte gezeigt werden, dass Entzündungsreaktionen nahezu jeden Aspekt der Krebsentwicklung beeinflussen (Mantovani und Pierotti 2008). Die Veränderung des Genoms, die letztlich zu der Zellentartung führt, kann von Punktmutationen bis hin zu chromosomalen Translokationen reichen. Gene, die durch Mutationen zur Krebsentstehung beitragen, werden in drei Klassen unterteilt: Onkogene, Tumorsuppressorgene (TSG) und Stabilitätsgene oder „*caretaker*“. Eine besondere Rolle wird dabei der Mutation der sogenannten Krebsgenen, also (Proto-)Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, beigemessen. Als Onkogene werden Proteine bezeichnet, die durch eine Mutation in dem für sie codierenden Gen konstitutiv aktiv werden (*gain-of-funktion*). Die Aktivierung erfolgt in den meisten Fällen durch chromosomale Translokationen oder Genamplifikationen. Mutationen in TSG führen zu reduzierter oder fehlender Aktivität der Proteine (*loss-of-funktion*). Derartige Aktivierungen sind in den meisten Fällen auf *Missense*-Mutationen, Deletionen, oder Insertionen in Bereichen mit essenzieller Proteinaktivität oder epigenetische Stilllegung einzelner chromosomaler Abschnitte zurückzuführen. Stabilitätsgene codieren für DNA-Reparaturproteine und reduzieren genetische Veränderungen auf ein Minimum, sodass die Inaktivierung dieser Proteine eine Akkumulation von Mutationen in anderen Genen begünstigt. Dies fördert indirekt das Tumorwachstum (Vogelstein und Kinzler 2004). Am

häufigsten von genetischen Veränderungen betroffen sind Wachstumsfaktoren oder Regulatoren des Zellzyklus und der Signaltransduktion (Futreal *et al.* 2004).

Darüber hinaus spielt insbesondere das Umfeld des Tumors, die sogenannte Tumormikroumgebung, eine entscheidende Funktion in der Krebsentwicklung spielt. 2011 postulierten Hanahan und Weinberg, dass ein Tumor nicht nur als Masse von Krebszellen gesehen werden kann, sondern in seiner Komplexität mit normalem Gewebe verglichen werden muss. Daraufhin wurde eine Vielzahl von Zelltypen wie z. B. Tumor-assoziierte Fibroblasten, Perizyten, endotheliale Zellen, Immunzellen, invasive Krebszellen und Krebsstammzellen als zu einem soliden Tumor zugehörig beschrieben (Hanahan und Weinberg 2011).

1.3 LEUKÄMOGENESE

Neben soliden Tumoren im menschlichen Gewebe gibt es maligne Erkrankungen des Knochenmarks und des blutbildenden Systems, die als Hämoblastosen bezeichnet werden. Dazu zählen z. B. Leukämien oder im weiteren Sinne maligne Lymphome, das Lymphosarkom, die Lymphogranulomatose und das Plasmozytom. Beschrieben wurden diese bösartigen Neubildungen erstmals 1845 von Rudolf Virchow. Die Begriffsbildung ist auf die griechischen Wörter "leukos" für "weiß" und "haima" für "Blut" zurückzuführen. Allein deutschlandweit erkranken jährlich 10.000 Menschen an Leukämie. Mit 37% sind Leukämien die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Die häufigste Einzeldiagnose ist mit 28% die akute lymphatische Leukämie (ALL), die bei unter 4 jährigen mehr als doppelt so häufig vorkommt wie in anderen Altersgruppen⁵.

Leukämie bezeichnet die ungehemmte Vermehrung pathologisch veränderter, bzw. nicht normal differenzierter Leukozyten im Knochenmark und im Blut. Durch die Ansammlung unreifer und nicht funktionsfähiger Leukozyten im Knochenmark kommt es zur Verminderung anderer Blutbestandteile wie Erythrozyten oder Thrombozyten. Zudem können die malignen Zellen durch die Infiltration verschiedener Organe wie z. B. Leber, Milz und Lymphknoten deren Funktion beeinträchtigen.

⁵http://www.rki.de/clin_160/nn_199884/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2010.pdf

Leukämien werden abhängig vom Ursprung der Zellpopulation in myeloische und lymphatische Leukämien unterteilt. Eine weitere Klassifizierung in akute und chronische Leukämien erfolgt in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf. Die spezifische Klassifizierung der akuten Leukämien in weitere Untergruppen erfolgt entsprechend der morphologischen Merkmale nach einem Schema der *French-American-British Working Group for Leukemia Classification* (FAB). Dieses untergliedert die AML in acht Gruppen die als M₀-M₇ bezeichnet werden. Die ALL wird in drei Subtypen unterschieden, die die Bezeichnung L₀-L₃ tragen (Tab. 1).

Tab. 1. Untergliederung der Leukämien

Akute Leukämien	Chronische Leukämien
Akute myeloische Leukämien (AML): M ₀ -M ₇	Chronische myeloische Leukämie (CML)
Akute lymphatische Leukämien (ALL): L ₁ -L ₃	Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

1.3.1 CHROMOSOMALE TRANSLOKATIONEN ALS URSACHE VON LEUKÄMIEN

In den meisten Fällen sind chromosomale Translokationen der Auslöser für die Ausbildung menschlicher Leukämien und Lymphome. Die Translokationen treten zumeist in hämatopoetischen Stammzellen auf und sind eng mit den klinischen und pathologischen Wesensformen der Erkrankung verknüpft. Die Art der Translokation ist von großer prognostischer Bedeutung, da der Translokationstyp entscheidend für die Krankheitsprognose und die Bestimmung des Behandlungsprotokolls des Patienten ist (Grimwade *et al.* 1998).

Die Bestimmung der vorliegenden chromosomalen Translokation erfolgt heutzutage durch LDI-PCR (*long Distance Inverse PCR*) (Meyer *et al.* 2005). Die LDI-PCR stellt aktuell die sensitivste Analysemethode dar und erlaubt die zuverlässige und schnelle Bestimmung der involvierten Gene. Dies ermöglicht eine umgehende Entscheidung bezüglich der anzuwendenden Therapie sowie die Verfolgung des anschließenden Therapieverlaufs auf molekularer Ebene. Für die Analyse werden patientenspezifische Sonden verwendet, die eine quantitative Aussage über die im Körper befindlichen Tumorzellen ermöglichen (Meyer *et al.* 2005).

Bei akuten Leukämien treten in den meisten Fällen sogenannte reziproke Translokationen (lat.: *reciprocus*: wechselseitig, gegenseitig) auf. Dabei kommt es zu einem Stückaustausch zwischen nicht-homologen Chromosomen, wodurch ein Chromosom oder ein Chromosomenabschnitt auf ein anderes Chromosom transloziert wird. Die Gesamtmenge des Erbguts wird dabei nicht verändert. Infolge dessen spricht man von balancierten Translokationen. Bei unbalancierten Translokationen liegt hingegen die quantitative Veränderung des Erbguts vor. Der Verlust von genetischem Material kann durch Deletionen verursacht sein, während Duplikationen zu zusätzlich vorhandenen Genen führen (Pedersen-Bjergaard und Rowley 1994).

Reziproke Translokationen werden in zwei Formen unterschieden. Im ersten Fall sind Gene des Immunsystems betroffen, im zweiten (und häufigsten) Fall kommt es zur Bildung eines chimären Fusionsgens. Die Involvierung von Genen des Immunsystems resultiert meist aus der fehlerhaften Rekombination von Genen der T-Zellrezeptoren und/oder Immunglobulinen (Sanchez-Garcia und Rabbitts 1993). In Folge der Rekombination können zelluläre Proto-Onkogene unter den Einfluss eines starken immunzellenspezifischen Enhancers gebracht werden, was zu der Deregulation ihrer Expression führt. Die prominenteste Translokation einer chromosomalen Deregulation ist die Translokation t(8;14) (q24;q32) bei Burkitt-Lymphomen (Dalla-Favera *et al.* 1982, Taub *et al.* 1982). Bei dieser Translokation kommt es zu einer Verlagerung des Proto-Onkogens *c-myc* in den aktiven *IgH*-Locus von B-Zellen. Durch den starken Enhancer des *IgH*-Gens kommt es zu der übermäßigen Expression des c-Myc Proteins und zur Transformation der Zelle.

Die Bildung von chimären Fusionsgenen entsteht durch chromosomale Brüche in den intronischen Bereichen der beteiligten Gene. Eine der wohl bekanntesten Translokationen ist die Translokation t(9;22)(q34;q11) bei CML, die zur Bildung des sogenannten Philadelphiachromosoms führt. Durch die Translokation werden die N- bzw. C-terminalen Exons der Gene *bcr* und *abl* reziprok miteinander verknüpft und es entstehen die chimären Fusionsprodukte BCR•ABL und ABL•BCR. Die folgende Expression der kleinen Fusionsproteine führt zur Entartung der Zelle.

Ein Großteil der in Translokationen involvierten Gene konnte mittlerweile beschrieben und erforscht werden. Oft codieren sie für Faktoren, die für die Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Zellen von Bedeutung sind (Rabbitts 1999). Besonders häufig ist das MLL-Gen auf der Bande q23 von Chromosom 11 in reziproke

chromosomale Translokationen involviert. Krankheitsformen mit Involvierung des MLL werden aufgrund der sehr schlechten Prognose und Therapierbarkeit als Hochrisiko-Leukämien eingestuft. Sie sind in 10% aller menschlichen Leukämien zu finden (Huret *et al.* 2001) aber in über 70% der Fälle bei Kleinkindern mit ALL oder AML (Reichel *et al.* 2001). Bis heute wurden 64 Translokationspartnergene inklusive der genauen Bruchpunktregion identifiziert. Nur 6 der identifizierten Partnergene sind dabei in 85% der MLL-Translokationen involviert (Abb. 4). Das AF4-Gen stellt dabei mit 42% bei allen untersuchten Leukämien und ca. 60% bei ALL das am häufigsten involvierte Partnergen dar.

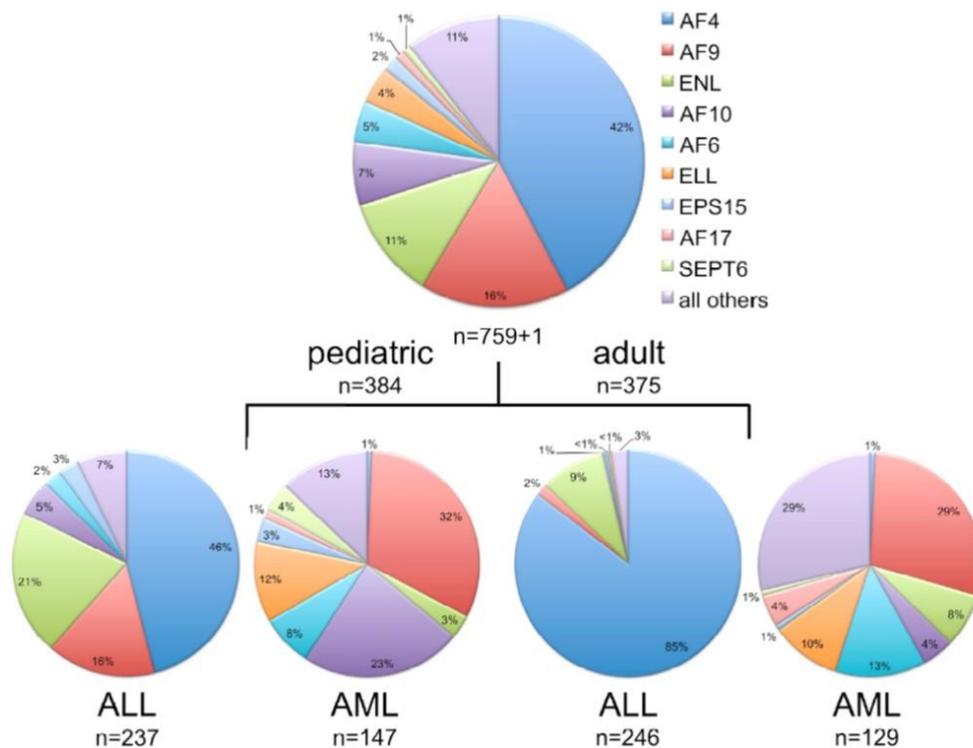


Abb. 4. Verteilung von verschiedenen Translokationspartnergenen des MLL bei Kindern und Erwachsenen mit ALL und AML. N gibt die Anzahl der Patienten an. Das AF4-Gen stellt dabei mit 42% bei allen untersuchten Leukämien und ca. 60% bei ALL das am häufigsten involvierte Partnergen dar. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Quelle: Meyer *et al.*, 2009, <http://web.uni-frankfurt.de/fb14/dcal/SupplFigure1.pdf>)

1.4 PROTEASEN UND KREBS

Die Enzymklasse der Proteasen spielt eine fundamentale Rolle in vielen biologischen Prozessen. Zudem sind sie mit einer großen Zahl pathologischer Zustände assoziiert, zu denen u.a. Krebs zählt (Overall und Lopez-Otin 2002, Lopez-Otin und Matrisian 2007). Insgesamt umfasst das humane Degradom 569 Proteasen und deren Homologe. Die Untergliederung erfolgt in die fünf Gruppen: Metalloproteasen (194, MMPs), Serinproteasen (176), Cysteinproteasen (150), Threoninproteasen (28) und Aspartatproteasen (21) (Puente *et al.* 2003) (Abb. 5 A).

Bei Proteasen handelt es sich um hoch spezifische Enzyme mit zentralen Aufgaben in allen biologischen Vorgängen. So kommt einer Gruppe von Proteasen mit dem Abbau beschädigter oder fehlerhafter Proteine eine wichtige „housecleaning“ Funktion zu. Eine andere Gruppe wiederum besitzt durch Aktivierung oder Inaktivierung von Signalmolekülen bedeutende regulatorische Funktion. Proteasen sind somit essenziell für viele komplexe Vorgänge im menschlichen Körper wie z. B. Zellwachstum, Apoptose, Zellmetabolismus, Zellmigration oder der Blutgerinnung (Turk 2006).

Dies macht deutlich, wie wichtig die präzise Regulation der Enzyme ist. Die Fehlregulation kann zur Entstehung verschiedener Krankheiten, wie z. B. Krebs führen (Lopez-Otin und Bond 2008). Aufgrund dieser wichtigen Funktion in der Pathogenese vieler Erkrankungen stellen Proteasen heutzutage eine der wichtigsten Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente dar (Lopez-Otin und Overall 2002).

Proteasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen. Dieser Mechanismus wird als Proteolyse bezeichnet. Die Position der Schnittstelle des Substrats wird als P1- (N-terminal) und P1'-Position (C-Terminal) bezeichnet. Die Substratbindetasche der Protease wird entsprechend als S- bzw. S'-Position bezeichnet (Abramowicz *et al.* 1967).

Abhängig von der Lokalisation der Schnittstelle werden Proteasen in Endopeptidasen (Schnittstelle innerhalb des Proteins) und Exopeptidasen (Schnittstelle am N- oder C-Terminus) unterschieden (Clausen *et al.* 2011).

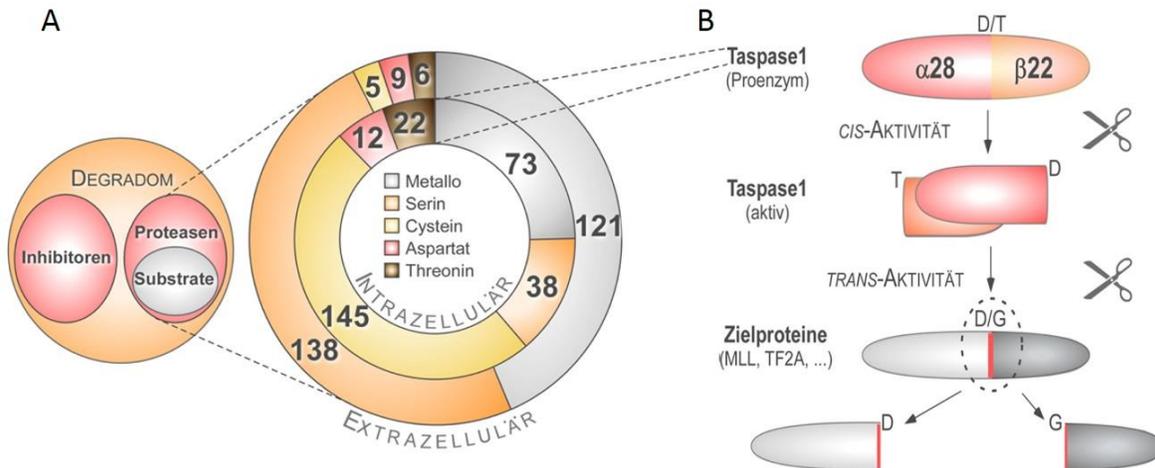


Abb. 5. Klassifizierung und Autoproteolyse der Taspase1 A) Das humane Degradom umfasst 569 Proteasen und deren Homologe. Die Untergliederung erfolgt in fünf Gruppen: Metalloproteasen (194, MMPs), Serinproteasen (176), Cysteinproteasen (150), Threoninproteasen (28) und Aspartatproteasen (21) B) Die autokatalytische Spaltung des inaktiven Enzyms zwischen den Aminosäuren Asp233 und Thr234 führt zur Bildung der 29 kDa großen α - und der 33 kDa großen β - Untereinheit. Das Threonin234 wird dabei zum N-terminalen Nukleophil der β -Untereinheit. Nach Assemblierung der Untereinheiten ist das gebildete Heterodimer in der Lage Zielproteine zu hydrolysieren. Neuere Studien konnten belegen, dass Taspase1 vorwiegend als α/β -Monomer in Zellen vorliegt und bereits in dieser Form aktiv ist. Des Weiteren scheint eine forcierte Dimerisierung die proteolytische Aktivität von Taspase1 zu inhibieren.

1.4.1 DIE THREONIN-ASPARTASE 1 (TASPASE1)

Die Rolle von Proteasen in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung konnte in den letzten Jahren aufgrund ihrer vielfältigen Involvement in nahezu alle biologischen Vorgänge, wie z. B. Apoptose, Signalweiterleitung, Interaktionen von Proteinen und der Regulation von Lokalisation (Lopez-Otin und Overall 2002, Turk 2006) an Bedeutung gewinnen. Als prominentes Beispiel gilt die Taspase1, die ihre biomedizinische Relevanz 2003 erlangte als ihre Prozessierung des MLL nachgewiesen wurde (Hsieh *et al.* 2003). Mittlerweile ist die Taspase1 aufgrund ihrer Beteiligung an der Entstehung und Progression von MLL-vermittelten Leukämien (Bursen *et al.* 2004) sowie durch die erhöhte Expression in soliden Tumoren (Chen *et al.* 2010) von hoher medizinischer Relevanz. C. Bier konnte zeigen, dass Taspase1 in Tumorproben verschiedenster Entitäten im Vergleich zu dem zugehörigen Normalgewebe erhöht exprimiert ist. Zudem wurde die erhöhte Taspase1-Expression in Tumoren, aber auch Metastasen dieser Tumorentität gezeigt (C. Bier, 2010).

Der Name Taspase1 ergibt sich aus ihrer Enzymfunktion als Threonin-Aspartase. Die Klassifizierung ist durch ein Threonin an Stelle 234 gegeben, das als katalytisches Nukleophil im katalytischen Zentrum des aktiven Enzyms fungiert und die Hydrolyse von Proteinen nach einem Aspartat katalysiert.

Aufgrund ihrer Asparaginase-2-Homologiedomäne und der Spaltung von Polypeptidsubstraten mit einem Aspartat-Rest an der P1-Position ist die Taspase1 der Familie der Typ2-Asparainasen zugeordnet (Hsieh *et al.* 2003). Die 3D-Struktur der Taspase1 zeigt jedoch besonders im Bereich des aktiven Zentrums deutliche Unterschiede zu anderen Typ2-Asparaginase (Khan *et al.* 2005). Dies könnte eine Erklärung bieten, warum die Taspase1 im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Familie die einzige Protease ist, die sich selber (*cis*-Aktivität) sowie andere Zielproteine (*trans*-Aktivität) spalten kann (Hsieh *et al.* 2003)

Des Weiteren wird die Taspase1 in die Gruppe der Ntn- (N-terminale Nukleophil) Hydrolasen (Brannigan *et al.* 1995) eingeordnet. In der MEROPS-Datenbank ist sie unter der Bezeichnung T02.004 zu finden und als Klasse: PB, Subklasse: PB(T) und Familie: T2 Protease klassifiziert⁶.

Die menschliche Taspase1 ist auf der Bande p12.1 von Chromosom 20 lokalisiert. Das entsprechende Gen umfasst 550 kb und codiert für das 420 Aminosäuren lange und 50 kDa große Taspase1-Proenzym (Hsieh *et al.* 2003). Die autokatalytische Spaltung des inaktiven Enzyms zwischen den Aminosäuren Asp233 und Thr234 führt zur Bildung der 29 kDa großen α - und der 33 kDa großen β -Untereinheit (Oinonen und Rouvinen 2000). Das Threonin234 wird dabei zum N-terminalen Nukleophil der β -Untereinheit (Hsieh *et al.* 2003). Die wichtigsten lokalen Konformationsänderungen zwischen dem inaktiven Proenzym und dem prozessierten aktiven Enzym betreffen das Thr234 (Khan *et al.* 2005). So unterbindet eine Mutation an Stelle 234 die autokatalytische Prozessierung des Enzyms in *cis* (Hsieh *et al.* 2003). Die *trans*-Aktivität wird hingegen nicht zwangsläufig beeinflusst. Die Mutante Thr234Val besitzt jedoch weder *cis*- noch *trans*-Aktivität.

Zunächst wurde die Assemblierung der beiden α/β -Untereinheiten zu einem Heterodimer postuliert, was zur Bildung der aktiven Taspase1 führt. So wurde das Proenzym als Dimer zweier Monomere und die prozessierte Form als Dimer der beiden Untereinheiten

⁶ <http://merops.sanger.ac.uk>

postuliert. Neuere Studien konnten hingegen belegen, dass Taspase1 vorwiegend als α/β -Monomer in Zellen vorliegt und bereits in dieser Form aktiv ist. Des Weiteren scheint die forcierte Dimerisierung die proteolytische Aktivität von Taspase1 zu inhibieren (Bier *et al.* 2012, Bier *et al.* 2012).

Taspase1 ist vorwiegend an den Nukleoli im Kern lokalisiert. Dies ist durch das zweigeteilte Kernimportsignal (nukleäres Lokalisationssignal, NLS) in der Taspase1-Sequenz bedingt. Der Kernimport wird durch die Interaktion von Taspase1 mit Importin- α vermittelt und ist die Grundlage für die Aktivität von Taspase1 (Bier, 2011). Ein Kernexportsignal (nukleäres Exportsignal, NES) besitzt die Taspase1 nicht. Die nukleäre Lokalisation sowie der Kernexport werden durch die Interaktion mit Nucleophosmin (NPM1) vermittelt. NPM1 ist ein nukleäres Chaperon, das zwischen Kern und Zytoplasma hin und her wandern kann (Grisendi *et al.* 2006), wodurch es der Taspase1 den transienten Zugang zu zytoplasmatischen Substraten ermöglicht (Bier *et al.* 2011).

Eine Überexpression von Taspase1 konnte in vielen soliden Tumoren, Krebszelllinien und Patientenproben nachgewiesen werden. Des Weiteren sind Taspase1^{-/-}-Zellen onkogener Transformation gegenüber deutlich resistenter. Aus diesem Grund wird die Taspase1 als wichtiges therapeutisches Ziel in der Krebstherapie angesehen (Takeda *et al.* 2006). Taspase1 ist jedoch weder allein noch in Verbindung mit den Onkogenen MYC, RAS oder E1A, zu einer malignen Transformation der Zellen in der Lage (Chen *et al.* 2010). Für die Aufrechterhaltung des Tumors spielt Taspase1 hingegen eine wichtige Rolle und wird daher als „non-oncogene addiction“ Protease klassifiziert (Chen *et al.* 2010). Abhängig vom Zelltyp führt die Taspase1-Defizienz zur Hemmung der Proliferation bzw. der erhöhten Degradation des antiapoptotischen Proteins MCL-1. Dies hat die erhöhte Anfälligkeit der Zelle gegenüber Todesstimuli zur Folge (Chen *et al.* 2010).

Die Deregulation homöotischer Gene als direkte Folge des Ausschaltens von Taspase1 führte in *in vivo* Untersuchungen an *Knockout*-Mäuseembryonen zu einer phänotypisch transformierten Wirbelsäule (Takeda *et al.* 2006). Desweiteren kam es zu einer deutlichen Minderung des Größenwachstums. Folglich kommt Taspase1 neben ihrer Funktion in der korrekten Embryonalentwicklung eine indirekte Rolle in der Regulation des Zellzyklus zu. Aufgrund der vielfältigen Auswirkungen eines Taspase1-*Knockouts* auf die Embryonalentwicklung und den Zellzyklus wurde bereits 2006 vermutet, dass es weitere Taspase1-Substrate gibt, deren Funktionen über ihre Proteolyse reguliert werden

(Takeda *et al.* 2006). 2011 gelang schließlich die Identifizierung der exakten Taspase1-Erkennungssequenz (Q3[F/I/L/V]2D1↓G1'X2'D3'D4'), wodurch es erstmals möglich war, mit Hilfe bioinformatischer Analysen weitere Taspase1-Substrate zu identifizieren (Bier *et al.* 2011, Knauer *et al.* 2011).

1.4.2 TASPASE1-ZIELGENE

Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnten insgesamt 27 potenzielle Taspase1 Zielproteine identifiziert werden (Bier *et al.* 2011, Knauer *et al.* 2011). Diese sind nukleärer, zytoplasmatischer sowie membranassoziierter lokalisiert. Ein Teil der Substrate konnte bereits erfolgreich experimentell verifiziert werden. Neben den bereits bekannten Substraten MLL1 und dem generellen Transkriptionsfaktor 2A (TFIIA) wurden unter anderen wurden das verwandte MLL4-Protein, der Transkriptionsfaktor USF2 (Upstream Stimulatory Factor 2) sowie das unkonventionelle Myosin1F als mögliche Taspase1-Zielgene identifiziert (Bier *et al.* 2011).

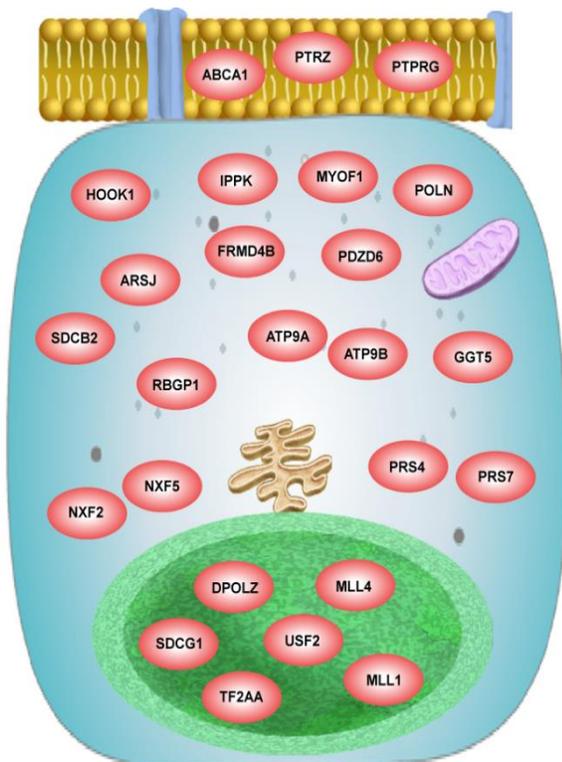


Abb. 6 Lokalisation der potenziellen Taspase1 Zielgene in der Zelle. Unter den 27 potenziellen Zielproteinen der Taspase1 befinden sich Proteine mit nukleärer, zytoplasmatischer sowie membranassoziierter Lokalisation. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Quelle: Dissertation C. Bier)

Tab. 2. Gen-Lokus, Name und Sequenz der Taspase1-Schnittstelle sowie die biologische Funktion der Taspase1-Zielgene MLL1, TFIIA, MLL und MYO1F. Weitere Erläuterung siehe Text

Gen-Lokus	Gen-Name	Sequenz	GO: biologische Prozesse Beschreibung
MLL1	Myeloid/ Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia	SAEG QVDGADD	Zelltod, Transkription, Entwicklungs- prozesse Modifikation von Zell- Komponenten
		LSTS PKIS QLDGVDD	
TF2A	General Transcription Factor IIA	GTES GEII QVDGSGD	Transkription, Transkriptionsregulation Transkriptionsinitiation
		TSSN	
MLL4	Myeloid/ Lymphoid Or Mixed-Lineage Leukemia 2 Protein	PRIE QLDGVDD	Transkription, Modifikation von ZellKomponenten, Zelluläre Prozesse
		GTDS	
MYO1F	Myosin1F	PRIE QLDGVDD	unbekannt
		GTDS	

1.5 MIXED LINEAGE LEUKEMIA (MLL)

Eines der wichtigsten Taspase1-Substrate ist das MLL-Protein (mixed lineage leukemia). MLL übt seine Funktion in erster Linie im Zellkern aus und wird dort hauptsächlich für die Regulation der Hox-Genexpression benötigt, wodurch es u.a. die Segmentierung in der Embryonalentwicklung kontrolliert (Hsieh *et al.* 2003). Des Weiteren methyliert MLL (durch seine Histonmethyltransferase-Aktivität) das Histon H3 an dessen Lysin 4 (K4) (Chang *et al.* 2010). Zudem wird es als Teil des epigenetischen Systems angesehen, das im Laufe der Embryonalentwicklung, Gewebedifferenzierung und Keimblattbildung die Mitose-stabile Genexpression ermöglicht (Bursen *et al.* 2010).

Das menschliche MLL-Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert und codiert für ein 3969 Aminosäuren großes Protein. Dieses Protein trägt die Sequenzen zweier Taspase1 Schnittstellen (cs: engl. *cleavage site*), an denen es durch Taspase1 gespalten werden kann. Die erste Schnittstelle ist an Stelle 2664 lokalisiert und trägt die Sequenz QVD↓GADD. Die zweite Schnittstelle beginnt an Stelle 2716 und ist durch die AS-Sequenz QLD↓GVDD codiert (Hsieh *et al.* 2003). Die Spaltung des MLL-Proteins resultiert in der Bildung eines N-terminalen Fragments mit einer Größe von 320 kDa sowie einem C-terminalen Fragment mit einer Größe von 180 kDa. Beide Fragmente assemblieren

nach ihrer Trennung zu einem Heterodimer, was in der Stabilisierung des N-terminalen Fragments resultiert (Hsieh *et al.* 2003, Knauer *et al.* 2011, Pless *et al.* (2011)).

MLL konnte im Jahr 2002 als Proto-Onkogen (Yokoyama *et al.* 2002) und überdies als häufigster Fusionspartner chromosomaler Translokationen identifiziert werden, die zur Entstehung verschiedener Leukämiearten beitragen (Hsieh *et al.* 2003). Als Fusionspartner wurde eine Vielzahl diverser Proteine identifiziert. Die chimären Proteine entstehen zum Großteil aus dem N-Terminus des MLL und einem Translokationspartner. Das Auftreten reziproker Translokationsprodukte konnte ebenfalls gezeigt werden. So ist bei einer Fusion von AF4 und MLL (AF4•MLL) lediglich das reziproke Translokationsprodukt Auslöser für eine Leukämieentstehung (Bursen *et al.* 2004). Dies resultiert aus dem Funktionsgewinn nach Bildung der Fusionsproteine, der die veränderte Genexpression von MLL-Substraten bedingt (Hsieh *et al.* 2003). So ist die Aktivierung der HOX-Genexpression vermutlich ein möglicher pathologischer Faktor der MLL-Fusionsproteine (Bursen *et al.* 2010).

1.6 MYOSIN1F

Das humane *Myosin1f*-Gen ist auf dem Chromosom 19p13.3-13.2 lokalisiert und codiert für das 1098 AS große Protein mit einem Molekulargewicht von 125 kDa. Myosin1F wird als eins der insgesamt acht Typ I *heavy chain* Myosine klassifiziert. Innerhalb dieser Klasse zählt Myosin1F zu den langkettigen amöboiden Formen und enthält neben den TypI-typischen Domänen zusätzlich eine Prolin-reiche TH2-Domäne, eine TH3-Domäne sowie eine Src-Homologie-3 (SH3)-Domäne zur Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen (Crozet *et al.* 1997, Kim *et al.* 2006)(Abb. 7). Zusätzlich konnte durch Bier *et al.* eine Taspase1-Schnittstelle in der N-terminalen „Head“-Domäne des Myosin1F identifiziert werden (Bier *et al.* 2011). Infolge der Hydrolyse von Myosin1F durch die Taspase1 wird die ATP-Bindestelle abgespalten, was Auswirkungen auf die Funktion des Myosin1F haben könnte und auf die mögliche Regulation der Myosin1F-Funktion durch Taspase1 hindeuten. Während anderen unkonventionellen Myosinen bereits Funktionen in Zellbewegung, Phagozytose, Organellentransport oder Mechanoregulation nachgewiesen wurden (Bement *et al.* 1994) ist die molekulare Funktion des Myosin1F nahezu ungeklärt.

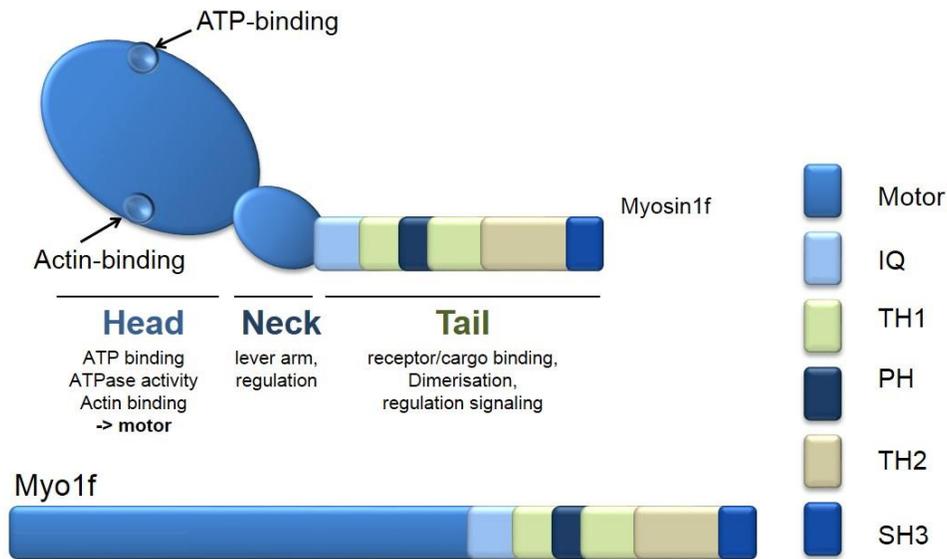


Abb.7. Domänenorganisation von Myosin1F. Myosin1F enthält neben den Typ1-typischen Domänen zusätzlich eine Prolin-reiche TH2-Domäne, eine TH3-Domäne, eine Src-Homologie-3-Domäne sowie die Taspase1-Schnittstelle in der N-terminalen „Head“-Domäne. Abbildung modifiziert nach (Maravillas-Montero und Santos-Argumedo 2012).

Myosin1F wurde als Translokationspartner von MLL in einem Fall von akuter monozytischer Leukämie (AMoL) identifiziert (Taki *et al.* 2005) (Abb. 8). Dieser Proteinfusion liegt die komplexe Chromosomentranslokation der Chromosomen 7, 11, 19 und 22 zugrunde (Taki *et al.* 2005). Bisweilen konnten zwei weitere Fälle von AML bzw. AMoL gefunden werden, in denen das Exon 9 des MLL mit dem Exon 2 des Myosin1F fusioniert vorlagen (Raffini *et al.* 2002). Bei derartigen Translokationen geht die C-terminale Region des MLL inklusive der Taspase1-Schnittstelle sowie der PHD-Finger und der SET-Domäne verloren. Die Taspase1-Schnittstelle des MLL wird jedoch durch die des Myosin1F ersetzt (Abb. 8 B).

Wie bereits erwähnt sind die physiologischen Funktionen von Myosin1F nur wenig charakterisiert. Es wird vermutet, dass Myosin1F eine Rolle bei der Entstehung von Taubheit spielt, da das Myosin1F-Gen auf dem Chromosom 19 im Locus der nicht-syndromalen Taubheit DFNB15 liegt (Chen *et al.* 2001, Zadro *et al.* 2009). Erste Untersuchungen von Myosin1F erfolgten 2006 durch Kim *et al.* Dieser konnte die Expression von Myosin1F in Säugerzellen aus Organen des Immunsystems nachweisen. Bei näheren Analysen Myosin1F-defizienter Mäuse zeigte sich zudem, dass die Adhäsion

neutrophiler Granulozyten an Integrin-Liganden stark erhöht ist. Dies äußerte sich vor allem in einer verringerten Mortalität der Zellen (Kim *et al.* 2006). Auch die Aktivierung der Neutrophilen durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α konnte die verstärkte Adhäsion nicht mindern. Eine Auswirkung auf die Integrin-unabhängige Adhäsion an mit Poly-Lysin beschichteten Substraten wurde hingegen nicht festgestellt (Kim *et al.* 2006). Die Defizienz äußerte sich stattdessen in der geminderten Immunantwort durch neutrophile Granulozyten sowie der erhöhten Anfälligkeit der Mäuse gegenüber Infektionen mit *listeria monocytogenes*. Dies führte zur Hypothese, dass Myosin1F die Mortalität von Immunzellen bedingt sowie die angeborene Immunität gegen Infektionen reguliert.

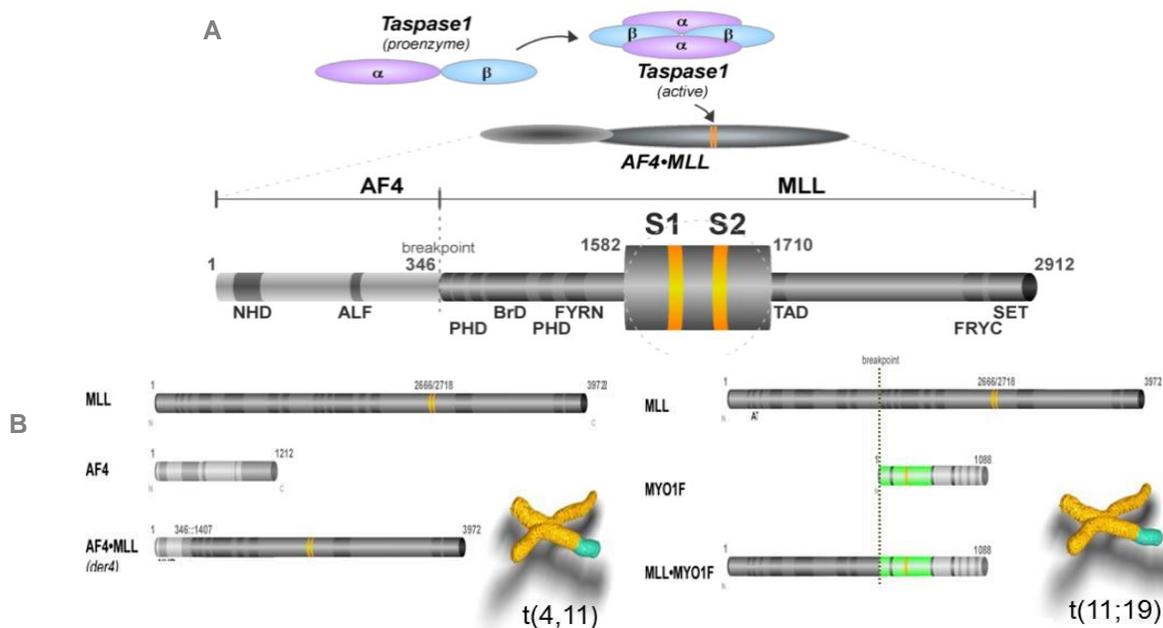


Abb. 8. Taspase1 in der Leukämieentstehung. Taspase1 ist an der Entstehung und Entwicklung von Leukämien sowie soliden Tumoren beteiligt. Die Spaltung des MLL-Fusionsproteins durch die Taspase1 wurde als kritischer Schritt der Tumorgenese identifiziert. B) Sowohl AF4, also auch Myosin1F sind als Translokationspartner des MLL nachgewiesen worden. In Folge der Fusion mit dem AF4 konnten sowohl das Fusionskonstrukt AF4*MLL (N-Terminus des AF4 und dem C-Terminus des MLL) sowie das reziproke Translokationsprodukt (C-Terminus des AF4 und dem N-Terminus des MLL). Lediglich das Translokationsprodukt AF4•MLL ist Auslöser für die Leukämieentstehung. Translokation zwischen MLL und Myosin1F führen zur Bildung des Translokationsprodukt: MLL*Myosin1F. Myosin1F fusioniert mit dem N-Terminus des MLL. Die Taspase1-Schnittstelle des MLL geht durch die Translokation verloren, wird aber durch die Taspase1-Schnittstelle des Myosin1F ersetzt. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Quelle: Knauer *et al.* 2011)

1.1 DIE ROLLE VON MLL, TASPASE1 UND MYOSIN1F IN TUMOR- UND LEUKÄMOGENESE

Als biomedizinisch relevant wurde Taspase1 erstmals angesehen als die Beteiligung an der Entstehung und Entwicklung von Leukämien (Bursen *et al.* 2004) sowie möglicherweise von soliden Tumoren (Bier *et al.* 2011, Knauer *et al.* 2011) gezeigt wurde. 2003 wurde die Spaltung des MLL-Proteins durch Taspase1 nachgewiesen und in folge dessen die Funktion der Taspase1 in der Regulation der Hox-Genexpression beschrieben (Hsieh *et al.* 2003). Knauer *et al.* konnten 2011 weiterführend zeigen, dass die Spaltung den MLL-Fusionsproteins durch Taspase1 als kritischer Schritt der Tumorgenese angesehen werden kann (Knauer *et al.* 2011). (Zhou *et al.* 2006)

Sowohl AF4 als auch Myosin1F wurden als Translokationspartner von MLL nachgewiesen. Wie bereits erwähnt, konnte im Fall des Fusionspartners AF4 ergänzend belegt werden, dass lediglich das Translokationsprodukt AF4•MLL Auslöser für die Leukämieentstehung ist (Bursen *et al.* 2004). Bei Translokation zwischen MLL und Myosin1F wurde hingegen nur das Tanslokationsprodukt MLL*Myosin1F nachgewiesen, das die Taspase1-Schnittstelle des Myosin1F enthält. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine mögliche Taspase1-Spaltung von onkologischer Relevanz sein könnte.

1.2 ZELLMIGRATION& ZYTOSKELETT

Die Adhäsion von Zellen gilt bis heute als Voraussetzung für mehrzelliges Leben. Neben dem Zusammenhalt von Zellen und Geweben ermöglicht sie die Migration von Zellen. Diese ist essenziell für Vorgänge wie Embryonalentwicklung, Ausbildung der Immunantwort, Wundheilung (Friedl und Gilmour 2009), oder Migration von Tumorzellen. Die Migration wird in Einzelmigration (amöboide oder mesenchymale Migration) und kollektive Migration als Zelllage (*sheet*), Zellstrang (*strand*), Röhre (*tube*) oder Zellhaufen (*cluster*) unterschieden (Friedl und Wolf 2003, Wolf *et al.* 2003).

Infolge einer Polarisierung der Zelle (Abb. 9 A) kommt es zur Ausstülpung der Zellfront sowie zur Formation und Stabilisierung von Anheftungsstellen. Die Veränderung der Zellform wird durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts erzielt (Verkhovsky *et al.* 1999, Verkhovsky *et al.* 1999), das F-Aktin-reiche Ausstülpungen (Filopodien,

Lamellipodien) in entsprechende Richtung bildet. Die Aktinfilamente bilden Netzwerke und Bündel, die mit der extrazellulären Matrix interagieren und die Kräfte für die Zellmigration generieren. Es folgt die Zell-Matrix-Interaktion und die Bildung fokaler Komplexe. Durch Aktivierung des Aktin-Myosin-Netzwerks kann die Zelle kontrahieren. In Verbindung mit der Destabilisierung der Anheftungsstellen am hinteren Ende der Zelle kommt es zum Nachziehen des Zellkörpers (Mitchison und Cramer 1996).

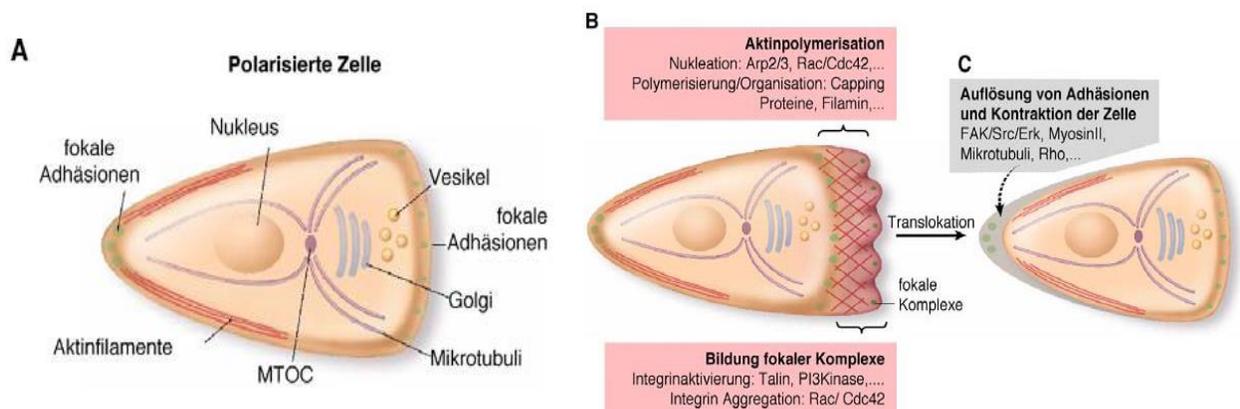


Abb. 9. Zellmigration A) Die Polarität der Zelle ist durch den gerichteten Vesikeltransport zur Zellfront, der entsprechenden Organisation von Mikrotubuli und die Ausrichtung des Golgi-Apparates vor den Nukleus gekennzeichnet. B) Der Migrationszyklus beginnt mit der Bildung von Ausstülpungen, die wiederum durch die Induktion der Aktinpolymerisation und die Verzweigung bestehender Aktinfilamente eingeleitet wird. Sogenannte fokale Komplexe bilden neue fokale Adhäsionen und stabilisieren die Ausstülpungen. Dieser Prozess wird durch die Aktivierung und Aggregation von Integrinen induziert. C) Adhäsionen am Zellende werden gelöst und die Zelle kontrahiert. Modifiziert nach Ridley et al. 2003.

1.3 FOKALE ADHÄSIONEN

Die Migration von Zellen ist nur möglich, wenn die Verankerung des Aktinzytoskeletts stattfindet. Der Kontakt zu Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) wird hauptsächlich über transmembrane Integrine vermittelt, die sich zu großen Proteinclustern zusammenlagern und mit ihrer extrazellulären Domäne an Proteine mit spezifischer Aminosäuresequenz (RGD-Sequenz) binden (z. B. Fibronectin, Laminin, Vitronectin oder Kollagen). Diese, auf Integrinen basierenden Kontaktpunkte zwischen Zytoskelett und EZM, werden als fokale Adhäsionen bezeichnet.

Integrine werden aktiv zur Spitze transportiert und fungieren dort als Signalüberträger, welche die Zelle über den Zustand der ECM informieren und dadurch ihr Verhalten beeinflussen (Riveline *et al.* 2001). Neben der Verankerung des Zytoskeletts sind Integrine in eine Vielzahl weiterer Funktionen, wie z.B. Zellproliferation, Zellteilung, Zellform, Migration oder Apoptose und Anoikis involviert (Giancotti und Ruoslahti 1999, Lee und Juliano 2004). Integrine setzen sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen die aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einfach die Membran durchspannenden Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne aufgebaut sind. Die Untereinheiten bilden ein Heterodimer, das die Substratspezifität und Signaleigenschaften durch die verschiedenen Kombinationen von Heterodimeren beeinflusst (Hynes 2002). Die Erkennung bestimmter Bestandteile der EZM erfolgt somit durch die spezifische Expression von Integrinen.

Der dynamische Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionen spielt vor allem bei der Zellmigration eine zentrale Rolle. Frühe Adhäsionen entstehen beim Vorschub des Lamellipodiums (Protrusion) nahe der Zellfront und werden Fokalkomplexe genannt.

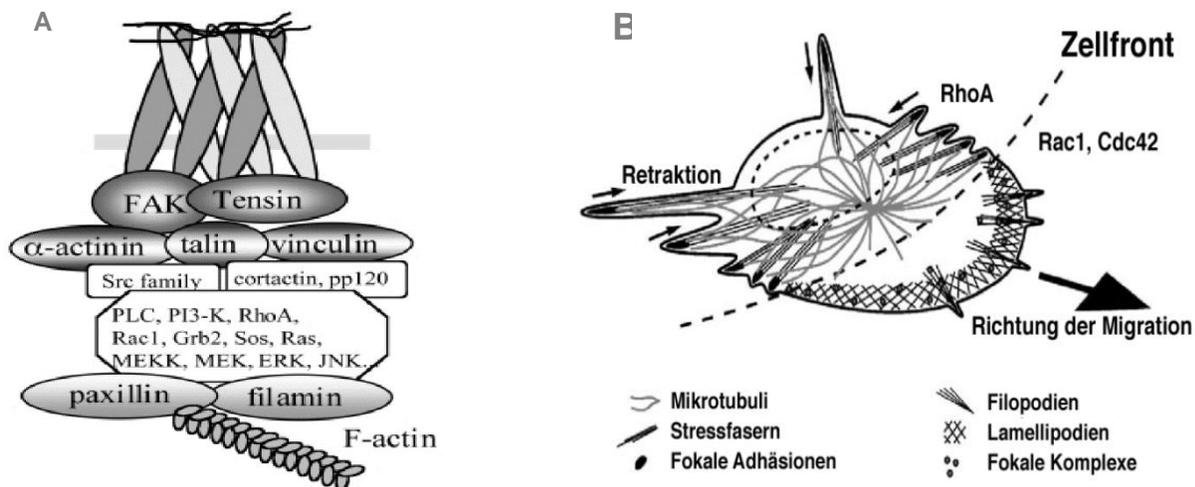


Abb. 10 Integrin-basierte Zell-Matrix-Adhäsion. A) Die Verbindung von EZM und Aktinzytoskelett erfolgt in fokalen Adhäsionen über Integrinen. Die zytoplasmatische Domäne bindet Struktur- und Signalmoleküle. Es kommt zur Bildung eines Adhäsionskomplexes, der Signale erzeugt und weiterleiten kann. Die molekularen Komponenten der fokalen Adhäsion variieren und werden durch verschiedene exogene Faktoren beeinflusst. (Quelle: Review Petit und Thiery, 2000) B) GTPase kontrollierte Zellmigration. Die Steuerung und Bildung von Lamellipodien und Filopodien erfolgt über Rac1 und Cdc42. Die Bildung von Stressfasern wird durch Rho reguliert. Ebenso steuert es die Kontraktion der Zelle, inklusive der Retraktion der hinteren Ausläufer. (Quelle: Wehrle-Haller und Imhof, 2003)

Sie sind recht klein ($0.25\mu\text{m}^2$) und enthalten neben $\alpha_5\beta_3$ -Integrin andere Proteine wie Talin, Paxillin und Phosphotyrosin. Paxillin ist ein Adaptorprotein in der Signaltransduktion. Über eine direkte Verbindung ist es mit dem zytoplasmatischen Teil des β -Integrinrezeptors assoziiert. Paxillin bindet eine Vielzahl verschiedener Proteine wie Thyrosin-Kinasen, Src, und Fecal-Adhesion-Kinase sowie Strukturproteine wie Vinculin und trägt zu der Regulation der Aktinorganisation bei (Critchley 2000). Durch Polarisation der Aktin-Filamente können Motorproteine aktiv Cargoproteine zu den Spitzen der Filopodien transportieren (Mattila und Lappalainen 2008).

Die Regulation der Substrataffinität wird durch die Konformation der extrazellulären Domäne reguliert, die durch intrazelluläre Signale von Adapterproteinen beeinflusst wird (*inside-out-signaling*). Im Gegenzug kann die Substratbindung zur Aktivierung der Integrine führen. Diese wird durch die räumliche Nähe der intrazellulären Domänen bewirkt, wodurch das veränderte Bindungsverhalten zu interagierenden Proteinen erfolgt (*outside-in-signaling*) (Hynes 2002).

Es wird vermutete, dass Integrine nicht für die Initiierung der Filopodien erforderlich sind, sondern zur Stabilisierung und damit vermutlich zur Funktionalität der Ausstülpungen von migrierenden Zellen beitragen. Im Einklang mit der Stabilisierung wurde gezeigt, dass die Integrin vermittelten Adhäsion der Filopodien zur Bildung von Lammellipodien auf Rac1 abhängige Art führt. In Folge der durch entsprechende Stimulation gegebenen Richtung polarisiert die Zelle und bildet eine definierte Front durch die Aktivierung von Rac1 und der PI3-Kinase am Leitsaum (*leading edge*) der Zelle (Sasaki *et al.* 2004). Kleine GTP-asen der Rho-Familie, wie Rac1, Cdc42 und RhoA konnten bereits als maßgeblich an der Reorganisation des Zytoskeletts beschreiben werden. Rac1 beansprucht dabei die maßgebliche Rolle bei der Lamellipodienausbildung von. Die Ausbildung erfolgt über den WAVE-Komplex (WASP-Familie Verprolin Homolog), ein NPF (*nucleation promoting factor*) für Arp2/3 und den Arp2/3-Komplex (Hanisch *et al.* 2011, Rottner und Stradal 2011). Cdc42 hat ebenfalls aktivierende Wirkung auf den Arp2/3-Komplex, was zur Ausbildung von Endosomen führt (Stradal und Scita 2006). Durch die folgende Aktivierung von Forminen wie z. B. mDia2 (murine diaphanous-related formin 2) werden insbesondere die Aktinfilamente die den Filopodien unterhalb von Cdc42 induziert (Block *et al.* 2008, Guillou *et al.* 2008).

1.4 MYOSINE

Myosine bezeichnen eine große Superfamilie Aktin-abhängiger Motorproteine. Sie interagieren mit Aktin-Filamenten und generieren Kraft aus der Hydrolyse von ATP (Krendel und Mooseker 2005). Myosinmoleküle sind heteromere Komplexe aus 1-2 schweren Ketten und einer variablen Anzahl leichter Ketten. Die schweren Ketten sind durch die Regionen Motor- (Kopf), Hals- und Schwanz-Domäne charakterisiert (Krendel and Mooseker 2005). Die Motordomäne vermittelt die ATP-abhängige Bindung an Aktin (Vale 2003, Adamek *et al.* 2008). Die Halsdomäne trägt eine variable Anzahl von IQ-Motiven, die die Bindung von Calmodulin oder Calmodulin-verwandter Proteinen ermöglichen. Zudem fungiert die Halsdomäne als Hebelarm für die Bewegung der Motordomäne. Die Schwanzdomäne der Myosinmoleküle unterscheidet sich in ihrer Länge und in ihrer Funktion. Die Funktion ist abhängig von den in der Sequenz enthaltenen Motiven. Häufig vertreten sind z. B. *coiled-coiled* Regionen zur Dimerisierung, SH3-Domänen für die Interaktion mit anderen Proteinen und PH-Domänen für Lipidinteraktionen (Coluccio *et al.* 2008).

Myosinproteine sind auf vielfältige Art an vielen zellulären Funktionen wie z. B. Organellentransport (Vale, 2003), Zytogenese, Ausbildung und Stabilisierung der Zellform (Yumura und Uyeda 2003) sowie der Muskelkontraktion (Geeves und Holmes 2005) beteiligt.

Phylogenetische Analysen unterschiedlicher Organismen konnten die 40 verschiedenen in Maus und Menschen exprimierten molekularen Motorproteine in 35 Klassen unterteilen (Richards und Cavalier-Smith 2005, Foth *et al.* 2006, Odrionitz und Kollmar 2007).

Die Klasse I-Myosine, zu denen das Myosin1F zählt, zeichnen sich durch den Besitz einer N-terminalen Motordomäne, eines IQ-Bindemotivs sowie einer „tail-homologie“-Domäne (TH1) aus. Die N-terminale Motordomäne enthält eine Aktin- sowie eine ATP-Bindedomäne. Die TH1-Domäne unterscheidet die verschiedenen unkonventionellen Myosine voneinander und grenzt sie von den klassischen TypII-Myosinen ab, zu denen z. B. Skelett- und Herzmuskelmyosine oder die Myosine der glatten Muskulatur gezählt werden (Gillespie *et al.* 2001). Des Weiteren formen die klassischen Myosine bipolare Filamente, während die unkonventionellen Myosine keine Filamente bilden. Unkonventionelle Myosine arbeiten als intrazelluläre Motoren, die Kraft aus der Hydrolyse

von ATP generieren, mit der sie sich an Aktin-Filamenten fortbewegen (Hasson und Cheney 2001).

Mit Hilfe von Transkriptomanalysen konnte eine Untergruppe aus Myosin1c, e, f und g, Myosin2a (Myh9), 5a, 7a, 9b, 10 und 18a ausgemacht werden, die ein immunzellspezifisches Expressionsmuster aufweisen (Maravillas-Montero und Santos-Argumedo 2012).

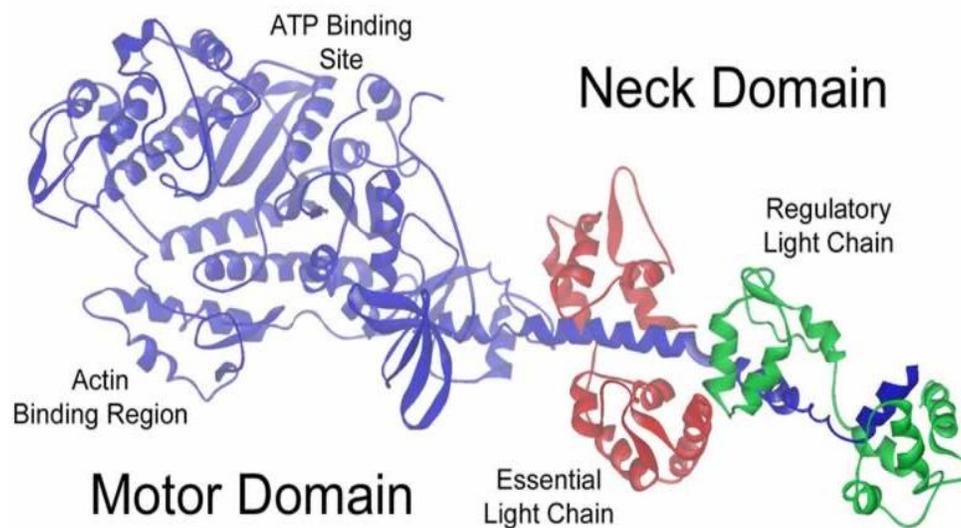


Abb. 11. Domänenorganisation von Myosinmolekülen. Myosinmoleküle sind Komplexe aus 1-2 schweren Ketten und einer variablen Anzahl leichter Ketten. Die schweren Ketten sind durch die Regionen: Motor- (Kopf) (blau), Hals- (rot) und die Schwanz-Domäne (grün) charakterisiert. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Quelle: Lab of Molecular Cardiology).

1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Krebs stellt auch in der heutigen Zeit trotz wachsendem Wissen, vielseitiger Erforschung und verbesserter Vorsorge eine der Haupttodesursachen in den industrialisierten Nationen dar. Während die Zahl der Krebstoten jährlich konstant zu bleiben scheint, ist die Anzahl der bösartigen Neubildungen weiterhin steigend⁷. Die Rolle von Proteasen in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung konnte in den letzten Jahren an Bedeutung gewinnen. Als ein relativ neues prominentes Beispiel gilt die Threonin Protease Taspase1, die ihre biomedizinische Relevanz aufgrund ihrer Beteiligung an der Entstehung und Progression von MLL-vermittelten Leukämien erlangte (Bursen *et al.* 2004) sowie durch eine erhöhte Expression in soliden Tumoren (Chen *et al.* 2010, Bier *et al.* 2011, Knauer *et al.* 2011, Bier *et al.* 2012). In den vergangenen Jahren wurde Taspase1 als „non-oncogene addiction“ Protease klassifiziert (Chen *et al.*, 2010) und als eine wichtige therapeutisches Zielstruktur neuartiger Krebstherapien postuliert (Takeda *et al.*, 2006). Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen der (patho-)biologischen Funktionen von Taspase1 sind jedoch nur unzureichend verstanden. Neben Proteinen wie MLL1, MLL2 oder TF2A konnte Myosin1F als potenzielles Taspase1-Substrat identifiziert werden. Dies deutete auf neuartige, bisher unbekannte Pathomechanismen hin, über die Taspase1 nicht nur flüssige, sondern auch solide Tumore reguliert. Die Untersuchung neuer Zielproteine der Taspase1 spielt eine entscheidende Rolle im Verständnis der Funktion der Protease in normalen aber auch in Tumorzellen.

Bei Myosin1F handelt es sich um ein nur unzureichend charakterisiertes Taspase1-Substrat. Myosine werden als Aktin-abhängige Motorproteine beschrieben, denen vielfältige Funktionen wie z. B. in der Zellbewegung zukommen. Über die physiologische Funktion von Myosin1F ist bisher nur wenig bekannt. Kim *et al.* (2006) wiesen eine hohe Expression von Myosin1F vor allem in Zellen des Immunsystems nach und zeigten, dass Myosin1F das Migrations- und Adhäsionsverhalten von Immunzellen beeinflusst. Es gibt jedoch ebenso wie für Taspase1 erste Hinweise auf eine Relevanz bei der Krebsentstehung.

Um Informationen über derartige Mechanismen sowie Ansatzpunkte für mögliche therapeutische Interventionsstrategien zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit die (patho)biologische Bedeutung des Taspase1-Myosin1F-Zusammenspiels sowie die Funktion des Myosin1F-Proteins untersucht werden.

⁷ Statistisches Bundesamt

2 MATERIAL

2.1 VERBRAUCHSMATERIAL UND CHEMIKALIEN

Die zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Verwendete Enzyme wurden von der Firma New England BioLabs (NEB, Schwalbach) erworben. Die eingesetzten DNA- und Protein-Größenstandards sowie das Protein Assay Kit zur Proteinkonzentrationsbestimmung stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Peqlab (Erlangen) und BioRad (München).

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhausen) oder Peqlab (Erlangen) erworben. Die für Fluoreszenzmikroskopische Analysen verwendeten Schälchen wurden von der Firma MatTek (Ashland, MA, USA) bezogen. Für Konfokalmikroskopie verwendete μ -Slide 8-Loch-Kammern wurden bei der Firma Ibidi GmbH (München) geordert.

Das Kit zur Isolierung von GFP- bzw. HA-markierten Proteinen wurde von der Firma Milteny (Bergisch Gladbach) bezogen.

2.2 GERÄTE

Im Folgenden sind die verwendeten Standardlaborgeräte aufgelistet. Weitere Geräte sind an entsprechender Stelle genannt.

Tab. 3. Verwendete Standardgeräte

Geräte	Hersteller/Vertrieb
Allegra X-22 Series Centrifuges	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Begasungsbrutschrank Modell INC153	MemmerT GmbH & Co. KG, Schwabach
BioPhotometer Plus	Eppendorf AG, Hamburg
CAWOMAT 2000 IR	CAWO GmbH, Schrobenhausen
Centrifuge 5417 C/R	Eppendorf AG, Hamburg
Chemie-Pumpstand	VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim
CO2-Inkubatoren	Binder GmbH
E-Box VX2 (Molecular Imaging)	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Einhängethermostat ED	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach

Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Exchangeable Thermoblocks	Eppendorf AG, Hamburg
Forma Orbital Shaker (420 Series)	Thermo Fisher Scientific, USA
Heizplatte RCT Standard	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Heizplatte RH basic 2 /,KT/C, RH	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Induktionskocher Menu 3400	Caso Germany
Key Box Code	Durable, Iserlohn
Labor-PH/mV/°C-Meter mit Mikroprozessor	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl
Laborzentrifuge ROTINA 380/Rotina 380 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Laborzentrifuge ROTOFIX 32 A	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
LetraTag LT-100H	Dymo
mikrobiologische Sicherheitswerkbank NU-437-300E/400E/500E/600E	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Mikroliterrotor 24x2ml und PCR-Rotor	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Mikroskop Primo Vert	Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen
Mini-Magnetrührer HI 180	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl
Mini-Protean Tetra Cell	BIO-Rad Laboratories GmbH, München

2.3 KITS

Die während dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tab. aufgeführt.

Tab. 4. Kits, Verwendungszweck und Hersteller

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
DNA Ligation Kit 2.1	Ligation von DNA-Enden	Mobitec
Nucleo Bond Xtra Midi	Isolation von Plasmiden aus einer 150ml Kultur	Machery-Nagel
Nucleo Bond Xtra Maxi	Isolation von Plasmiden aus einer 300ml Kultur	Machery-Nagel
Nucleo Spin Multi-8-Plasmid	Isolation von Plasmiden aus einer 6ml Kultur	Machery-Nagel
Nucleo Spin Extract II	Aufreinigen von DNA	Machery-Nagel
Cell Compartment Kit	Fraktionierung von Zelllysaten	Quiagen

2.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

Nicht gelistete in der Arbeit verwendete Puffer und Lösungen sind nachfolgend an entsprechender Stelle im Methodenteil aufgeführt.

Tab. 5. Zusammensetzung verwendeter Puffersysteme

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4
PBS+T	PBS + 0,1 % Tween 20
TBS	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl
TBS+T	TBS + 0,1 % Tween 20

2.5 ANTIBIOTIKA

Die für Bakterien verwendeten Antibiotika wurden steril filtriert und in den unten aufgeführten Konzentrationen dem Kultivierungsmedium beigelegt.

Tab. 6. Verwendete Antibiotika sowie die verwendete Konzentration

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

2.6 ANTIKÖRPER

Die für Westernblotting sowie Immunfloreszenz verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie Ursprung, die eingesetzten Verdünnungen in IF und WB sowie der Hersteller sind in den folgenden Tab.n aufgeführt.

Tab. 7. Primar-Antigene sowie Hersteller und die verwendeten Verdünnungen

Antigen	Ursprung	Verd. WB	Verd. IF	Hersteller
β-Aktin	Ziege	1:1000	-	Santa-Cruz
Akt	Kaninchen	1: 1000	-	NEB
CDC	Maus	1: 1000	-	Sigma
EGFR	Maus	1: 1000	1:50	Santa-Cruz

GAPDH	Maus	1:1000	-	Santa-Cruz
GFP	Kaninchen	1:5000	-	Santa-Cruz
GST	Maus	1:1000	-	Santa-Cruz
Integrin-alpha	Maus	1: 1000	1:100	Sigma
Integrin-beta	Maus	1: 1000	1:100	Sigma
Lamin A/C	Kanninchen	1: 1000	1:100	NEB
Myc	Maus	-	1:2000	Cell Signaling
Myc	Kaninchen	1:1000	-	Cell Signaling
Myosin-H44	Kaninchen	1:500	1:100	Santa-Cruz
Myosin1F-C12	Ziege	1:500	1:100	Santa-Cruz
Myosin1F-N14	Ziege	1:500	1:100	Santa-Cruz
Paxillin	Maus	1: 500	-	Sigma
Rac	Maus	1:500	-	Sigma
Talin	Maus	1:500	-	NEB
Taspase1	Kaninchen	1:1000	-	Santa-Cruz
Taspase1 (C-Term)	Kaninchen	1:1000	-	Abgent
Taspase1 D20	Kanninchen	1:1000	-	Origene
α -Tubulin	Maus	1:8000	-	Sigma
Vinculin	Maus	1:1000	-	Santa-Cruz

Tab. 8. Sekundär-Antigene sowie Hersteller und die verwendeten Verdünnungen

Antigen	Ursprung	Verd. WB	Verd. IF		Hersteller
IgG α -Maus	Schaf	1:10000	-	HRP	GE/Healthcare
IgG α -Kaninchen	Esel	1:10000	-	HRP	GE/Healthcare
IgG α -Ziege	Esel	1:10000	-	HRP	GE/Healthcare
IgG α -Maus	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 488	Invitrogen
IgG α -Kaninchen	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 488	Invitrogen
IgG α -Maus	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 568	Invitrogen
IgG α -Kaninchen	Ziege	-	1:1000	Alexa Fluor 568	Invitrogen
IgG α -Ziege	Esel	-	1:1000	Alexa Fluor 568	Invitrogen

2.7 OLIGONUKLEOTIDE

Synthetisch erstellte Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die im Folgenden gelisteten Oligonukleotide wurden für Sequenzanalysen, Oligoannealing sowie als Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) und quantitative-PCR (qPCR) verwendet.

Tab. 9. PCR-Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
p5Xho_TaspCT52M	AAACTCGAGCTATGACCATGGAGAAGGGCATG
p3Bam_TaspCT52M	TTTGATCCGTTCACTGGGCTTTCCAGACGGCACAC
P5MyoMycATGdel_N	TTTGGTACCGGCAGCAAGGAGCGCTTCCAC
p3-Myosin1F1-690	TTTGCTAGCCTCTCGCACCTCCTCC
Myo1-677 neu	AAAGCTAGCCTTGACAAAGACCTTGGTGC
p3-Myosin1F1-690	TTTGCTAGCCTCTCGCACCTCCTCC

Tab. 10. Oligoannealing-Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
P3-NLS1-Myo_neu	GATCCCAGTCTTCACCTACATCGGCTCTGTGCTCATCTCTGTAG
P5-NLS1-Myo_neu	CTAGCTACAGAGATGAGCACAGAGCCGATGTAGGTGAAGATTGG
P3-NLS2-Myo_neu	GATCCCAGTCCAGCACGTCAAAGATATCATCCTGG
P5-NLS2-Myo_neu	CTAGCCAGGATGATATCTTTGACGTGCTGGACTGG
p5MyoKpnMyc	GATGGAACAAAACTTATTTCTGAAGAAGATCTGGGTAC
p3MyoKpnMyc	CCAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGTTCATCGTAC

Tab. 11. Primer zur Sequenzanalyse

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
CMV-Promotor	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
p5_Seq_mCh	CACCATCGTGGAACAGTACG
pEGFP_C2-RP	TTTAAAGCAAGTAAAACCTC
pcDNA3.1-RP/1	CAAACAACAGATGGCTGGC
Seq_GST	TCCAGCAAGTATATAGC
T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAG

Tab. 12. q-PCR Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
Myosin1F_for-1	AGGTTATTGGGATCCCGCCC	Tasp-for-1	CAGCCAAAGAGTTGGAAACA
Myosin1F_rev-1	AAGGCCAGGAGGTCCACACT	Tasp-rev-1	TCAATTGCCTTCTGACAAGC
Myosin1F_for-2	GCAGAGGTATGCCATTCTGA	Tasp-for-2	CATGCAGATGTTCTGCCGAG
Myosin1F_rev-2	TGACAAAGACCTTGGTGCTC	Tasp-rev-2	TGTGAGTCTTGGCTTTCCCA
Myosin1F_for-3	AGATGGGGGCAAGATCTCCA	Tasp-for-3	GGAGCACTGAGTGGAATCAAG
Myosin1F_rev-3	CCCAATAACCTGCATAGCACT	Tasp-rev-3	GGCAAGAGGGTATTCCATG
Myosin1F_for-4	CAGAGGTATGCCATTCTGACC	Tasp-for-4	GGCAGAATTCCTCCCTGCTT
Myosin1F_rev-4	AACTTTCGCTCTCGCACCTC	Tasp-rev-4	CTACCGTGTCCAAAGTGCCT
Myosin1F_for-5	CTCACCTTCAGCGACACACT	Tasp-for-5	GCTGAAGCGGGTAATTCCT
Myosin1F_rev-5	ATTGCGATCCATGCCTCTGG	Tasp-rev-5	ACCAGCCGAAACCTGAGATG
Myosin1F_for-6	CAGAGCCGATGTAGGTGAAG A	Tasp-for-6	AGTTGGAGCACTGAGTGAAT
Myosin1F_rev-6	CACCTCCATCACGACCCATT	Tasp-rev-6	TGCCCATCTGTAGGCTCCTT
Myosin1F- Quiagen	Unbekannte Sequenz		

2.8 VEKTOREN

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren und die konstruierten bzw. erhaltenen Expressionsvektoren aufgeführt.

Tab. 13. Eukaryotische Expressionsvektoren sowie die enthaltenen Merkmale

Plasmid	Relevante Merkmale/Codierung	Referenz
pF143	pcDNA3.1-Derivat, codiert für GFP	Rosorius <i>et al.</i> , 1999
pCDNA3 (+)	ampr, eukaryotischer Expressionsvektor, neor	Invitrogen
pC3_GFP	ampr, eukaryotischer Expressionsvektor, neor,	Labor Prof. Stauber
pc3-Tasp-BFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit BFP	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-Tasp-GFP	Volllänge Taspase1 in Fusion mit GFP	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-Tasp-mCh	Volllänge Taspase1 in Fusion mit mCherry	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-Tasp-Stop	Volllänge Taspase1	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-TaspTV-BFP	Inakt. fl-Taspase1-Mutante in Fusion mit BFP	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-TaspTV-GFP	Inakt. fl-Taspase1-Mutante in Fusion mit GFP	Bier <i>et al.</i> , 2011a

pc3-TaspTV-mCh	Inakt. fl-Taspase1-Mutante in Fusion mit mCherry	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-Tasp-Sensor (grün)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase1-Schnittstelle2 des MLL-Proteins-myc-RevNES	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-Tasp-Sensor (grün ohne myc)	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Taspase1-Schnittstelle2 des MLL-Proteins-RevNES	Labor Prof. Stauber
pc3-Myo-Sensor-GFP	Fusionsprotein aus SV40NLS-GFP-GST-Myosin1F-Schnittstelle2 des MLL-Proteins-myc-RevNES	Bier <i>et al.</i> , 2011a
pc3-Tasp-cyt-GFP	Fl-Taspase1 in Fusion mit GFP mit C-term.NES	Bier <i>et al.</i> , 2011b
Myosin1F-GFP	Volllänge Myosin1F in Fusion mit GFP	Dr. C. Bier
Myosin1F-mut-GFP	Volllänge Myosin1F mit mutierter Schnittstelle in Fusion mit GFP	Dr. C. Bier
Myc-Myosin1F-GFP	Volllänge Myosin1F in Fusion mit GFP und Myc-Tag	Diese Arbeit
Myc-Myosin1F-mut-GFP	Volllänge Myosin1F mit mutierter Schnittstelle in Fusion mit GFP und Myc-Tag	Diese Arbeit
Myosin1F-C-term-GFP	C-terminales Spaltprodukt des Myosin1F in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
Myc-Myosin1F-C-term-GFP	C-terminales Spaltprodukt des Myosin1F in Fusion mit GFP und Myc-Tag	Diese Arbeit
Myosin1F-N-term-GFP	N-terminales Spaltprodukt des Myosin1F in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
Myc-Myosin1F-N-term-GFP	N-terminales Spaltprodukt des Myosin1F in Fusion mit GFP und Myc-Tag	Diese Arbeit
Myosin1F-690-GFP	Head-Domäne des Myosin1F in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
Myosin1F-690-mut-GFP	Head-Domäne des Myosin1F mit mutierter Taspase-Schnittstelle in Fusion mit GFP	Diese Arbeit
pC3-Rac-wt-mCH	pC3-Vektor mit mCherry markiertem Rac	Labor Prof. Nahlband
pC3-Rac-QL-mCH	pC3-Vektor mit mCherry markiertem Rac mit Q zu L Mutation	Labor Prof. Nahlband
pC3-CDC-wt-mCh	pC3-Vektor mit mCherry markiertem Cdc42	Labor Prof. Nahlband
pC3-CDC-QL-mCh	pC3-Vektor mit mCherry markiertem Cdc42 mit Q zu L Mutation	Labor Prof. Nahlband

Tab. 14. Prokaryotische Expressionsvektoren sowie die enthaltenen Merkmale

Plasmid	Relevante Merkmale/Codierung	Referenz
pGex-NESI	Fusionsprotein aus GST-potenziellem NES des Myosin1F-Proteins-GFP	Diese Arbeit
pGex-NESII	Fusionsprotein aus GST-potenziellem NES des Myosin1F-Proteins-GFP	Diese Arbeit

2.9 BAKTERIENSTÄMME UND KULTURBEDINGUNGEN

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde *E.coli* XL2-Blue™ verwendet. Eine heterologe Proteinexpression erfolgte mittels *E.coli* BL21 (DE3) pLysS. Die entsprechenden Bakterien wurden in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, AppliChem, Darmstadt) oder auf LB-Agar Platten (AppliChem, Darmstadt) unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei 37°C angezogen.

Tab. 15. Charakterisierung der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL2-Blue™	recA1, endA1, gyrA96, thi-1 hsdR17, supE44, relA1, lac [F0 proAB lacqZ_M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F-dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal λ(DE3) [pLysS Camr]	Stratagene

2.10 ZELLINIEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tab. 15 aufgelistet.

Tab. 16. Zelllinien

Zelllinie	Gewebe/Organismus/Charakteristika	ATCC-Nr./ Referenz
293T	Embryonales Nierengewebe, Homo sapiens	CRL-11268
A431	Epidermoides Karzinom, Homo sapiens	DSMZ ACC 91
HeLa	Zervix Adenokarzinom, Homo sapiens	CCL-2
J774	Makrophagenzelllinie, Mus musculus	TIB-67
K562	Lymphoblasten, Chronisch Myeloische Leukämie (CML), HS	CCL-243

MCF	Brustkrebs-Zelllinie	CRL-
Raw	Makrophagenzelllinie, Mus musculus	TIB-71
SaOs	Knochen, Osteosarkom, Homo sapiens	HTB-85
SW480	Kolorektales Adenokarzinom, Homo sapiens	CCL-280
Vero	Normales Nierengewebe, Cercopithecus aethiops	CCL-81
Wi38	Lungenfibroblasten, Homo sapiens	CCL-75

2.11 SOFTWARE/ COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSEN

Zur Datenauswertung und Bildbearbeitung wurden neben den Standard Office-Programmen: Adobe Photoshop CS5, AxioVision 4.8, Leica Confocal Software, PhotoShop 5 und Canvas11 zur Datenauswertung und Bildbearbeitung verwendet. DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit und Gene Construction Kit analysiert. Homologierecherchen mit DNA- und Proteinsequenzen sowie Vergleiche mit genomischer DNA erfolgten mit der Ensembl Datenbank und mit dem BLAST Programm. Für die Analyse der Proteinsequenz (Motive, Domänen, etc.) wurden die in der Tab. aufgeführten Algorithmen verwendet.

Tab. 17. Verwendete Computerprogramme

Verwendung	Programm/ Webadresse
Ensembl	www.ensembl.org
GeneCards	http://www.nbn.ac.za/genecards/index.shtml
BLAST	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
Primerdesign	NCBI (Primer 3)
qPCR Analyse	Applied Biosys. Step One Software
Bildbearbeitung	Canvas 11
Konfocalmikroskopie	LAS-F Confocalimaging Software
Nanodrop	ND-1000 V3.2.1.
NES-Finder	http://research.nki.nl/fornerodlab/NES-Finder.html
Mikroskopsoftware	AxioVision 4.8 ((Zeiss)
Sequenzanalyse	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
Sequenzanalyse	http://swissmodel.expasy.org
Sequenzanalyse	http://ipsort.hgc.jp/index.html

3 METHODEN

3.1 ANALYTISCHE METHODEN

3.1.1 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Die DNA-Konzentration wird dabei über eine Messung ihrer Absorption bei einer Absorptionswellenlänge von 260nm bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA oder 40 µg RNA bzw. ssDNA. Verunreinigungen durch Proteine wurden bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Verunreinigungen durch Salze und organische Substanzen wurden bei 230 nm detektiert. Das 260/280nm-Verhältnis von reiner RNA liegt bei 1.7-1.8. Für reine DNA ist ein 260/280nm-Verhältnis von 2 beschrieben.

3.1.2 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD

Für eine Beladung von Proteingelen mit homogenen Mengen an Protein, wurde vor Auftragen der Proben eine Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration in der Probe vorgenommen. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der Bradford Methode (BRADFORD, Anal Biochem 72: 248-254, 1976). Diese beruht auf der Bindung des Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an das Protein, was zu einer Erhöhung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm führt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm gilt dabei als Maß für die Proteinkonzentration. Für die Messung wurde 1 µl der Probe mit 799 µl PBS verdünnt und anschließend mit 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay, mit Coomassie G-250, BioRad, München) versetzt. Nach vortexen der Proben wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Eine Quantifizierung der vorliegenden Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve vorgenommen.

3.1.3 BESTIMMUNG DER OPTISCHEN DICHTEN VON BAKTERIENKULTUREN

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde mit einem Spektralphotometer der Firma Amersham Pharmacia bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Die Messung wurde

mit einer Verdünnung der Bakterienkultur von 1:10 durchgeführt. Eine OD600 von 1 entspricht dabei einer Zelldichte von 3×10^7 Zellen pro Milliliter Kultur.

3.1.4 *BESTIMMUNG DER ZELLZAHL VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN*

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammern durchgeführt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde die Zellzahl in 3 Großquadraten ermittelt. Der Mittelwert multipliziert mit 10^4 ergibt die Anzahl der Zellen in einem Milliliter Lösung.

3.1.5 *SEQUENZANALYSE ZUR VERIFIZIERUNG VON KOLONIERUNGSPRODUKTEN*

Nach vorausgegangenen Analysen der Klonierungsprodukte mittels analytischer PCR und analytischem Restriktionsverdau erfolgte in Einzelfällen eine weitere Überprüfung der Klonierung nach dem Prinzip des Kettenabbruchs von Sanger (Sanger et. al. 1977). Alle DNA Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz, BRD) oder der Firma LGC durchgeführt. Hierfür wurde die DNA in einer Konzentration von $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ an die Firma versandt. Eine Auswertung der Sequenzanalyse erfolgte mit BioEdit.

3.1.6 *MIKROSKOPIE*

Um die Lokalisation von Proteinen in der Zelle oder die relative Lokalisation unterschiedlicher Proteine zu einander untersuchen zu können ist es möglich die Proteine mit Fluorophoren oder Fluorochromen zu markieren und diese dadurch anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren. Dabei absorbieren die Fluorochrome, bzw. Fluorophore das Licht einer bestimmten Wellenlänge, wodurch sie in einen sogenannten angeregten Zustand gelangen. Die Emission der Lichtquanten bewirkt, dass das angeregte Molekül zurück in seinen energetischen Grundzustand gelangt. Das grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* sowie die daraus abgeleiteten Varianten gehören heutzutage zu einem der wichtigsten Hilfsmittel der Fluoreszenzmikroskopie. Die Fluoreszenz von GFP beruht dabei auf der Autozyklisierung und Oxidation der drei benachbarten Aminosäuren: Ser65, Tyr66 und Gly67. Das GFP kann direkt an das Protein von Interesse fusioniert werden und zeichnet sich besonders durch seine stabile Fluoreszenz aus. Neben GFP haben sich des weiteren Fluorochrome

wie mCherry (mCH), Rhodamin, Cy3 oder FITC (Fluoresceinisothiocyanat) bewährt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit GFP-, BFP-, Kate und mCherry fusionierten Proteinen gearbeitet.

Neben der direkten Fusion des Proteins an den gewünschten Farbstoff ist es des Weiteren möglich Proteine in der Zelle durch eine Immunfluoreszenzfärbung anzufärben. Diese erfolgt durch Anwendung spezifischer Antikörper.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzanalysen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss (Zeiss Axio Ovserver 2.1) sowie mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop TCS-SL der Firma Leica (Wetzlar) durchgeführt. Eine Erfassung der Präparate am inversen Fluoreszenzmikroskop erfolgte durch eine CCD-Kamera und das computergestützte Bilderfassungsprogramm Axiovision 4.7 der Firma Carl Zeiss. Die Erfassung am konfokalen Laserscanning Mikroskop erfolgte durch die Leica Confocal Software LASF.

3.1.6.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Anders als bei der konventionellen Lichtmikroskopie wird bei der Fluoreszenzmikroskopie Licht durch zwei Filtersysteme geleitet. Der erste Filter filtert selektiv die Wellenlängen, welche spezifisch das Fluorophor anregen. Der zweite Filter lässt nur Licht der emittierten Wellenlänge passieren, wodurch kein Licht der Anregungs-wellenlänge detektiert werden kann.

3.1.6.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie werden durch fokussierte Laserstrahlen einzelne Punkte des Präparats bestrahlt. Dieses unterscheidet konfokale Mikroskopie von der Epifluoreszenzmikroskopie, bei welcher das gesamte Präparat bestrahlt wird. Unter Zuhilfenahme computergestützter Techniken kann aus einzeln aufgenommenen Punkten das gesamte Bild rekonstruiert werden. Des Weiteren kann so durch Ausblenden von Hintergrundsignalen aus höheren oder tieferen Schichten des Präparats eine höhere Tiefenschärfe erzielt werden.

3.1.6.3 *Expression Chromophor-gekoppelter Proteine* (direkte Immunfluoreszenzfärbung)

Für die Analyse der Lokalisation von Proteinen in der Zelle wurden Chromophor-gekoppelte-Proteine in der Zelle exprimiert. Für diesen Zweck wurden die Zellen in 35 mm MatTek Schälchen, oder 8-Loch Platten der Firma Ibidi ausgesät und transfiziert. Eine Expression der Proteine erfolgte für einen Zeitraum von 12-48 H. Für live cell-Analysen wurde eine direkte Analyse der Zellen vorgenommen. Für nicht live cell-Analysen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Roti Histofix der Firma Carl Roth für 15 Min bei RT fixiert.

3.1.6.4 *Immunfluoreszenzfärbung* (Indirekte Immunfluoreszenzfärbung)

Für die Markierung von Proteinen in der Zelle mit Fluorophorgekoppelten Antikörpern wurden die Zellen zunächst ausgesät, ggf. transfiziert und fixiert. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2% Triton-X für 15-45 min bei 37°C. Die permeabilisierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1h bei RT mit dem Erstantikörper in PBS inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde der Fluorophorgekoppelte Zweitantikörper für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Die Anfärbung der Zellkerne wurde durch Zugabe von 50 pg/ml Hoechst (Sigma-Aldrich) bewirkt.

3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 BAKTERIENKULTUR

3.2.1.1 *Herstellung kompetenter E. coli Zellen*

Die Herstellung sowie die Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach Hanahan (Hanahan, J Mol Biol 166(4): 557-580, 198). Nach animpfen einer E. coli XL2Blue Kolonie wird diese über Nacht bei 37°C kultiviert und anschließend bei Raumtemperatur bis zu einer optischen Dichte (600nm) von 0,6 angezogen. Die Zellen

werden mittels Zentrifugation geerntet (4°C, 10min, 4000rpm) und in 80ml TBjap, 2% DMSO (v/v) resuspendiert. Nach einer weiteren Sedimentation der Zellen (4°C, 10min, 4000 rpm) wird das Zellpellet in 19 ml TBjap, 2% DMSO gelöst und nach Zugabe von 1 ml DMSO (EK 7% (v/v)) in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert. Die Lagerung erfolgt im Anschluss an das Schockgefrieren der Zellen mit Flüssigsickstoff bei -80°C.

Tab. 18. Zusammensetzung TBjap-Puffer

TBjap (Transformation Buffer Japanese)	
Pipes	10mM
CaCl ₂	15mM
KCl	250mM
mit KOH auf pH 6,7 einstellen	

3.2.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E.coli* Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 50µl der Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0,2-1 µg des Ligationsansatzes, oder des Plasmids versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgt der Hitzeschock in Form einer einminütigen Inkubation der Zellen bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen weitere 5 min auf Eis belassen, bevor die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert wurden. Im Falle von Plasmiden mit Kanamycinresistenz wurden die Zellen vor dem Ausplattieren in 500 µl LB-Medium 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Anzucht der transformierten Bakterien erfolgte bei 37°C unter anaeroben Bedingungen über Nacht.

Tab. 19. Zusammensetzung der Transformationsreagenzien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin (Amp)	Stammlösung 100µg/ml Ampicillin
Kanamycin (Kann)	50 µg/ml Stammlösung Kanamycin
Luria-Bertani (LB) Medium	5g NaCl, 5g Hefeextrakt, 10g Trypton, in 1l H ₂ O, sterilisiert
LB-Amp-Medium	LB-Medium, 100µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar	LB-Medium+ 1,5% (w/v) Agar+ Amp, sterilisiert
LB-Kann-Agar	LB-Medium+ 1,5% (w/v) Agar+ Kanamycin, Sterilisiert

3.2.1.3 *Kultivierung und Wachstum von E. coli in Flüssigkulturen oder auf Festagarplatten*

Die Anzucht von E.coli erfolgte in LB-Medium oder auf Festagarplatten mit entsprechendem Antibiotika als Selektionsmarker (Endkonzentration: 100 µg/ml Ampicillin; 20 µg/ml Kanamycin) bei 37°C über Nacht.

3.2.1.4 *Plasmidisolierung aus Bakterienzellen*

Für eine Isolierung von Plasmid-DNA aus XL2-Blue Zellen werden die Bakterien unter anaeroben Bedingungen über Nacht in Antibiotika haltigem LB-Medium angezogen und anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Plasmidisolierung aus dem Bakterienpellet erfolgt abhängig von der benötigten Plasmidmenge mit dem entsprechenden Kit (Machery-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers. Eine Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA-Menge erfolgte anschließend photometrisch.

Tab. 20. DNA-Isolationskits

DNA-Menge	Kit	Volumen der Bakterienkultur (ml)	Hersteller
< 20 µg	Nucleo Spin Multi-8-Plasmid	6	Macherey-Nagel
250 µg	Nucleo Bond Xtra Midi	150	Macherey-Nagel
1000 µg	Nucleo Bond Xtra Maxi	300	Macherey-Nagel

3.2.1.5 *Herstellung und Lagerung von Glycerinkulturen*

Zur Lagerung der Bakterienkulturen wurden diese mit 15% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und nach Schockfrieren mittels Flüssigstickstoff bei -80° C gelagert.

3.2.2 ZELLKULTUR

3.2.2.1 *Auftauen von Zellen*

Die gefrorenen Zellstocks wurden unter Schwenken in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Das DMSO wurde durch mehrfaches waschen der Zellen mit PBS entfernt.

Anschließend wurden die Zellen zur Kultivierung in frischem Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verwendeten Ziellinien wurden entsprechend der ATCC-Angaben kultiviert und passagiert. Die Kultivierung adhärenter eukaryotischer Zellen erfolgte in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) in wasserdampfgesättigter Umgebung unter Begasung mit 5 % CO₂. Eine typgerechte Versorgung der Zellen wurde durch Verwendung einer auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmten Nährmediums gewährleistet. Sofern nicht anders beschrieben wurden die Zellen zur Passagierung durch Inkubation in Trypsin/EDTA abgelöst. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder Hefen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Lagerung der Zellen erfolgte in FCS mit 10% DMSO und Flüssigstickstoff.

Tab. 21. Kultivierungsmedien und Zusätze zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Kultivierungsmedien/ Medienzusätze	Zusammensetzung/ Beschreibung	kultivierte Zelllinien	Hersteller
Antibiotic-Antimycotic	10000 U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin sulfate, 25 µg/ml Amphotericin B	-	Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin (100x)	10.000U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin	-	
Fötale Kälberserum (FCS)	Serum-Zusatz für Zellkultur- medien, Hitzeinaktivierung 30min bei 56°C (FCSi)	-	Invitrogen
L-Glutamin (100x)	Aminosäure-Zusatz für Zellkulturmedien 200 mM in 0,85% NaCl-Lösung	-	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 10 % FCS, 1 % L- Glutamin, 1 %Antibiotic- Antimycotic	293T, HeLa, A431, Vero, SW480	Invitrogen
DMEM:F12	1:1 Gemisch aus DMEM und HAM's F12 Medium + 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Antibiotic-Antimycotic	Raw, J774	C.C.Pro GmbH

OptiMEM	Modifikation von MEM (Eagle's) mit einem reduzierten Serum- und Proteinanteil	Transfektionsmedium	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA mit Phenolrot 0,25g/l	-	Invitrogen, Karlsruhe

3.2.2.3 Zellpassage

Adhärente Zelllinien zeichnen sich unter anderem durch ihre Haftung an entsprechend beschichteten Böden der Zellkulturflaschen aus. Für eine Pasagierung der Zellen wurden diese dementsprechend enzymatisch oder mechanisch abgelöst. Eine Passagierung erfolgte alle 2-3 Tage unter Verwendung von Trypsin. Dieses spaltet die Adhäsionsproteine an der Zelloberfläche was zu einer Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche führt. Nach Erhalt einer Zellsuspension wurden eine Bestimmung der Zellzahl mittels Zellzählung vorgenommen und die Zellen unter Beachtung der geforderten Zelldichte in eine frische Zellkulturflasche überführt sowie entsprechend der Versuchsanforderungen ausgesät.

Tab. 22. Kulturgefäßbedingungen

Kultur-gefäß	Fläche (cm ²)	Zelldichte bei Aussaat (x 10 ⁶)	Zelldichte bei Konfluenz (x 10 ⁶)	PBS (mL)	Trypsin (mL)	Medium (mL)
35 mm	8	0,3	1,2	2	0,5	2
60 mm	21	0,8	3,2	3	1,5	3
100 mm	58	2,2	8,8	6	2	10
T-25	25	0,7	2,8	3	1	4-5
T-75	75	2,1	8,4	6	2	10-15
T-175	175	4,6	18,4	10	3	25-30
24 well	2	0,05	0,2	1	0,5	0,5-1
12 well	4,01	0,1	0,4	1	0,5	1-2
6 well	9,5	0,3	1,2	2	0,5	3-5

3.2.2.4 *Langfristige Lagerung von Zellen*

Um Zelllinien langfristig lagern zu können wurden diese in FCS gelöst. Um eine Bildung zellschädigender Kristalle zu verhindern wurde 10% (v/v) DMSO beigemischt. Das Gemisch wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und diese in Gefrierbehältern der Firma Nalgene (Roskilde, Dänemark) um 1 °C pro Min auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -173 °C gelagert.

3.2.2.5 *Mykoplasmenkontrolle*

Als Mycoplasmen wird eine Form der kleinsten, extrazellulär parasitierenden Bakterien bezeichnet. Nicht selten kontaminieren Mycoplasmen die Zellkultur und greifen in den Stoffwechsel der Zellen ein, was zu Veränderungen des Wachstums sowie Veränderung weiterer Zelleigenschaften führen kann. Aufgrund ihrer Größe ist eine Kontamination durch Mycoplasmen mittels Mikroskopie nicht erkennbar. Aus diesen Gründen wird nach Auftauen von Zellen eine Mycoplasmenkontrolle mittels Plasmogon Mycoplasma Detection Kit (Invivogen, Toulouse) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine Erkennung der Kontamination erfolgt in diesem Fall über den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) der Zellen. Liegt eine Verunreinigung der Zellen mit Mycoplasmen vor, so aktiviert TLR2 NFκB und weitere Transkriptionsfaktoren, die eine Abgabe von SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) in den Überstand bedingen. Dies wird durch Umschlagen des sonst rötlichen Mediums in eine Blau-/Violett-färbung erkennbar.

3.2.2.6 *Eliminierung von Mykoplasmen*

Da eine Kontamination durch Mycoplasmen Veränderungen von Zelleigenschaften bedingen kann, müssen infizierte Zellen vor einer weiteren Verwendung von dieser Infektion bereinigt werden. Eine Entfernung der Mycoplasmen erfolgt durch ein-wöchige Kultivierung der Zellen unter Einfluss von Myco-I und Myco-II (AppliChem). Die Wirkung des Myco-I beruht auf dem Antibiotikum Tiamulin, die des Myco-II auf dem Tetracyclinderivat Minocyclin. Anschließend werden die Zellen weitere 3-4 Passagen ohne Antibiotika kultiviert und einer Mycoplasmenkontrolle hinsichtlich einer erfolgreichen Eliminierung der Mycoplasmen unterzogen.

3.2.2.7 *Synchronisation von Zellen mittels Doppel-Thymidinblock*

Für eine effektivere Analyse mitotischer Zellen wurden adhärenente Zellen mittels Doppel-Thymidinblock in der G1/S-Phase arretiert und damit die Anzahl der Mitosen erhöht. Zur Behandlung der Zellen wurde Thymidin, eine Ribonukleodid-Reduktase, der Firma Sigma-Aldrich in einer Konzentration von 2 mM in das Medium der Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 16 h erfolgte ein sogenannter Release der Zellen durch entfernen des Thymidin in Form eines Mediumwechsels. Nach 8 h erfolgte dann ein zweiter Thymidinblock durch erneute Zugabe von 2 mM Thymidin. Nach einer Inkubation von 16 h wurden die Zellen fixiert, oder eine livecell Analyse durchgeführt.

3.2.2.8 *Behandlung eukaryontischer Zellen mit Inhibitoren*

Eine Behandlung der Zellen mit den in Tab. 22 gelisteten Inhibitoren, oder chemischen Substanzen erfolgte in den unten angegebenen Konzentrationen. Die Behandlungszeit wurde versuchsabhängig variiert und ist entsprechend angegeben. Die Substanzen wurden dem entsprechenden Zellkulturmedium beigemischt. Eine Analyse der Behandlungen erfolgte mittels Konfokalmikroskopie oder Westernblot.

Tab. 23. verwendete Inhibitoren

Abk. /Nr.	Inhibitor/ Gerichtet gegen	Konzentration	Lösungs-mittel	Eingesetzte Konz.	Hersteller
MG-132	Proteasom	10mM	DMSO		
LY294002	PI3K		DMSO	15µmol/L	NEB
LeptomycinB	CRM1	0,37 mM		10 nM	Enzo
Wortmannin	PI3K	2mM		1:1000	Sigma

3.2.2.9 *Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Polyfektion oder Lipofektion*

Die Transiente Transfektion von Zellen bezeichnet die kurzzeitige Aufnahme von Fremd-DNA in die Zelle. Die auf der Plasmid-DNA codierten Gene können im Folgenden in der Zelle mit Hilfe eines eukaryotischen Promotors exprimiert werden. Um kurzzeitig (12-48 h) Fremd-DNA in Säugerzellen einzubringen wurde sich der unten aufgeführten

Reagenzien bedient. Beide Substanzen wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Die verwendete DNA-Menge betrug in Abhängigkeit des durchgeführten Versuchs zwischen 0,2 und 2 µg.

Tab. 24. Transfektionsreagenzien

Zelllinien	Reagenz	Hersteller
293T	Polyethylenimin-(PEI)	Sigma, Taufkirchen
Hela, J774, A431, Sw80	Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe

Bei Polyethylenimin (PEI)-vermittelten Transfektionen kommt es zur Bildung von sogenannten Polyplexen zwischen dem polykationischen Polymer PEI und der DNA. Die hohe positive Ladungsdichte des PEI erlaubt dabei die Bindung der DNA und die Bildung der Polyplexe, welche über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Die PEI/DNA-Polyplexe gelangen Zellzyklusunabhängig in den Kern und geben dort die DNA frei. Für die Transfektion mit PEI in einem Volumen von 2ml (z.B. 6-Loch-Platte, 35 mm Mikroskopieschale) wurden 60 µl PBS (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10,8 µl (Konz: 10 mM) des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI) (Sigma, Taufkirchen) vermengt. Diesem wird anschließend einem Gemisch aus 60 µl sterilem PBS und 4 µg DNA hinzugefügt. Der Transfektionsansatz wird 20 Min bei Raumtemperatur inkubiert um eine Ausbildung von PEI/DNA-Polyplexen zu ermöglichen. Anschließend wird der Ansatz in das Medium pipettiert. Für eine Transfektion von Zellen in 10 cm Kulturschalen wurde die fünffache Menge von Reagenzien und DNA eingesetzt.

Bei der Lipofectamin- vermittelten Transfektion werden Liposomengemische aus polykationischen Lipiden (welche DNA binden) und neutralen Lipiden (welche die Membranfusion vermitteln) verwendet. Die Transfektion mit Lipofectamine2000 (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte unter Verwendung von OptiMEM. Dazu wurden Gemische aus 125 µl OptiMEM mit 5 µl Lipofectamine2000, bzw. 2 µg DNA hergestellt, welche nach einer Inkubation von 5 Min bei Raumtemperatur vereinigt wurden. Nach Ablauf einer weiteren Inkubation von 20 Min bei RT wurde das Zellkulturmedium durch OptiMEM ersetzt und der Versuchsansatz auf die Zellen gegeben. Nach 3-6 h Inkubation der Zellen werden diese weiterhin in Medium kultiviert.

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.3.1 DNA-AMPLIFIKATION DURCH POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen. Die Amplifikation der DNA-Fragmente wurde nach Angaben des „PCR Applications Manual“ (Roché, Stand 1999) durchgeführt und abhängig von der gewählten Oligonukleotidsequenz und der Länge des zu amplifizierenden Fragments optimiert.

Eingeleitet wird die Amplifikation durch eine initiale Denaturierung bei 95-98 °C für mehrere Sekunden. Ebenso wie bei den folgenden Denaturierungsschritten wird hierdurch eine Denaturierung des doppelsträngigen (ds) DNA-Template durch eine Temperatur von 95-98°C erwirkt. Die so entstandene einzelsträngige (ss) DNA bindet in dem darauffolgenden Annealing-Schritt an die verwendeten Primer. Im dritten Schritt erfolgt die Extension durch die DNA-Polymerase, welche den neuen komplementären DNA-Stang synthetisiert. Die Extensionszeit ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, als auch von der eingesetzten Polymerase. Eine finale Extension beim Temperaturoptimum der DNA-Polymerase folgt für mehrere Min, um sicherzustellen, dass die Verlängerung aller verbleibenden ssDNA vollständig abgeschlossen ist. In der Regel wurden pro PCR 20-40 Zyklen vorgenommen.

Als Template wurde Plasmid-DNA in einer Konzentration von 1-100 ng verwendet. Zur Amplifikation wurde im Rahmen dieser Arbeit die Biotherm Taq DNA-Polymerase (Genecraft, Köln) verwendet. Das Temperaturoptimum der Polymerase ist mit 94°C angegeben, die Extensionszeit mit 1min/kb. Zur Amplifikation wurden 1 U Enzym-einheiten verwendet. Sämtliche PCR Reaktionen wurden im T-Professional Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt. Eine Analyse der PCR-Ergebnisse erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

3.3.2 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte mittels Horizontal-Elektrophorese nach Mantis *et al.* (1989). Bei dieser Methode erfolgt eine Auftrennung von dsDNA anhand ihres Molekulargewichts. Angewendet wird diese Methode z.B. nach einer PCR- Reaktion oder einem Restriktionsverdau.

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden in Rahmen dieser Arbeit 1%ige Agarose-Gele (w/v in 1x TBE Puffer) verwendet. Die Agarose-Konzentration des Gels ist dabei abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente.

Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer konstanten Spannung von 120 V in 1x TBE. Zur Visualisierung der doppelsträngigen Nukleinsäurefragmente wurde dem Agarose-Gel der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid hinzugefügt. Als Größenstandart wurde der „Generuler“-DNA 1 kb Ladder Mix von Fermentas verwendet. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA erfolgte unter UV-Licht mit Hilfe des E-Box VW2 Geldock von Vilber.

Tab. 25. Pufferzusammensetzung

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
50x Tris-Acetat Puffer	400 mM Tris-Acetat, 10 mM EDTA
5x DNA-Probenpuffer	20 % (w/v) Glycerin, 100 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol

3.3.3 *EXTRAKTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSE-GELEN*

Zur Isolierung der aufgetrennten Nukleinsäurefragmente aus einem Agarosegel wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda=260\text{nm}$) in einer Geldokumentations-anlage (E-Box VW2 Geldock, Fa. Vilber) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „Nukleospin Extract II“-Kits der Firma Machery-Nagel nach Angaben des Herstellers auf gereinigt. Die Aufreinigung beruht dabei auf der Adhäsion der DNA an eine Silicea-Matrix. Änderungen am Protokoll wurden nicht vorgenommen. Für die Elution wurde ein Volumen von 20 μl gewählt. Die Konzentration der DNA wurde anschließend mit Hilfe des Biophotometer Plus Photometers der Firma Eppendorf (Hamburg) bestimmt.

3.3.4 *RESTRIKTION VON PLASMID-DNA UND DNA-FRAGMENTEN*

Die Restriktion von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgt durch Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) in den vom Hersteller

empfohlenen Puffersystemen. Die Enzyme wurden in der Regel in 1.3 Enzym-einheiten (U) pro μg DNA eingesetzt. Für einen analytischen Verdau wurden 0,2-1 μg DNA verwendet, für einen präparativen Verdau 0,5-10 μg DNA. Der Verdau erfolgte für 2-3 h bei einer Temperatur von 37°C. Eine Kontrolle des Verdau erfolgte mittels 1%iger Agarosegele durch DNA-Gelelektrophorese. Anschließend wurden die entsprechenden Fragmente mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel) auf-gereinigt.

3.3.5 DEPHOSPHORYLIERUNG DER 5'-ENDEN

Um die Religation eines Vektors nach einem Restriktionsverdau mit nur einem Enzym zu verhindern werden die 5'-Enden der DNA mittels alkalischer Phosphatase verdaut. Verwendet wurde die Calf Intestine Phosphatase (CIP) (NEB, Schwalbach), nach Angaben des Herstellers.

3.3.6 AUFFÜLLEN DER 5'-ENDEN MIT DER T4-POLYMERASE

Überhängende 5'-Enden von dsDNA, welche bei einem Restriktionsverdau entstehen wurden in dieser Arbeit durch die T4-Polymerase von New England Biolabs (NEB, Schwalbach) zu glatten Enden aufgefüllt. Dies ermöglicht eine Ligation von DNA-Fragmenten, welche durch den Verdau mit unterschiedlichen Enzymen inkompatible Enden aufweisen. Des Weiteren wird so eine Möglichkeit geboten Restriktionsschnittstellen durch auffüllen und Religation zu entfernen.

3.3.7 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Durch eine DNA-Ligation können z.B. durch PCR erzeugte DNA-Fragmente oder durch Restriktion verdaute DNA-Fragmente (Inserts) in entsprechend gleich verdaute Plasmid-Vektoren inseriert werden. Die Ligation zweier DNA Fragmente wurde in dieser Arbeit mit der T4-DNA-Ligase TaKaRa (Molecular Biology, Göttingen) erzielt. Vektor-DNA und Insert-DNA wurden im Verhältnis 1:4 vermengt und mit gleichem Volumen der DNA-Ligase Lösung versetzt. Die Reaktion erfolgte für 30 Min bei RT. Zur Kontrolle der Ligation wurde ein Ansatz ohne Insert-DNA mitgeführt. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente E. coli Zellen transformiert um die Ligationprodukte zu vervielfältigen und

den Erfolg der Ligation zu überprüfen. Eine Selektion der transformierten Zellen erfolgte durch die Selektionsmarker Ampicillin und Kanamycin in Kulturmedium und Festagarplatten. Eine Kontrolle der ligierten Plasmid-DNA erfolgte durch einen analytischen Restriktionsverdau sowie eine analytische PCR bei positiven Resultaten wurde eine Sequenzierung der DNA durch GATC (Konstanz, BRD) oder LGC vorgenommen

3.3.8 OLIGOANNEALING

Neben PCR-, oder Restriktionsprodukten können ebenso synthetisch hergestellte Oligonukleotide als Insert verwendet werden. Bei nicht-phosphorylierten Oligonukleotiden werden zunächst die 5'-Enden der Oligonukleotide mit einer Phosphonukleotidkinase (PNK, NEB) phosphoryliert. Für die Phosphorylierung werden je 1µg der in HPLC-H₂O gelösten Oligonukleotide mit je 1µl PNK-Puffer, 0,5 µl dNTPs und PNK versetzt und auf 10µl mit H₂O bidest aufgefüllt. Die Reaktion erfolgt für 20 min bei 37°C. Für die folgende Hybridisierung (Annealing) wurden beide Phosphorylierungsansätze vereinigt und 2µl 10xNEB Puffer 3 und Aqua bidest ad. 20µl Reaktionsvolumen hinzugefügt. Das Gemisch in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem entsprechend verdauten Vektor.

3.3.9 DNA-ISOLIERUNG AUS ADHÄRENTEN ZELLINIEN

Zur RNA Isolierung aus humanen Zelllinien wurde das High Pure RNA Extraction-Kit der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die verwendete Zellzahl betrug 2-4x10⁶ Zellen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in HPLC-H₂O eluiert und bei -80°C gelagert. Nach der Isolierung wurde eine Analyse der Proben mittels RNA-Gelen vorgenommen und die Proben für die Synthese von cDNA verwendet, oder bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Menge sowie der Reinheit erfolgte mittels Nanodrop (ND-1000) der Firma PeqLab.

3.3.10 RNA-GELE

Für eine Analyse der isolierten RNA wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein 1%iges Agarose-Gel wie folgt erstellt:

- 0,5 g Agarose mit DEPC-H₂O auf 43,8 g auffüllen
- aufkochen und etwas abkühlen lassen
- ml 10x MOPS und 5 µl GelRed zugeben
- 1,25 ml 37% Formaldehyd

Die RNA-Proben wurden in einer Konzentration von 1 µg RNA mit DEPC-H₂O auf 8 µl aufgefüllt und mit 2 µl 5x RNA-PP versetzt. Vor Auftragen wurden die Proben 10 min bei 65°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gehalten. Der Gellauf erfolgte in 1x Laufpuffer (1x MOPS in DEPC-H₂O) bei 120 V.

3.3.11 cDNA-SYNTHESE/ REVERSE TRANSKRIPTION (RT-PCR)

Die Synthese von cDNA aus isolierter RNA wurde mit Hilfe des GoScript Reverse Transcription System-Kit der Firma Promega durchgeführt. Dazu wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die cDNA (complementary DNA) wird bei dieser Methode durch das Enzym Reverse Transkriptase aus der RNA erstellt. Da alle eukaryotischen mRNAs einen Poly-Adenosin-Schwanz besitzen kann ein Oliga-dT-Primer an diese Sequenz binden und die Reverse Transkriptase den zur mRNA komplementären cDNA-Strang synthetisieren. Durch die Verwendung von sogenannten Random-Hexamer-Primern mit zufälliger Zusammensetzung wird des Weiteren garantiert, dass alle mRNAs in DNA umgeschrieben werden können. Die Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers in dem Biometra T Professional Thermocycler. Als Annealing-Temperatur wurden 25 °C gewählt (5 min.). Die Extension erfolgte bei 42 °C (1 Std.) sowie eine abschließende Inaktivierung der Enzyme bei 70 °C (15 min.). Sämtliche RNA-Arbeiten wurden an einem PCR-Arbeitsplatz (PeqLab UV-PCR-Workstation) der Firma PeqLab durchgeführt. cDNA-Reinheit sowie die Konzentration wurden mit Hilfe des Nanodrop Spektralphotometers (ND-1000; PeqLab) bestimmt.

Das aufgeführte Protokoll ist für die Synthese von 5 µg RNA, oder 500 ng poly(A) RNA in cDNA berechnet.

Tab. 26. cDNA-Synthese Reagenzien

Reagenz	Konzentration
Nuclease freies Wasser	ad. 15 µl
GoScript 5x Reaktions Puffer	4.0 µl
MgCl ₂	3 mM
PCR Nucleotide Mix	0.5 mM each dNTP
RNA	1 µg
RNasin Ribonuclease Inhibitor (optional)	20 U
GoScript Reverse Transcriptase	1.0 µl
Primer	Oligo(dT)15 (0.5 µg), random primer (0.5 µg)

Tab. 27. cDNA-Synthese Programm

Synthese-Programm	Temperatur	Dauer
Annealing	25°C	5 min
Extension	42°C	1 h
Inaktivierung	70°C	15 min

3.3.12 qPCR-PRIMERDESIGN UND PRIMEREFFIZIENZBESTIMMUNG

Die Erstellung von Primern für die qPCR erfolgt in silico mit Hilfe der NCBI Datenbank (Primer3-Design Software). Eine weitere Überprüfung der Primer erfolgte durch Primer-Programme der Firmen: GeneScript, Eurofins MWG Operon sowie Invitogen. Als Kriterien für die Primererstellung wurden die folgenden Kriterien festgelegt: Schmelztemperatur: 58-61 °C, G/C-Gehalt: 45-55 %, Primerlänge: 19-21 bp, self-complementary max. 3, Überschneidung von Exon-Exon-Grenzen, Vermeidung von sich wiederholenden Nukleotidsequenzen, Berechnung nach Schildkraut und Lifson (Schildkraut 1965) und Thermodynamische Parameter entsprechend Berslauer et. al (1986), Ampliconlänge: 75-300 bp. Sämtliche Primer wurden von der Firma MWG Operon (Ebersbeg) bezogen. Myosin1F-Primer-Nr.7 wurde hingegen von Quiagen bezogen.

Eine Primereffizienzbestimmung wurde unter Verwendung eines cDNA-Pool (Zelllinien: 293T, J774, HeLa, SW480, A431) durchgeführt. Es wurden jeweils dreifach-

Bestimmungen mit 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 und 50 ng cDNA durchgeführt. Die Primereffizienz wurde anschließend mit Hilfe von Excel durch Berechnung der Steigung durch Verwendung der Formel: $10^{(-1/\text{steigung})}$ ermittelt. Zu diesem Zweck wurde der Logarithmus der Templatekonzentration (X-Axe) gegen den mittleren CT-Wert (Y-Axe) aufgetragen.

3.3.13 QUANTITATIVE-PCR (qPCR)

Eine Bestimmung der Myosin1F und Taspase1-Transkriptmenge erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fast SYBR-Green-Master Mix der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) in einem LightCycler der Firma AppliedBiosystems.

Tab. 28. qPCR-Reagenzien

Reagenz	Vol.
LightCycler®FastStartDNAMasterSYBRGreen	2µl
Primer	1µl
cDNA	2µl
H2O	15µl

SYBR-Green ist ein Farbstoff, welcher unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. Eine Analyse der Schmelzkurve der PCR-Produkte nach der PCR gibt somit Aufschluss über die spezifische Amplifikation eines DNA-Fragments. Mehrere Peaks der Schmelzkurve deuten dabei auf die Amplifikation verschiedener Fragmente während der PCR hin, was die Daten für weitere Analysen unbrauchbar macht. Schmelztemperaturen von unter 70°C deuten auf die Bildung von Primer-dimeren hin. Eine ideale Amplifikationskurve zeigt sigmoidalen Verlauf. Schwellenwert-Grenzen werden dann in den linearen Bereich der sigmoidalen Kurve gesetzt und für jede Analyse gleich behalten. Mit Hilfe der Gerätesoftware wird für jede Probe die Zyklenzahl berechnet, welche zum Erreichen des Schwellenwertes benötigt wurde (=CT-Wert, threshold cycle). Je geringer der CT-Wert, desto mehr cDNA ist in der Probe enthalten. Die Expression von Taspase und Myosin1F wurde im Vergleich zu den Haushaltsgenen Aktin und GAPDH bestimmt. Das Expressions-Verhältnis errechnete sich aus folgender Formel: Expressionsverhältnis

$=2^{-(DCT\ GAPDH - DCT\ Taspase1)}$. Die Formel ergibt sich aus der PCR Effizienz ($E=2$) und der Differenz der Schnittpunkte (CT) der unbekannt Probe, versus einer Kontrolle im Vergleich zu einem Referenzgen.

Die PCR wurde wie unten beschrieben durchgeführt. Die Messung der kumulativen Fluoreszenz erfolgte am Ende eines Zyklus. Als Polymerase wurde die AmpliTaq® Fast DNA Polymerase (Ultra Pure) verwendet. Die Real-Time-PCR erfolgte unter den folgenden Konditionen:

Tab. 29. qPCR-Programm

Synthese-Programm	Temperatur	Dauer (s)	Zyklen
Hot-Start	95	20	
Denaturierung	95	3	
Annealing und Elongation	60	30	40
Enzymaktivierung	95	20	hold

Nach Durchführung des qPCR-Programms wurde ein Schmelzkuchenprofil erstellt. Dieses erfolgte nach folgendem Schema: 15 sek. 95 °C, 1 min. 60-95°C (0,3 °C Steigerung/5 Sek.), Abkühlen der Proben für 10 min bei 10 °C. Die Datenanalyse erfolgte mit dem SetpOne™ software v2.1. Programm der Firma Applied-Biosystems.

3.4 BIOCHEMISCHE METHODEN / PROTEINE

3.4.1 HERSTELLUNG VON ZELLEXTRAKTEN

Zur Herstellung von Gesamt-Zellextrakten und zur Isolation von Proteinen aus einer Zellsuspension wurde ein chemischer Zellaufschluss durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die konfluenten Zellen einer 10cm Kulturschale zunächst durch Trypsin, oder mittels Zellschaber abgelöst und anschließend mit PBS gewaschen und geerntet. Das Zellpellet wurde entsprechend der Zellmenge in 80-150 µl RIPS-Puffer resuspendiert und für einen vollständigen Aufschluss dreimal 20-30 Sekunden bei 100% mit dem Sonopuls der Firma Bandelin sonifiziert. Das im RIPA-Puffer vorhandene EDTA dient dabei als Komplexbildner und führt zur Permeabilisierung der Zellmembran. Detergenzien wie

Natrium-deoxycholat und Np-40 unterstützen die Solubilisierung der Membranproteine. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Lysate auf Eis wurde die Suspension durch Zentrifugation (14000rpm, 20 min., 4°C) in zytosolische und membranen sowie unlösliche Zellbestandteile getrennt. So konnte die pelletierte Membranfraktion (P= zelluläre Membranpräparation) von den im Überstand (Ü= lösliche Proteine) befindlichen löslichen Proteinen getrennt werden. Der Überstand, welcher die löslichen Proteine enthält wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und das verbleibende Zellpellet in 10-20 µl Lyse-Puffer gelöst. Das Pellet wurde durch sonifizieren in dem entsprechenden Lyse-Puffer gelöst. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay (BioRad). Eine Lagerung der Proben erfolgte nach Schockgefrieren in Flüssigem Stickstoff bei -80°C.

Tab. 30. Zusammensetzung der verwendeten RIPA-Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Np-40, 1 % (v/v) Natrium-deoxycholat, 1 mM DTT, 1 x Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), 1 mM PMSF, bei -20 °C gelagert
modifizierter RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Natrium-deoxycholat, 1 % Triton-X-100, 1 x Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), bei -20 °C gelagert
Puffer2 für Taspase1-Lysate	20 mM Tris pH 7,4, 280 mM NaCl, 0,5 % Triton-X-100, 1 x Protease-Inhibitor Cocktail (Roche), bei -20 °C gelagert

3.4.2 SDS-PAGE (NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlichem Polyacrylamidgelsystem nach Laemmli (Laemmli *et al.* 1970). Für die Auftrennung wurden 7,5-15 %ige SDS-Gele in einfach konzentriertem SDS-Laufpuffer in Elektrophorese-Kammern der Firma BioRad verwendet. Die Polyacrylamidkonzentration des SDS-Gels bedingt dabei die Porengröße des Gels und wird in Abhängigkeit der Proteingröße gewählt. Die Proteinproben wurden vor Gellauf mit 5x konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 95°C denaturiert. Für eine

Molekularmassenbestimmung wurden die Proteingemische Prestained Protein Marker, Broad Range (NEB), PageRulerTMPlus Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Proteinproben wurden in Konzentrationen von 20-50 µg aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 Volt und konstanter Stromstärke. Die Bindung des negativ geladenen Detergenz SDS (Natriumdode-cylsulfat) an die Proteine erwirkt dabei eine einheitliche Ladung der Proteine, welche eine Auftrennung entsprechend der Größe ermöglicht.

Eine Visualisierung der aufgetrennten Proteine erfolgte im Anschluss durch Coomassiefärbung nach Llyod (Lloyd 1996) oder Antikörperdetektion nach Westernblotting.

Tab. 31. Zusammensetzung der SDS-Gele

Trenngel	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	Sammelgel (4 %)
Aqua bidest.	2,4 ml	2,0 ml	1,6 ml	1,2 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	1,35 ml
Acrylamid	1,2 ml	1,6 ml	2,1 ml	2,5 ml	0,65 ml
APS	50 µl				
TEMED	5 µl				

Tab. 32. Zusammensetzung der zur SDS-Gelelektrophorese verwendeten Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acrylamid/Bisacrylamid	30 % (w/v)/ 0,8 % (w/v)
APS	10 % (w/v) in H ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,9, 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (5x)	5 mM EDTA, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 7,5 % (v/v),β-Mercaptoethanol, 15 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycerol, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

3.4.3 COOMASSIEFÄRBUNG VON SDS-GELEN

Um die auf einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine visualisieren zu können, können diese mittels spezieller Proteinfarbstoffe (wie z.B.: Coomassie-Brillantblau) angefärbt werden. Coomassie-Brillant-Blau ist ein Triphenylfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Proteine lagert und damit zu ihrer Anfärbung führt. Die Anfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant-Blau erfolgte nach Llyod (Lloyd 1996). Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele 30 min in Färbelösung inkubiert. Anschließend werden die Gele in Entfärbelösung gewaschen bis überschüssiges Coomassie aus dem Gel entfernt war.

Tab. 33. Zusammensetzung der Coomassiefärbelösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Entfärbelösung	200ml Methanol, 70ml Eisessig ad 1l H ₂ O
Coomassie Lösung	0,08% Coomassie G250, 1,6% Phosphorsäure, 8% Ammoniumsulfat, 20 % Methanol
Protein-Molekulargewichtsmarker	NEB (Schwalbach), PeqLab (Erlangen), Fermentas (St. Leon-Rot)

3.4.4 WESTERNBLOT/IMMUNOBLOT

Die mittels SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (Laemmli, Molbert *et al.* 1970) aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulose-Membranen oder PVDF-Membranen nach der Methode von Towbin (Towbin *et al.* 1979) transferiert. Dazu wurden Trans-Blot-Zellen der Fa. Biorad Laboratories, oder Peqlab eingesetzt. Vor dem Transfervorgang wurden PVDF-Membranen mit 100% Ethanol aktiviert und in Transblotpuffer äquilibriert. Der Transfervorgang erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer (Dunn 1986)) für 90 min, bei einer Stromstärke von 400 mA.

Nach dem Transfer wurden freie Bindestellen auf der Membran mittels Blockierlösung abgesättigt. Im Folgenden fand eine Detektion der Proteine mittels Antikörperfärbung statt.

Tab. 34. Zusammensetzung der Westen-Blot-Reagenzien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transferpuffer (1x)	25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol
Blockierungspuffer/ Inkubationspuffer für Antikörper	5% Magermilchpulver, PBS, 0,001% NaN ₃
Waschpuffer	0,1% Tween, PBS
ECL- bzw. ECLplus	Kit Amersham Pharmacia, Freiburg

3.4.5 IMMUNODETEKTION VON WESTER-BLOTS MITTELS ECL-SYSTEM

Mit Hilfe spezifischer Antikörper ist es möglich eine Identifizierung von Proteinen in einem Proteingemisch vorzunehmen. Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu unterbinden wird zunächst eine Absättigung der Membran mit Blockierlösung vorgenommen. Die Behandlung mit Erstantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran gewaschen und für eine Stunde mit Zweit-antikörperlösung inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran erfolgte die Detektion der HRP-Aktivität mit dem ECL- bzw. ECLplus Kit (Amersham Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers.

3.4.6 IMMUNODETEKTION VON WESTER-BLOTS MITTELS ODYSSEY-SYSTEM

Die Detektion von Membranen mittels Odyssey erfolgte ähnlich der Detektion mittels ECL Lösung. Anders jedoch als bei der ECL-Detektion wurden die Membranen in 5% Milchpulver in TBS blockiert und d- α -rabbit IR800 und d- α -mouse IR700 zusammen 1:20000 in 5% MP/TBST 1h bei RT.

3.4.7 ENTFERNEN VON AN MEMBRANEN GEBUNDENEN ANTIKÖRPERN

Membranen, welche bereits durch einen Antikörper analysiert wurden konnten durch das sogenannte „strippen“ von dem Gebundenen Antikörper bereinigt werden und für weitere Analysen verwendet werden. Dazu wurde die Re-Blot Plus Lösung (ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution, 10x Millipore, Schwalbach, Millipore, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Verwendung wurde die Membran mit

Waschpuffer gewaschen und erneut in Blockierlösung inkubiert, ehe eine Inkubation mit weiteren Erstatikörpern erfolgen konnte.

3.4.8 *HETEROLOGE EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN E. COLI*

Zur heterologen Expression von Proteinen wurde der pGEX-Vektor verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sequenz des zu exprimierenden Proteins in den pGEX-Vektor kloniert. Nach Transformation des DNA-Konstrukts in kompetente *E. coli* Zellen des Stamms BL21 (DE) wurden diese über Nacht in 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker angezogen. Anschließend wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Bei Erreichen der OD₆₀₀ wurde durch Zugabe von 0,2 mM IPTG (Isopropyl β-D-thioga-lactopyranosid) der Lac-Promotor initiiert und dadurch eine Proteinüberexpression induziert. Die Proteinsynthese wurde 16 h bei 18° durchgeführt, ehe die Zellen geerntet wurden. Zum Ernten der Zellen wurden die Kulturen 10 Min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit PBS gewaschen. Die Lagerung der Zellpellets bis zur Bakterienlyse erfolgt bei -20°C.

3.4.9 *AUFREINIGUNG VON HETEROLOG EXPRIMIERTEN GST-FUSIONSPROTEINEN*

Das Bakterien-Pellet wurde in 10 ml kaltem PBS-Puffer mit DNaseI (Endkonzentration: 100 µg/ml) resuspendiert. Nach Zugabe von 26 µl MnCl₂ (1 M), 260 µl MgCl₂ (1 M) sowie 50 µg/ml Lysozym folgte eine Inkubation auf Eis für 15 min. Anschließend wurde die Suspension 4 x 20 s bei 100 % mit dem Sonopuls der Firma Bandelin sonifiziert. Dann wurden 1 ml 5 M NaCl und 500 µl 20 % Triton-X-100 zugegeben und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (3900 g, 45 min, 4 °C) entfernt. Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (GE Healthcare), an die der GST-Anteil des rekombinanten Proteins binden kann. Der Überstand wurde mit 300 µl Glutathion-Sepharose gemischt und für 1-2 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-Partikel einmal mit 10 ml PBS/1 % Triton-X-100 und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen (430 g, 5 min, 4 °C). Das an die

Glutathion-Sepharose gebundene rekombinante GST-Fusionsprotein wurde dann in 3 ml PBS resuspendiert und in eine Poly-Prep-Säule (BioRad) überführt. Nachdem sämtliche Flüssigkeit abgeflossen war, wurde die Säule unten verschlossen. Für die Elution des GST-Fusionsproteins von der Glutathion-Sepharose wurde 1 ml des frisch hergestellten Elutionspuffers auf die Säule gegeben, unter Schütteln 10-20 min inkubiert und dann das Eluat aufgefangen. Das eluierte Protein wurde über Nacht bei 4 °C gegen PBS in Slide-A-Lyzer 10K Kassetten (Pierce/Perbio) dialysiert. Die Lagerung des rekombinanten Proteins erfolgte aliquotiert nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe eines Bradford-Assays.

3.4.10 MIKROINJEKTION

Um gezielt Proteine in den Zellkern, oder das Zytoplasma von adhärenenten Zellen einbringen zu können wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Mikroinjektion durch-geführt. Die gezielte Einbringung der Proteine in Zellkern, oder Zytoplasma ermöglicht unter anderem die eingebrachten Proteine hinsichtlich vorhandener Kern-Import (NLS), oder Kern-Exportsignale (NES) zu analysieren (Rosorius *et al.* 1999). Aufgrund eines großen Zytoplasmas, gut sichtbarer Zellkerne und einer starken Adhärenz wurden zu diesem Zweck Vero-Zellen verwendet. Die Proteine werden zur Entfernung von Aggregaten und Verunreinigungen vor Injektion ab zentrifugiert (4°C, 1400rpm, 30 min.) und anschließend in Konzentrationen von 2-5 µg/µl in die Zelle injiziert. Die Injektions-Kapillaren wurden mit dem Mikropipetten-Puller der Firma Sutter Instrument gezogen und mit 5-8 µl Proteinlösung befüllt. Dauer und Druck der Injektion werden durch den Femto Jet AIS2 von Eppendorf geregelt.

3.4.11 IMMUNPRÄZIPITATION (IP) VON PROTEINEN ZUM NACHWEIS VON INTERAKTIONEN

Zum Nachweis möglicher Interaktionen zwischen zwei Proteinen wurden 293T-Zellen mit einem GFP- oder Myc-markierten Plasmid transfiziert und nach 24 h Expression mit IP-Interaktionspuffer lysiert. Anschließend wurde eine als Input-bezeichnete Probe des Zellysats genommen. Das Zellysats wurde entsprechend dem Tag mit GFP-, oder Myc-

Antikörper gekoppelten Beads der Firma MACS Milteny inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 30-60 Min bei RT. Nach Inkubation wurden die Beads in μ -Säulen im μ MACS-Magneten platziert. Eine Äquilibrierung der Beads erfolgte zuvor mit Lysepuffer. Nach Durchlauf der Lysate wurde die Säule drei Mal mit IP-Lysepuffer und einfach mit Waschpuffer 2 der MACS-Kits gewaschen. Nach vollständigem Abtropfen wurden pro Säule 20 μ l 95 °C heißen Elutions-Puffer aufgetragen und dieser 5 min inkubiert. Die vollständige Elution erfolgte mit weiteren 50 μ l 95 °C heißem Elutions-Puffer. Eine Analyse der Proben erfolgte im Anschluss mittels SDS-Gelelektrophorese.

Tab. 35. Zusammensetzung des IP-Puffer

IP-Interaktionspuffer	
Tris pH 8	50mM
NaCl	150mM
EDTA	5mM
NP-40	0,5%
DTT	1mM
PMSF	1mM
Protease-Inhibitor-Cocktail	

3.4.12 CLEAVAGE ASSAY

Um eine mögliche Spaltung des Myosin1F durch Taspase1 nachweisen zu können wurde ein sogenannter cleavage-Assay durchgeführt. Für diesen wurden 293T Zellen mit einem Myc-Myosin1F-GFP Konstrukt transfiziert und nach 24 h mit IP-Interaktionspuffer lysiert. Es folgte eine Bindung des Proteins wie in 3.5.9 beschrieben an mit GFP-, oder Myc-Antikörper gekoppelten Beads der Firma MACS Milteny. Nach Inkubation wurden die Beads in μ -Säulen im μ MACS-Magneten platziert und einfach mit IP-Interaktionspuffer gewaschen. In Abhängigkeit des Versuchs erfolgte eine Zugabe von zuvor erstelltem Taspase-Lysat, oder aufgereinigter Taspase1. Die Inkubation erfolgte zwischen 30-90 Min. Der Durchlauf wurde aufgefangen und als „D+Tasp“ bezeichnet. Die Beads wurden zweimal mit IP-Puffer gewaschen (Waschschritt) und in folgenden mit Elutionspuffer eluiert. Eine Analyse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot.

3.4.13 *TASPASE1-BIOSENSOR ASSAY*

Zur Analyse einer möglichen Spaltung potenzieller Taspase1-Zielgene wurde ein sogenanntes Sensor-Plasmidkonstrukt in die entsprechende Zelllinie transfiziert. Dieses Konstrukt (pc3-Sensor) codiert für ein Fusionsprotein aus SV40NLS- und NES, einem GFP- sowie einem GST-Tag sowie der Sequenz der entsprechenden Taspase1-Schnittstelle. Mit Hilfe des NES und dem NLS ist das Fusionsprotein in der Lage zwischen Zellkern und Zytoplasma zu shuttle. Der GFP-Tag dient der Visualisierung des Konstrukts und des GST-Tags verhindert die passive Diffusion des Fusionskonstruktes in den Kern. Das ungeschnittene Konstrukt liegt aufgrund des NES im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Kommt es zur Spaltung, so wird das NES entfernt und aufgrund des verbleibenden NLS erfolgt eine Lokalisierung des verbleibenden Konstruktes (inkl. GFP-Tag) in den Kern. Die Spaltung des Sensors kann somit durch Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Fluoreszenz nachvollzogen werden.

3.4.14 *ANALYSE DER ZELLADHÄSION*

Für die Untersuchung der Zelladhäsion unter dem Einfluss von verschiedenen Myosin-Konstrukten wurden die Zellen nach aussat mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert. Nach Expression wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und erneut ausgesät. Die folgende Adhäsion der Zellen wurde mittels Konfokalmikroskopie dokumentiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 FUNKTIONALITÄT DER IM MYOSIN1F-PROTEIN VORHANDENEN TASPASE1-SCHNITTSTELLE

Durch die *in silico* Analyse von Bier *et al.* wurde Myosin1F als potenzielles Zielprotein der Taspase1 identifiziert. Um die Enzym-Schnittstelle im Myosin1F zu verifizieren, wurde der Sequenzteil, der die potenzielle Taspase1-Schnittstelle enthält, in den Taspase1-Biosensor integriert. Das Prinzip des Sensor-Systems beruht auf der Lokalisationsänderung des Sensors in Folge der Spaltung durch Taspase1. Der Sensor besteht aus einer Kombination von GST, GFP, einem Kernimport-Signal (NLS) und einem Myc-Epitop-gekoppelten Kernexport-Signal (NES) sowie der putativen Taspase1-Schnittstelle des Myosin1F-Proteins (Abb. 12 A). Aufgrund des NES ist der autofluoreszierende Biosensor im ungeschnitten Zustand hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 12 A, oben). Koexprimierte Taspase1 führt zu der proteolytischen Abspaltung des Myc-NESRev und der damit verbundenen Akkumulation des Sensors im Kern (Abb. 12 A, unten). Eine Untersuchung der Konstrukte in Hela- und 293t-Zellen zeigt, dass die rote Fluoreszenz des Sensors ohne Einfluss von Taspase1 bei beiden Zelllinien im Zytoplasma detektierbar ist (Abb. 12 B). Die Taspase1-Kotransfektion führt zur Akkumulation des Sensors im Zellkern, während die Kotransfektion der katalytisch nicht aktiven Taspase1-Mutante (TaspTV) weiterhin die zytoplasmatische Lokalisation des Sensors zeigt. Die TaspTV weist eine Mutation in der Sequenz ihrer Schnittstelle auf, die die katalytische Aktivität unterbindet. Folglich übt die TaspTV-BFP, verglichen mit der wt-Taspase1, keinen Einfluss auf die Lokalisation des Sensors aus.

Die statistische Auswertung der Lokalisation des Sensor-Systems (Abb. 12 C) zeigt den deutlichen Lokalisationsunterschied des Sensors zwischen 293T- und Hela-Zellen, ohne Taspase1-Kotransfektion. In Hela-Zellen lokalisiert deutlich mehr Zellen mit Fluoreszenz des Sensors im Kern sowie gleich verteilt zwischen Kern und Zytoplasma. Daraus resultiert der entsprechend geringerer Prozentsatz von Hela-Zellen mit rein zytoplasmatischer Sensor-Lokalisation verglichen mit 293T-Zellen. Diese weisen ohne Taspase1-Koexpression mehr als 70% des Sensors im Zytoplasma auf. Die Kernlokalisation konnte für weniger als 10% festgestellt werden.

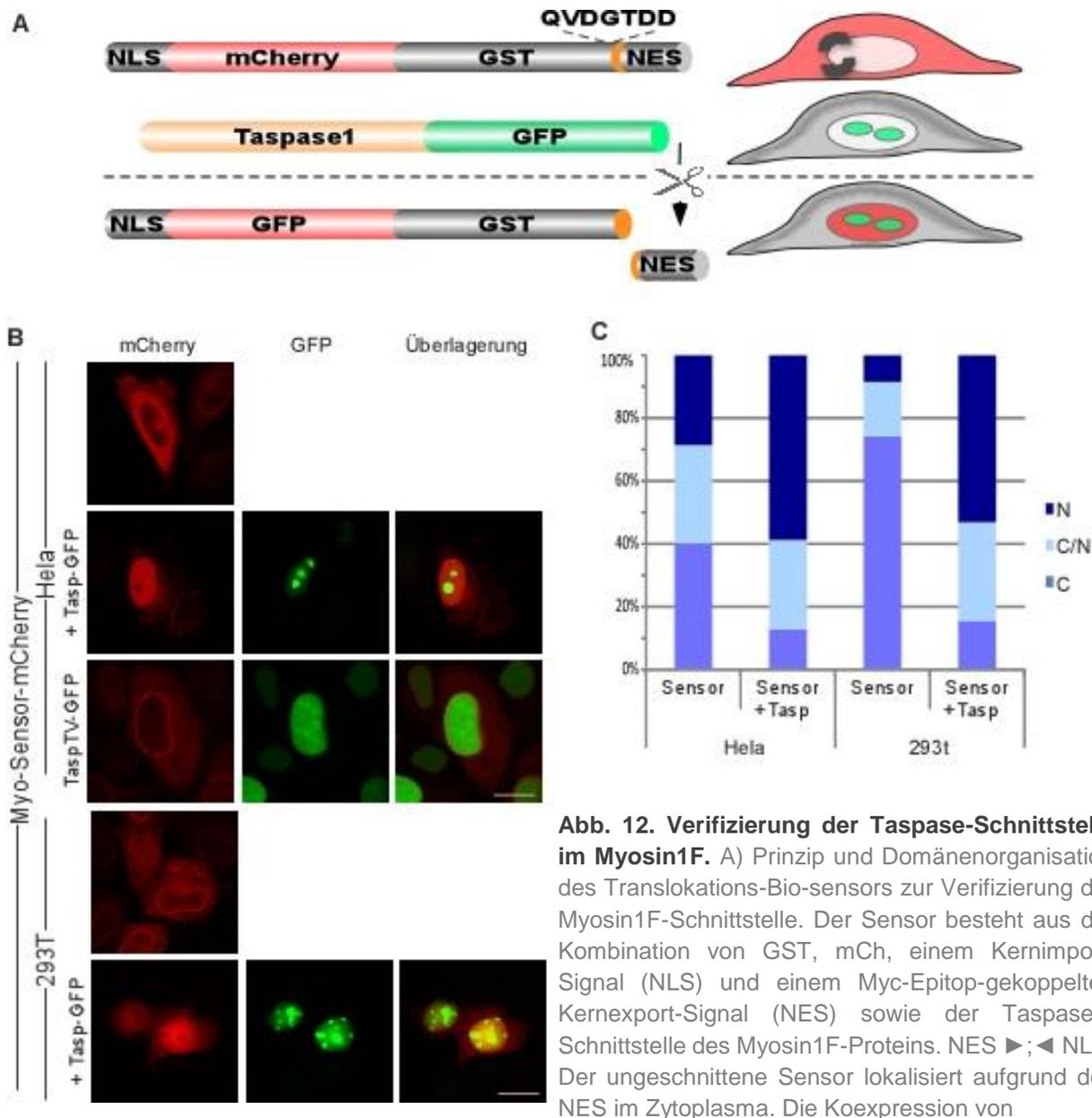


Abb. 12. Verifizierung der Taspase-Schnittstelle im Myosin1F. A) Prinzip und Domänenorganisation des Translokations-Bio-sensors zur Verifizierung der Myosin1F-Schnittstelle. Der Sensor besteht aus der Kombination von GST, mCh, einem Kernimport-Signal (NLS) und einem Myc-Epitop-gekoppelten Kernexport-Signal (NES) sowie der Taspase1-Schnittstelle des Myosin1F-Proteins. NES ▶; ◀ NLS. Der ungeschnittene Sensor lokalisiert aufgrund des NES im Zytoplasma. Die Koexpression von

Taspase1 führt zur Abspaltung des NES und der daraus resultierenden Lokalisation des Sensors im Zellkern. B) Expression des -Sensors mit der Sequenz der Myosin1F-Taspase1-Schnittstelle ohne Taspase1, mit Taspase1 (+Tasp) und der inaktiven Taspase1-Mutante (+TaspTV) in HeLa- und 293T-Zellen. Die erste Spalte zeigt die Fluoreszenz des mCh-markierten Myo-Sensors, die mittlere Spalte die Fluoreszenz der GFP getaggeten Taspase1. Eine Koexpression von Taspase1 führt zur Akkumulation des geschnittenen Sensors im Kern der Zelle. Weitere Erläuterungen siehe Text. Maßstabsbalken: 20µm. C) Effizienz der Sensor-Prozessierung in vivo. HeLa-Zellen und 293T-Zellen wurden mit dem Sensor und Tasp-BFP Expressions-Plasmid transfiziert und 24h später die Zahl an Zellen mit einer zytoplasmatischen (C), zytoplasmatischen und nukleären (N/C) oder rein nukleären (N) Biosensor-Lokalisation bestimmt. HeLa-Zellen und 293T-Zellen weisen unterschiedliche Verhältnisse der Lokalisation des Sensors auf. 293T-Zellen zeigen ohne die Koexpression von Taspase1 einen höheren Anteil roter Fluoreszenz im Zellkern als HeLa-Zellen. Diese Unterschiede sind bei Taspase1-Koexpression nicht mehr erkennbar. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Koexpression von Taspase1 führt in beiden Zelllinien zu der um mehr als das doppelte erhöhten Zellzahl mit nukleärer Lokalisation des Sensors. Beide Zelllinien weisen deutlich geringere Mengen von Zellen mit rein zytoplasmatisch lokalisiertem Sensor auf, verglichen mit den entsprechenden Zellen ohne Taspase1-Koexpression. Die Taspase1-Koexpression führt zu der nahezu identischen Verteilung des Sensors in 293T- und Hela-Zellen.

Für die Verifikation der Taspase1-Schnittstelle des Myosin1F im Sensor-Kontext wurde die Spaltung des Myosin1F-Sensors durch Taspase1 im Westernblot nachgewiesen. Der Myo-Sensor wurde zur Kontrolle im Vergleich mit dem MLL-Sensor getestet, der die zweite Taspase1-Schnittstelle des MLL-Proteins trägt und von dem die Spaltung im Westernblot bereits durch C. Bier gezeigt wurde.

Für die Untersuchung wurden 293t-Zellen mit den Sensoren, Taspase1-mCh sowie der Kombination aus einem Sensor und Taspase1-mCh transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit modifiziertem RIPA-Puffer lysiert. Die Taspase1-Expression wurde mit Taspase1-Antikörper nachgewiesen, Expression und Spaltung des Sensors mit GST- und einem GFP-Antikörper. Die mit mCherry (mCh) markierte Volllänge-Taspase1 und die durch Autoproteolyse entstandene α -Untereinheit konnten bei einem Molekulargewicht von ca. 77 kDa und 28 kDa nachgewiesen werden (Abb. 13 A, Spur 4, 5 und 6). Der Sensor mit der MLL-Schnittstelle ist ohne Taspase1-Koexpression (Abb. 13 A, Spur 2, zweiter Teil) vorwiegend auf Höhe von ca. 58 kDa detektierbar, allerdings erscheint auch in dieser Spur die Bande auf Höhe von 53 kDa, die dem Molekulargewicht des geschnittenen Sensors entspricht. Die Intensität der Bande nimmt bei Kotransfektion mit Tasp-mCh (Spur 5) zu, kann also folglich durch endogene Taspase1 in Hela-Zellen bedingt sein. Es taucht hier eine schwache Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa auf, die nicht zugeordnet werden kann. Für die Detektion des Myosin1F-Sensors sind die entsprechenden Banden nur schwach erkennbar. Der ungeschnittene Sensor besitzt ein Molekulargewicht von ca. 71 kDa, der geschnittene Sensor eins von ca. 66 kDa (dritter Teil von oben Spur 3 und 6). Nach der Analyse der Zelllysate durch Westernblot konnte gezeigt werden, dass Taspase1 beide Sensoren spaltet. Die Spaltprodukte konnten sowohl mit als auch ohne Taspase1-Koexpression detektiert werden, was

möglicherweise auf den Einfluss endogener Taspase1 hindeutet. Einen Unterschied zwischen Hela- und 293T-Zellen wurde nicht erkannt (Daten nicht gezeigt).

In folge von Modifikation der Puffersysteme und der Blotbedingungen konnte die Spaltung des Myosin1F-Sensors eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 13 B). Die Bande des ungeschnittenen Sensors (71 kDa) in allen drei Spuren mit GFP-Antikörper detektierbar. Die Bande des geschnittenen Sensors (66 kDa) ist jedoch nur bei Koexpression von aktiver Taspase1 deutlich nachweisbar.

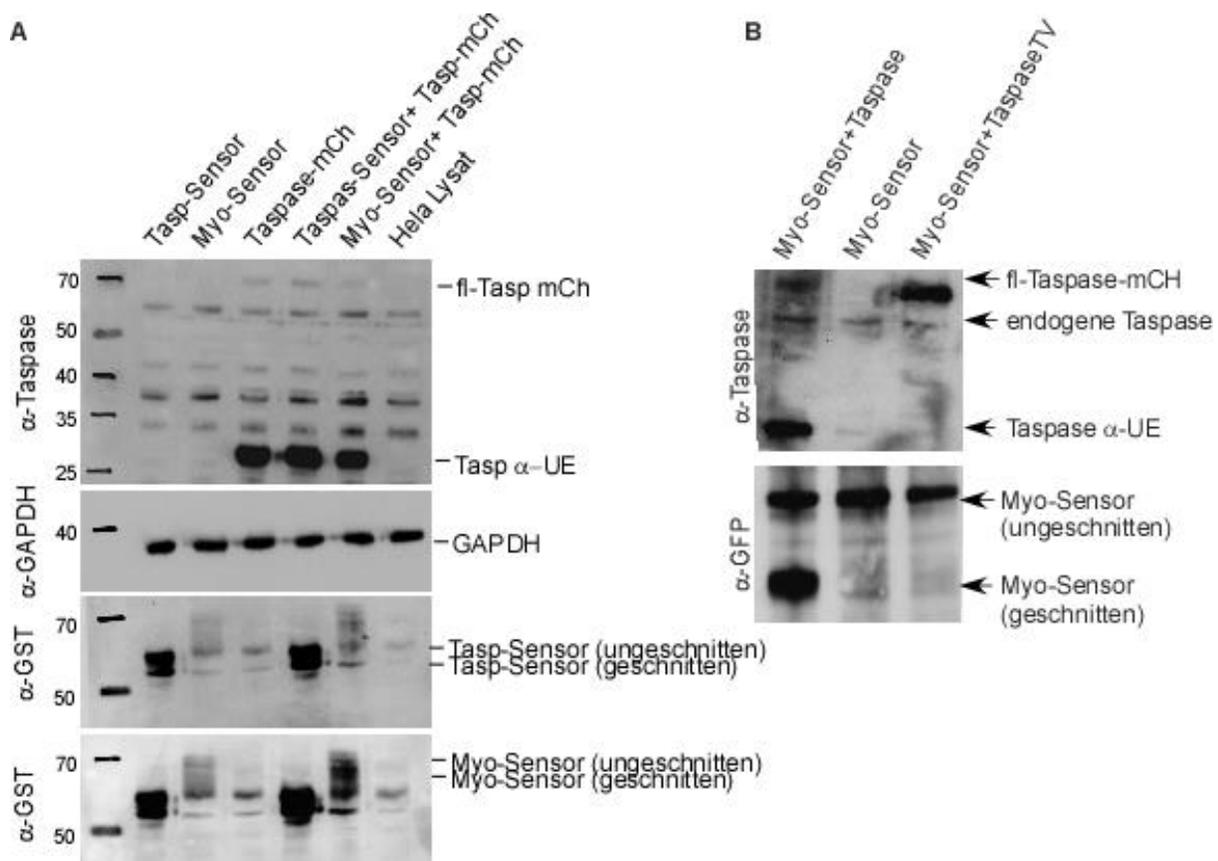


Abb. 13. Analyse der Myosin1F-Sensor-Spaltung mittels Westernblot von Gesamtzelllysaten. A) 293T-Zellen wurden mit den Taspase1-Sensoren zusammen mit den angegebenen Taspase1-Expressionsplasmiden oder leerem Vektor (Kontrolle) transfiziert. Von beiden Sensoren sind mit und ohne Taspase1-Koexpression sowohl die Volllängen-Konstrukte als auch die Spaltprodukte detektierbar. Die Taspase1-Expression wurde mit Taspase1-Antikörper nachgewiesen. Die Expression und Spaltung der Sensoren wurden mit GST-Antikörper detektiert. Es wurden je 40 μ g der verschiedenen Zelllysate aufgetragen. Untransfiziertes Hela-Lysat diente zur Kontrolle der Antikörper-Spezifität. GAPDH diente als Ladekontrolle. Tasp mCh fl: 78 kDa, Tasp mCh α UE: 28 kDa, Tasp-Sensor ungeschnitten: 58 kDa, Tasp-Sensor geschnitten: 53 kDa, Myosin1F-Sensor ungeschnitten: 72 kDa, Myosin1F-Sensor geschnitten: 66 kDa B) Der Myosin1F-Sensor wird durch die koexprimierte Taspase1 geschnitten. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.2 Etablierung und Evaluierung einer RT-PCR zur quantitativen Analyse der Genexpression von Myosin1F und Taspase1 in soliden Tumorzelllinien und Immunzellen

4.2.1 PRIMERDESIGN UND PRIMEREFFIZIENZBESTIMMUNG

Für die Analyse der Taspase1 und ihrem Zielprotein Myosin1F wurde die Untersuchung der endogenen mRNA-Menge in verschiedenen Zelllinien mit Hilfe der qPCR-Methode vorgenommen. Mit Hilfe des NCBI-Primer-Programms wurden verschiedene qPCR-Primer erstellt und hinsichtlich ihrer Effizienz geprüft.

Für die Analyse der RNA-Menge wurde RNA aus Hela-, 293T-, SW480-, A431- sowie J774-Zellen isoliert. Qualität, Reinheit und Konzentration wurden durch RNA-Gelanalyse und Spektralphotometer bestimmt und gewährleistet (Daten nicht gezeigt). Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese unter Verwendung des cDNA-Synthese-Kits (Promega). Auch in diesem Fall wurden Reinheit und Konzentration durch Verwendung eines Spektralphotometers sowie qPCR gewährleistet (Daten nicht gezeigt/ siehe Anhang).

Nach Gewinnung der cDNA aus jeweils 3 verschiedenen Zellpopulationen von Hela-, 293T-, SW480-, A431- und J774-Zellen je 8 Primerpaare für die Amplifikation des Taspase1-Gens sowie die des Myosin1F-Gens hinsichtlich ihrer Effizienz untersucht. Die Amplifikationseffizienz E einer Probe wurde durch den Einsatz einer Verdünnungsreihe der Proben in dem LightCycler geprüft. Anschließend wurde eine Regressionsgerade erstellt, über deren Steigung die Primer-Effizienz berechnet wurde. Die Amplifikationseffizienz wurde aus der Steigung m der Regressionsgeraden nach der Formel: $E = 10^{-1/m}$ errechnet. Eine optimale Amplifikationseffizienz entspricht dem Wert $E=2$, was einer Verdopplung der cDNA in jedem PCR-Zyklus entspricht. Nach Auswertung der Effizienzwerte (Daten nicht gezeigt) wurden die Primer Tasp6 und Myosin1F-Quigen aufgrund der als am besten erachteten Amplifikationswerte für die Genexpressionsanalysen der ausgewählt (Daten siehe Anhang). Für das Primerpaar zur Analyse des Myosin1F wurde der Effizienzwert von $E=2,6$ ermittelt. Dieser Wert lässt sich nach Analyse der Schmelzkurven auf die Bildung von Primerdimeren und unspezifische Amplifikation zurückführen. Trotz zahlreicher Modifikationsversuche und Analyse diverser Primerpaare konnten durch keines der getesteten Primerpaare bessere Ergebnisse erzielt

werden (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigen die Analysen der Schmelzkurven, dass mit dem ausgewählten Primerpaar eine spezifische Amplifikation des Myosin1F-Gens erfolgt.

4.2.2 ÜBERPRÜFUNG DER RNA-EXPRESSION VON MYOIN1F UND TASPASE1

Die Untersuchung der RNA-Expression wurde als vergleichende Analyse vorgenommen. Es erfolgte zunächst der relative Vergleich der RNA-Mengen in 293T-, SW480-, A431- und J774-Zellen zu der mRNA-Expression in Hela-Zellen. Auf diese Art ist es möglich, die RNA-Expressionsstärke zwischen den Zelllinien zu vergleichen. Die Auftragung der RNA-Expressionsstärke in 293T-, SW480-, A431- und J774-Zellen im Vergleich zu Hela-Zellen (Abb. 14) zeigt, dass die adhärenenten Zelllinien (Hela, 293T, SW480, A431) eine bis zu 30-fach höhere Menge an Taspase1 aufweisen im Vergleich zu den Suspensionszellen (J774). Ein Vergleich der Tumor- mit den Nicht-Tumorzellen zeigt die stärkste Taspase1-mRNA-Expression in 293T-Zellen sowie die erhöhte mRNA-Menge in den Tumorzellen im Vergleich zu der schwachen Expression in J774-Zellen.

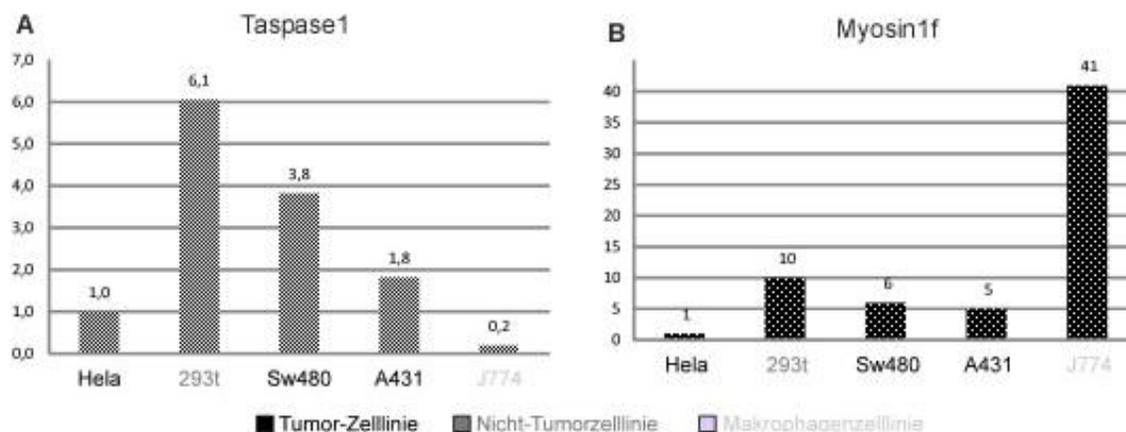


Abb. 14. Die mRNA Expression von Myosin1F ist in J774-Zellen deutlich höher als in anderen Zelllinien. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression von Taspase1 (A) und Myosin1F (B) in Hela-, 293T-, SW480-, A431- und J774-Zellen normalisiert auf die Expression in Hela-Zellen. In Hela-, 293T-, SW480- und A431-Zellen korrelieren die Myosin1F Expression mit der Expression von Taspase1, während in J774-Zellen eine hohe Myosin1F Expression vorliegt und eine geringe Taspase1 Expression. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Der Vergleich der Myosin1F-Transkriptmengen zeigt, die 40-fache Expression von Myosin1F-mRNA in J774-Zellen im Vergleich zu Hela-Zellen. Die mRNA-Mengen der adhären Zellen variieren hingegen untereinander deutlich weniger. 293T-Zellen weisen die 10-fache, SW480 die 6-fache und A431 die 5-fache Menge der in Hela-Zellen gemessenen Myosin1F-Transkriptmenge auf. Der Vergleich der Taspase1- und Myosin1F-Expressionsstärke zeigt die gleiche Tendenz der mRNA-Transkriptmengen in den adhären Zellen. J774 Zellen weisen für beide Transkripte einen gegenteiligen Trend auf. Während sie vergleichbar geringe Taspase1-Transkriptmengen zeigen, besitzen sie eine hohe Myosin1F-mRNA-Menge (Abb. 14).

Des Weiteren erfolgte der Vergleich zwischen den Zelllinien nach Normalisierung der Taspase1- bzw. Myosin1F-mRNA-Menge an die Expressionsstärke der Haushaltsgene GAPDH und Aktin. So ist es möglich, die Transkriptexpression in Vergleich zur Expression der Haushaltsgene zu setzen. Nimmt man den Vergleich der Expressionsstärke nach Normalisierung an die Haushaltsgene Aktin und GAPDH vor, so zeigt sich in 293T-Zellen die höchste Taspase1 mRNA-Menge und in J774-Zellen die geringste Transkriptmenge (Abb. 15 A). Auch in diesem Fall liegt die mRNA-Menge für Myosin1F um ein Vielfaches unter dem der Taspase1. Die höchste mRNA-Menge für Myosin1F zeigen die Makrophagenzellen (Abb. 15 A). Die Expressionstendenzen sind zwischen den Zelllinien vergleichbar.

Zuletzt wurde ein Vergleich der Myosin1F mRNA-Mengen zwischen den Zelllinien relativ zu Taspase1 mRNA erstellt, wodurch deutlich höhere Transkriptmengen von Taspase1 verglichen mit den Mengen des Myosin1F gezeigt wurden (Abb 15 B).

Zusammenfassend ergeben die Vergleiche der mRNA-Expression, dass die Menge an Taspase1-mRNA um ein Vielfaches höher ist als die Myosin1F-mRNA-Menge. In soliden, adhären Zellen ist hinsichtlich der Transkriptmengen ein ähnlicher Trend zu verzeichnen, während J774-Zellen einen gegenteiligen Trend und eine deutlich höhere Myosin1F-Expression aufweisen.

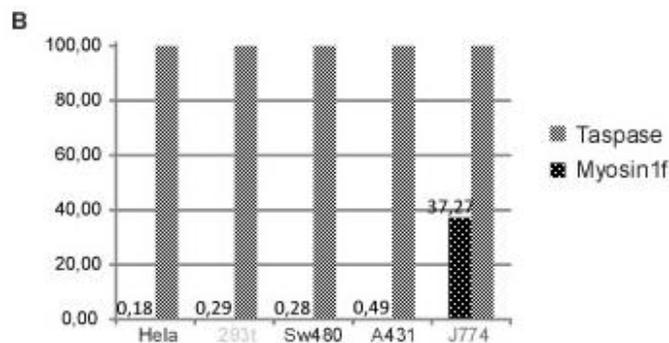
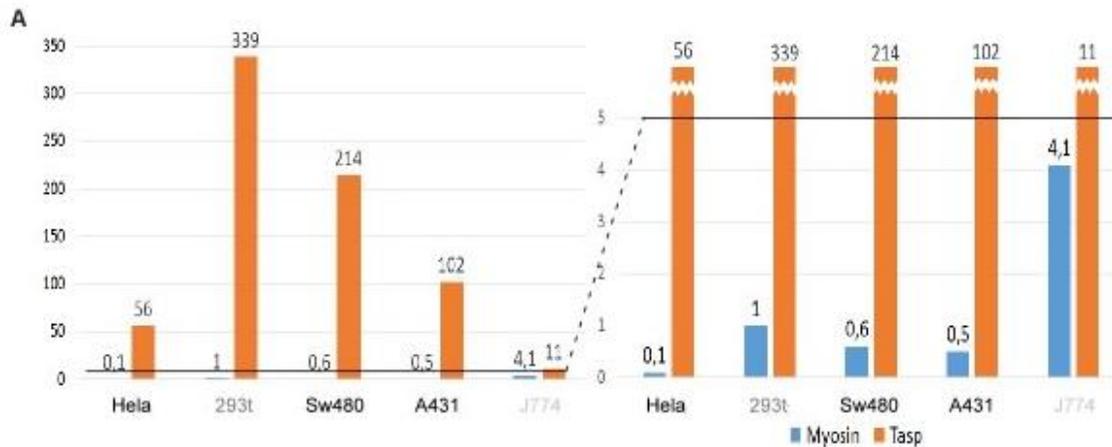


Abb. 15 Die Taspase-mRNA Expression ist deutlich höher als die Myosin1F mRNA-Transkript Menge. A) Dargestellt ist die Menge an mRNA Transkript von Taspase1 und Myosin1F. In HeLa-, 293T-, Sw480- und A431-Zellen korreliert die Myosin1F-Expression mit der von Taspase1. Es liegen in allen untersuchten Zelllinien deutlich größere Mengen an Taspase1 mRNA vor als von Myosin1F.

B) Der Vergleich der Myosin1F mRNA-Mengen relativ zur Taspase1-mRNA-Expression zeigt deutlich höhere Myosin1F-Mengen in den Immunzellen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.3 UNTERSUCHUNG DER PROTEINEXPRESSION VON MYOSIN1F UND TASPASE1

Nach Bestimmung der RNA-Expressionsstärke von Myosin1F und Taspase1 in soliden Tumorzelllinien, Nicht-Tumorzelllinien sowie einer Makrophagenzelllinie, wurden beide Proteine hinsichtlich ihrer Expression untersucht. Dadurch sollten bessere Einblicke in die biologische Funktion des Taspase1-Myosin1F-Zusammenspiels gewonnen werden um die Auswirkungen der möglichen Spaltung näher charakterisieren zu können. Der Vergleich verschiedener Zelllinien kann dabei zu dem besseren Verständnis von Unterschieden zwischen adhären und Suspensionszellen sowie Tumor und Nicht-Tumorzellen beitragen.

Die Myosin1F-Expression wurde bisweilen nur in Zellen des Immunsystems beschrieben (Kim *et al.* 2006). Im Rahmen der Dissertation von C. Bier konnte darüber hinaus eine erhöhte Expression von Taspase1 und Myosin1F in Tumor- sowie Metastasegeweben nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die endogenen Proteinmengen von Myosin1F in verschiedenen Tumor (A431-, Hela-, SW480-Zellen) und Nicht-Tumorzellen (293T-, J774-, Raw-, Vero-, Wi38-Zellen) mittels Westernblot und Immunfluoreszenz (IF) nachzuweisen. Die Daten zeigen unterschiedlich stark ausgeprägte Fluoreszenzfärbungen der Zellmembran in allen untersuchten Zelllinien mit Myosin1F H44-Antikörper (Abb. 16) sowie geringe zytoplasmatische Färbung. In Sw40-, Saos-, Vero- und Hela-Zellen lag zudem die Färbung des Zellkerns vor. Zahlreiche Modifikationsversuche der Färbebedingungen sowie das Testen zweier weiterer Myosin1F-Antikörper erzielten keine Veränderung der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

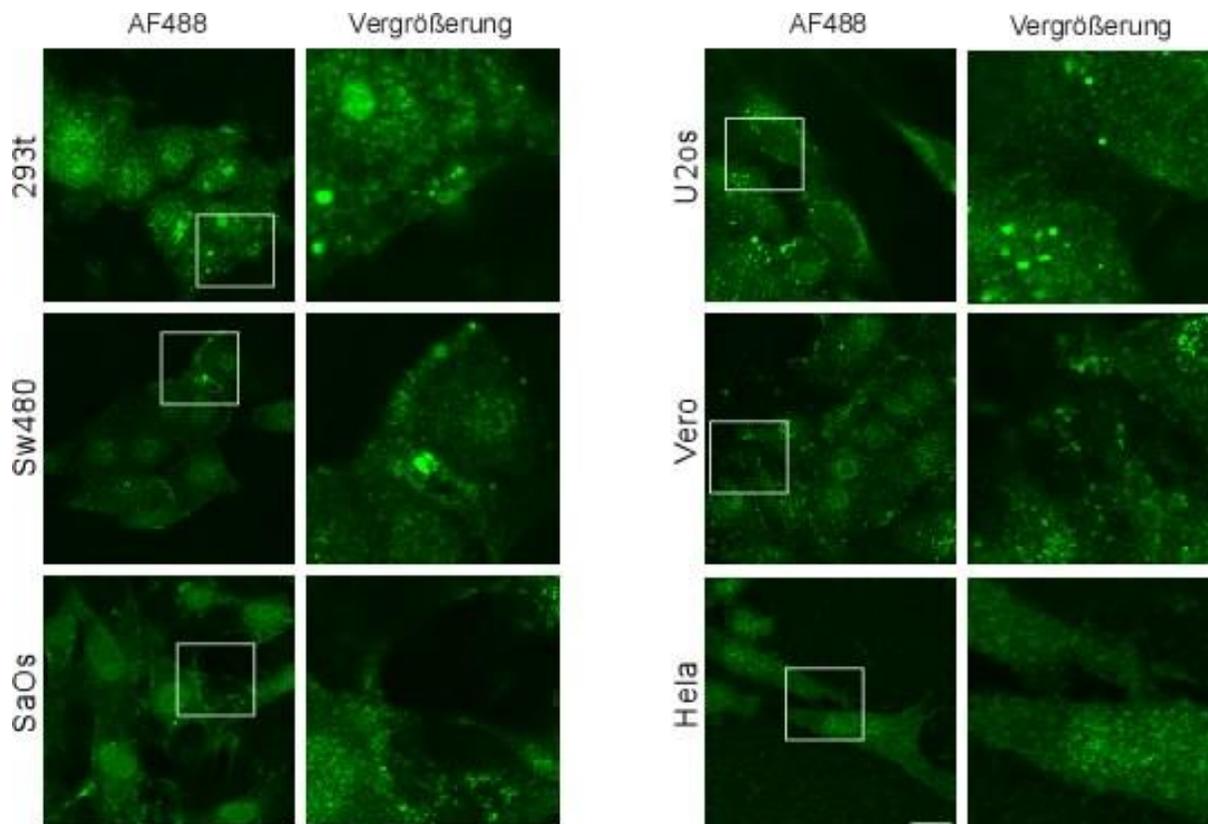


Abb. 16. IF-Färbung von Myosin1F-GFP in verschiedenen adhärenen Zelllinien. Abgebildet ist die Immunfluoreszenzfärbung von endogenem Myosin1F verschiedener Tumor- (Hela-, SW480-Zellen) und nicht-Tumorzellen (293T-, Vero-Zellen) mit Myosin1F H-44 Antikörper. Maßstab: 25 µm.

Neben der IF-Färbung wurde eine Detektion von endogenem Myosin1F und endogener Taspase1 durch Westernblotanalyse vorgenommen. C. Bier konnte im Rahmen ihrer Dissertation unterschiedliche Taspase1-Proteinmengen in Tumorzellen und nicht-Tumorzellen (293T-, J774-, Raw-Zellen) sowie in Metastasegewebe zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellysate erstellt und durch Zentrifugation in Überstand (zytoplasmatische Bestandteile) und Pellet (Membranbestandteile) getrennt. Nach SDS-Gelelektrophorese und Westernblot erfolgte die Analyse der endogenen Taspase1-Mengen durch Antikörperdetektion. Hierzu wurde der Taspase1 D20- (Santa Cruz) sowie der Tasp1-Antikörper (C12, Origene) verwendet. Taspase1 D20 bindet in einer internen Region der humanen Taspase1 und der TaspC12- Antikörper am C-Terminus der humanen Taspase1. Die Detektion zeigte eine Bande auf Höhe von 50 kDa in der Überstandfraktion von 293T-, Hela-, A431-, Raw-, J774- und SW480-Zellen (Abb. 17 A). In der Pelletfraktion ist diese Bande bei 293T-, Hela-, A431-, Raw-, J774-, SW480- und mit Myosin1F transfizierten SW480-Zellen detektierbar. Die Höhe entspricht der Volllänge-Taspase1 mit dem Molekulargewicht von 50 kDa. 293T-, Hela- und A431-Zellen zeigen die stärkere Bandenintensität im Überstand. In den Lysaten der Raw-, J774-, SW480- und mit Myosin1F transfizierten SW480-Zellen zeigt sich eine im Vergleich stärkere Bande in der Pelletfraktion. Der Nachweis der Taspase1-Untereinheiten (Tasp-UE) mit einem Molekulargewicht von 25 und 28 kDa ist aufgrund der großen Zahl unspezifischer Bindungen nicht eindeutig möglich. Es sind sowohl in der Pellet- sowie in der Zytoplasma-Fractionen von 293T-, Hela-, A431-, Raw-, J774-, SW480- und mit Myosin1F transfizierten SW480-Zellen Banden auf entsprechender Höhe detektierbar. Der Vergleich der Intensitäten zeigt die schwächste Bande im Lysat der 293T-Zellen. A431- und Hela-Zellen zeigen eine nur unwesentlich stärkere Bande. Die stärksten Banden sind in den Lysaten von Raw-, J774- und SW480-Zellen detektierbar.

Neben der Analyse der endogenen Taspase1-Expression wurde die Untersuchung endogener Myosin1F-Proteinmengen vorgenommen. Diese erfolgte analog zu der zuvor beschriebenen Untersuchung der Taspase1-Expression. Zur Detektion des Myosin1F wurden H44-, C12- und N14-Antikörper verwendet. Der H44-Antikörper bindet in einer internen Region des Myosin1F, während der C12-Antikörper am C-terminalen Ende des Proteins und der N14-Antikörper am N-terminalen Ende des Proteins bindet.

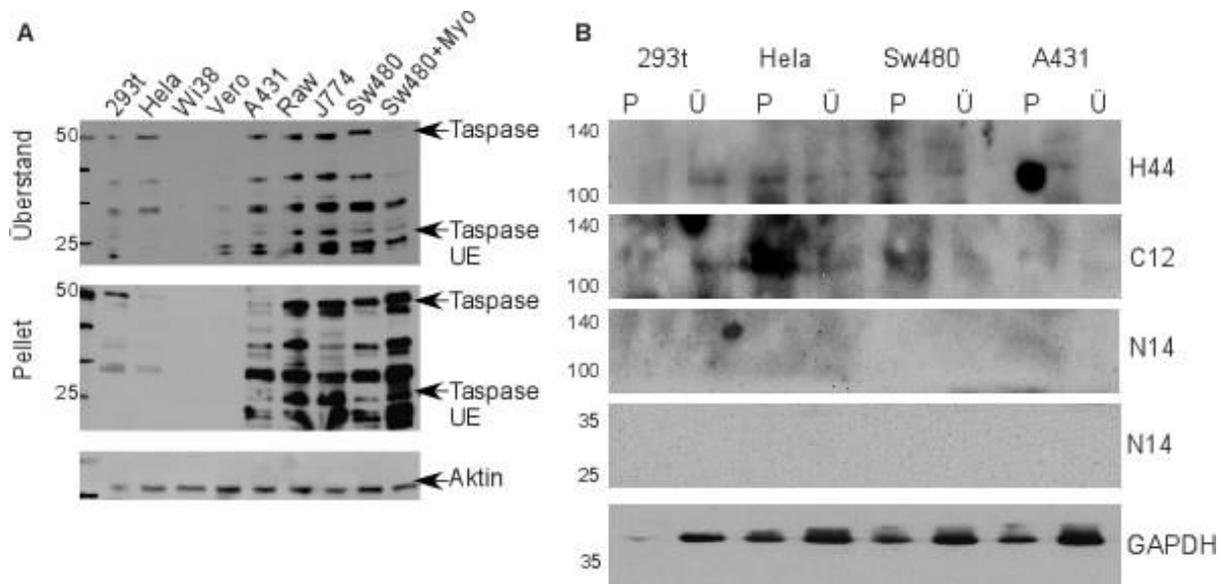


Abb. 17. Analyse der endogenen Proteinmengen von Taspase1 und Myosin1F durch Immundetektion von verschiedenen Zelllysaten. A) Zelllysate verschiedener Zelllinien wurden durch Zentrifugation in Pellet (Membranbestandteile) und Überstand (zytosolische Bestandteile) aufgetrennt und die endogenen Taspase1-Mengen nach Westernblot mit Taspase1- und Taspase1 D20-Antikörper detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt. B) Die Analyse der endogenen Proteinexpression von Myosin1F in verschiedenen Zelllysaten erfolgte wie zuvor für die Taspase1 beschrieben. Myosin1F wurde mit den Antikörpern: N14, C12 und H44 detektiert. Der Nachweis von GAPDH dient als Ladekontrolle. Erläuterungen siehe Text.

Trotz diverser Modifikationen der Lysaterstellung und der Westernblott-Bedingungen war es nicht möglich, die eindeutige Detektion von endogenem Myosin1F im Westernblot zu erzielen. Der exemplarisch gezeigte Westernblot (Abb. 17 B) zeigt, dass die Detektion von endogenem Myosin1F in Lysaten von Tumor- (A431-, HeLa-, SW480-Zellen) und nicht-Tumorzellen (293T-Zellen) sowohl durch Verwendung des N-terminal bindenden Antikörpers, als auch mit dem C-terminal bindenden Antikörpers keine eindeutigen Ergebnisse ergab. Bei Verwendung des N14-Antikörpers konnten weder Banden auf Höhe von 120 kDa (Volllängeprotein) noch auf Höhe von 23 kDa (N-terminales Spaltprodukt) detektiert werden. Bei Gebrauch des C-12 Antikörpers konnten schwache Banden auf einer Höhe von ca. 120 kDa im Zellysat der 293T-, HeLa- und SW480- sowie sehr schwach in A431-Zellen detektiert werden. Mit Myosin1F-H44-Antikörper konnten Banden auf einer Höhe von ca. 120 kDa in den untersuchten Zelllysaten detektiert werden. In den Pelletfraktionen von HeLa-, SW480- und A431-Zellen erscheint die mit H44-Antikörper detektierte Bande als Doppelbande.

4.4 UNTERSUCHUNG DER PROTEINEXPRESSION VON MYOSIN1F UND TASPASE1 IN IMMUNZELLEN

Nachdem deutliche höhere Myosin1F-Transkriptmengen in J774-Zellen als in soliden Tumorzelllinien nachgewiesen wurden, wurde die Analyse der Myosin1F-Proteinexpression in J774- und Raw-Zellen vorgenommen. Die Färbung wurde mit den zuvor beschriebenen C12-, N14- und H-44 Antikörpern vorgenommen. Die IF-Färbung mit H44-Antikörper führt zu der Färbung der Zellmembran sowie der leichten Färbung des Zytoplasmas, jedoch nicht des Zellkerns.

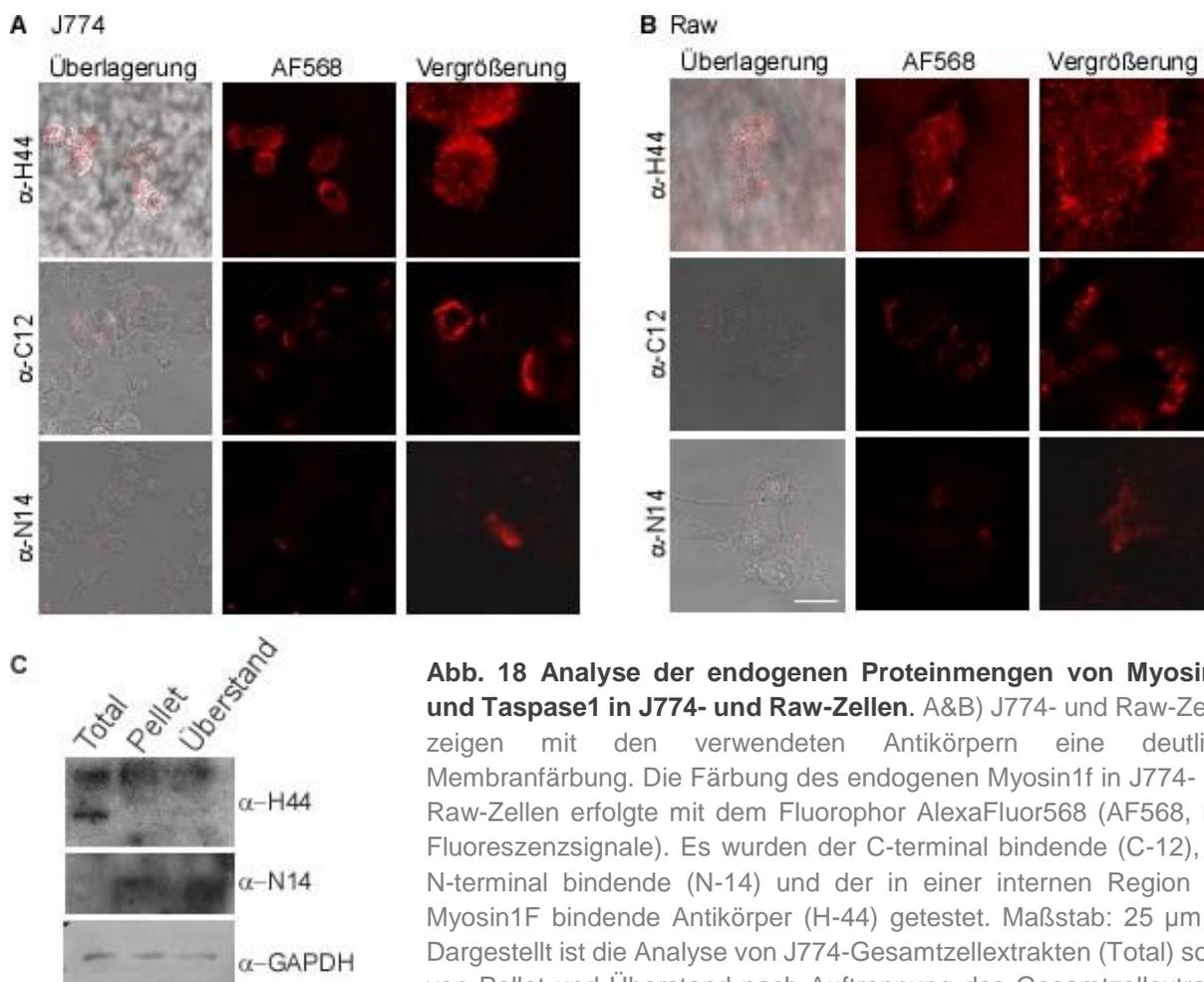


Abb. 18 Analyse der endogenen Proteinmengen von Myosin1F und Taspase1 in J774- und Raw-Zellen. A&B) J774- und Raw-Zellen zeigen mit den verwendeten Antikörpern eine deutliche Membranfärbung. Die Färbung des endogenen Myosin1f in J774- und Raw-Zellen erfolgte mit dem Fluorophor AlexaFluor568 (AF568, rote Fluoreszenzsignale). Es wurden der C-terminal bindende (C-12), der N-terminal bindende (N-14) und der in einer internen Region von Myosin1F bindende Antikörper (H-44) getestet. Maßstab: 25 μ m. C) Dargestellt ist die Analyse von J774-Gesamtzellextrakten (Total) sowie von Pellet und Überstand nach Auftrennung des Gesamtzellextrakts. Der Nachweis von Myosin1F erfolgte mit H-44 und N-14 Antikörper

Die Detektion mit C-12-Antikörper war nicht möglich. Die Analyse der endogenen Taspase1 erfolgte durch die drei Taspase1-Antikörper: D20, C12 und TaspN. GAPDH dient als Ladekontrolle. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Verwendung des C12-Antikörpers führt zu einer stärkeren Färbung der Zellmembran und weniger des Zytoplasmas. Unter Verwendung des N14-Antikörpers konnte keine spezifische Färbung der J774-Zellen und Raw-Zellen detektiert werden (Abb. 18). Die Analyse der Proteinexpression unbehandelter J774-Zelllysate durch Westernblot zeigt eine Doppelbande entsprechend dem Molekulargewicht des Volllänge-Myosin1F (obere Bande) sowie dem nach Taspase1-Spaltung entstehenden C-terminalen Spaltprodukt (untere Bande). Mit N14- und C12-Antikörper war keine eindeutige Detektion möglich. Die Analyse fraktionierter Zelllysate zeigt zudem die stärkere Bandenintensität in der Pelletfraktion. Wodurch zusammenfassend die membranassoziierte Lokalisation des Myosin1F in Immunzellen aufgezeigt wird.

4.5 ANALYSE VON MYOSIN1F MIT GFP-MARKIERTEN EXPRESSIONSKONSTRUKTEN

Da der Nachweis endogener Proteine nicht problemlos möglich war, wurde für die Analyse des Myosin1F im Folgenden das pc3-Myosin1F-GFP Expressionskonstrukt verwendet. Das pc3-Myosin1F-GFP (Myosin1F-GFP) Konstrukt besteht aus dem pc3-Vektor mit integrierter Myosin1F-Proteinsequenz in Verbindung mit GFP. Die schematische Darstellung der einzelnen Domänen des Myosin1F-Proteins (Abb. 19 A) zeigt, dass Myosin1F eine Myosin *Head like* Domäne (blauer Teil; Aminosäuren 1-677) besitzt, in der sich am N-Terminus die ATP-Bindestelle (*ATP binding*, Aminosäuren 110-117), gefolgt von der potenziellen Taspase1-Schnittstelle (CS, Aminosäuren 243-251) und der C-terminalen Aktin-Bindestelle (*Actin binding*, Aminosäuren 579-589) befindet. Zudem besitzt Myosin1F eine Calmodulin-Bindestelle (IQ, Aminosäuren 693-722) sowie eine C-terminale SH3-Domäne (Aminosäuren 1041-1098). Das Myosin1F-mut-GFP Konstrukt codiert für das Volllänge-Myosin1F mit einer DG→AA Mutation in der putativen Taspase1-Schnittstelle, sodass das Myosin1F an dieser Stelle nicht mehr durch die Taspase1 gespalten werden kann (Abb. 19 A).

Um die Ergebnisse der endogenen Myosin1F-Untersuchungen zu verifizieren, wurden die Konstrukte hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle untersucht. Die konfokalmikroskopische Analyse nach 24-stündiger Expression der Konstrukte (Abb. 19 B) zeigt die

hauptsächlich membranassoziierte Lokalisation des Myosin1F-GFP sowie der Mutante. Die wt-Form scheint jedoch stärker membranassoziiert als die Mutante während für diese die stärkere Fluoreszenz im Zytoplasma vorzuliegen scheint. Im Zellkern ist weder bei Expression der Wildtypform, noch bei Expression bei der Mutante grüne Fluoreszenz erkennbar. Zudem sind lange fadenförmige Strukturen an der Oberfläche der Zellen detektierbar. Diese scheinen bei der wt-Form stärker ausgeprägt zu sein als bei der mutierten Form des Myosin1F.

Die zuvor beschriebenen konfokalmikroskopischen Analysen deuten daraufhin, dass die Mutation der Taspase1-Schnittstelle zu der Verlagerung der nicht prozessierbaren Form des Myosin1F ins Zytoplasma führt. Zur Verifizierung des Befundes wurde die Analyse von fraktionierten Zelllysaten vorgenommen. Hela-Zellen (Tumorzellen) sowie 293T-Zellen (nicht-Tumorzellen), wurden mit den Expressionskonstrukten pc3-Myosin1F-GFP und pc3-Myosin1F-mut-GFP transfiziert und nach 24-stündiger Expression lysiert. Die Lysate wurden anschließend durch Zentrifugation in Membranproteine (P= zelluläre Membranpräparation) und im Überstand (Ü= lösliche Proteine) befindliche zytosolische Proteinen getrennt. Die Analyse der Proben erfolgte durch Westernblot. Myosin1F wurde mit GFP- und H44-Antikörper nachgewiesen (Abb. 19 C). Unabhängig vom verwendeten Antikörper können größere Myosin1F-Mengen in der Pelletfraktion detektiert werden als in der Überstandfraktion. Die Detektion des Myosin1F-mut zeigt die stärkere Bande in der Überstandfraktion. Die Mutation resultiert somit in der vermehrt zytoplasmatischen Lokalisation von Myosin1F verglichen mit der hauptsächlich membranassoziierten Lokalisation der Wildtypform. Für die detailliertere Bestimmung der zellulären Verteilung des Myosin1F wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine Fraktionierung von Zelllysaten mit Hilfe des kommerziell erhältlichen „CellsFractionation“ Kit vorgenommen (Siehe Kapitel 4.10, Abb. 28).

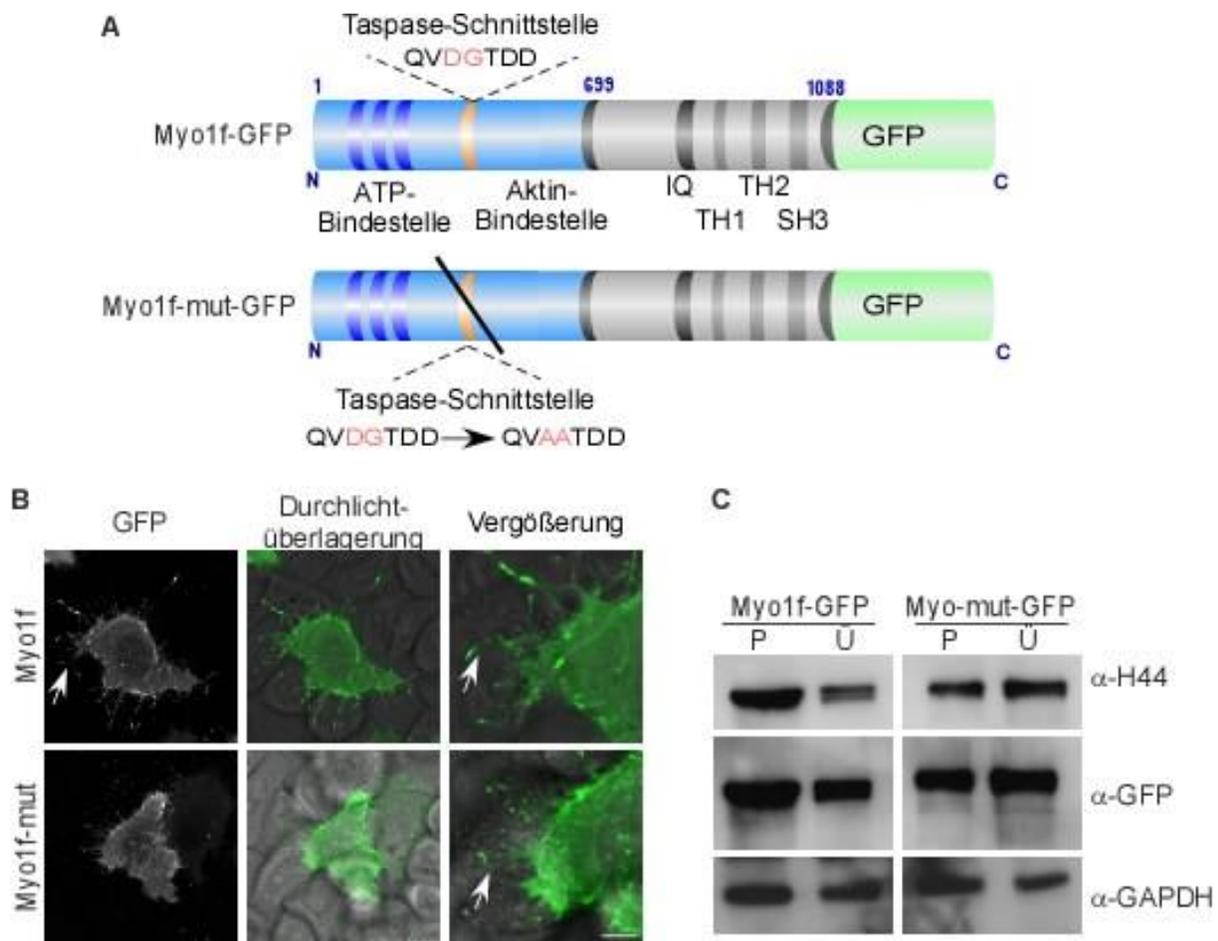


Abb. 19. Einfluss der Taspase1-Schnittstelle auf die Lokalisation des Myosin1F-GFP an der Zellmembran. (A) Schematische Darstellung der einzelnen Domänen des Myosin1F-Proteins. Myosin1F besitzt eine Myosin *Head like* Domäne (blauer Teil, Aminosäuren 1-677), in der sich am N-Terminus die ATP-Bindestelle (ATP binding, Aminosäuren 110-117), gefolgt von der potenziellen Taspase1-Schnittstelle (CS, Aminosäuren 243-251) und der C-terminalen Aktin-Bindestelle (Actin binding, Aminosäuren 579-589) befindet. Darauf folgt die Calmodulin-Bindestelle (IQ, Aminosäuren 693-722) sowie die C-terminale SH3-Domäne (Aminosäuren 1041-1098). Das Myosin1F-mut Konstrukt enthält eine Mutation in der Taspase1-Schnittstelle, die dazu führt, dass das Konstrukt nicht mehr durch Taspase1 gespalten werden kann. Weitere Erläuterungen siehe Text. (B) Konfokalmikroskopie von HeLa-Zellen, die 24-h zuvor mit Myosin1F-GFP und Myosin1F-mut-GFP transfiziert wurden. In beiden Fällen ist das Konstrukt an der Membran lokalisiert. Die mutierte Form weist eine stärkere zytoplasmatische Färbung auf als die Wildtyp-Form. Maßstab: 15 μ m (C) Mit Myosin1F-GFP und Myosin1F-mut transfizierte 293T-Zellen wurden nach 24 h Expression lysiert und per Westernblot analysiert. Für die Detektion von Myosin wurden GFP- sowie Myosin1F (H44)-Antikörper verwendet. Der Nachweis von GAPDH dient als Ladekontrolle. Die Banden der Wildtyp-Form sind in der Pelletfraktion (P) stärker detektierbar als in der Überstandfraktion (Ü). Bei mutierter Schnittstelle liegt eine größere Myosin1F-Proteinmenge im Überstand vor.

Um die Ergebnisse der IF-Färbung von endogenem Myosin1F zu verifizieren und Aufschluss über die Spezifität der Antikörper zu erhalten, wurde eine IF von Myosin1F-GFP-exprimierenden Hela-Zellen vorgenommen. Die Färbung zeigt das Konstrukt bei Detektion mit C-terminal bindendem Antikörper (C-12) an der Zellmembran lokalisiert. Die Detektion mit H44-Antikörper zeigt die hauptsächlich zytoplasmatische Färbung der Zellen, während bei Verwendung des N-terminal (N-14) bindenden Antikörpers eine Färbung der Zellkerne auffällt (Abb. 20).

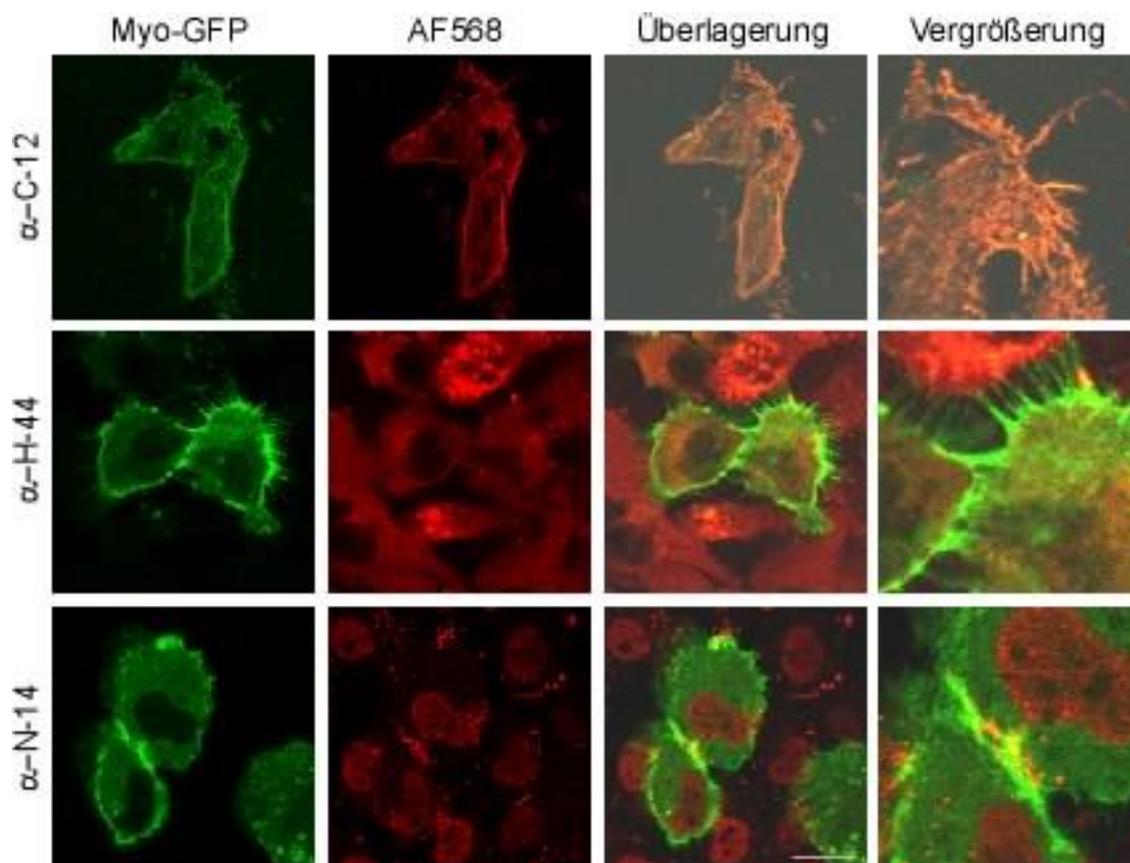


Abb. 20. Untersuchung der Antikörperspezifität durch IF-Färbung von Myosin1F-GFP transfizierten Hela-Zellen. Hela-Zellen wurden mit Myosin1F-GFP transfiziert und 24 h später mit dem am C-Terminus (C-12) und dem am N-Terminus von Myosin1F bindenden Antikörper (N-14) gefärbt. Die Färbung von Myosin1F-GFP mit dem Fluorophor AlexaFluor568 (AF568) ist in rot dargestellt. Der C12-Antikörper erkennt das Myosin1F-GFP an der Zellmembran. Bei Verwendung des H-44 Antikörpers liegt eine stärkere Färbung des Zytoplasmas vor, während bei Verwendung des N-14 Antikörpers eine Kernfärbung vorliegt. Maßstab: 25 µm.

Die Lokalisationsstudie des Myosin1F-GFP in J774- und Raw-Zellen bestätigt die durch IF gewonnenen Ergebnisse der membranassoziierten Lokalisation von Myosin1F (Abb. 21). Auch in den untersuchten Makrophagen-Zelllinien kann die hauptsächlich membranassoziierte Lokalisation des Myosin1F-GFP gezeigt werden. Zudem können auch in J774- und Raw-Zellen die zuvor beschriebenen langen, fadenförmigen Auswüchsen der Zellmembran detektiert werden. Im Zellkern ist keine grüne Fluoreszenz erkennbar.

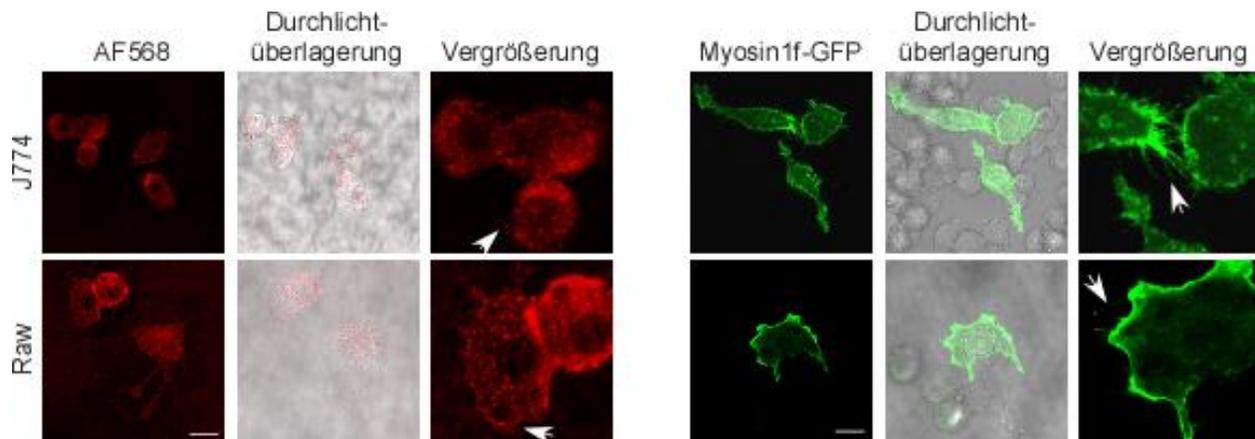


Abb. 21. Vergleich der endogenen Myosin1F-Färbung mit der Expression von Myosin1F-GFP in J774- und Raw-Zellen. J774- und Raw-Zellen wurden mit Myosin1F-GFP transfiziert und nach 24 stündiger Expression am Konfokalmikroskop analysiert. Myosin1F-GFP lokalisiert in beiden Zelllinien an der Zellmembran. Maßstab: 25µM

4.6 SPALTUNG VON MYOSIN1F DURCH TASPASE1

Nachdem die Funktionalität der Taspase1-Schnittstelle mit Hilfe des Myosin1F-Sensor nachgewiesen wurde, sollte die Spaltung des Volllänge-Myosin1F untersucht werden. Hierzu wurden 293T-Zellen mit Myosin1F-GFP und mit Myosin1F-GFP in Kombination mit Taspase1 transfiziert und nach 24-stündiger Expression lysiert. Die Analyse der Gesamtzellextrakte (Abb. 22) hinsichtlich der Expression und Spaltung von Myosin1F erfolgte mit GFP-Antikörper und zeigt in den mit Myosin1F-GFP transfizierten Zellen eine Bande auf Höhe von ca. 150 kDa. Diese entspricht dem Molekulargewicht des Volllänge-Proteins. Die Bande ist nicht im Zellysate untransfizierter 293T-Zellen detektierbar und

belegt die Spezifität der Myosin1F-GFP Detektion durch den GFP-Antikörper. Des Weiteren ist bei Koexpression von Myosin1F-GFP und Taspase1 eine Bande auf Höhe von ca. 120 kDa visualisierbar. Beide Banden sind ebenfalls durch den H44-Antikörper detektierbar. Der Taspase1-Expressionnnachweis erfolgte mit Taspase1-Antikörper, wodurch Banden auf Höhe von ca. 50 kDa und ca. 25 kDa detektiert wurden, die den Molekulargewichten der Volllänge-Taspase1 (50 kDa) und der Taspase1-Untereinheit entsprechen. Die Detektion von Banden bei Verwendung des N-14 Antikörpers war nicht möglich (Abb 22). Durch Separation der Gesamtzellextrakte in Überstand (zytosolische Bestandteile) und eine Pellet (Membranbestandteile) zeigte sich zudem, dass die Myosin1F-GFP-Banden auf Höhe von ca. 150 kDa und 120 kDa vorwiegend in der Pelletfraktion detektierbar ist (Daten nicht gezeigt), was auch darauf hindeutet, dass das C-terminale Spaltprodukt an der Membran lokalisiert ist. Die eindeutige Detektion von Banden durch Verwendung des N-14 Antikörpers war auch in diesem Fall nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

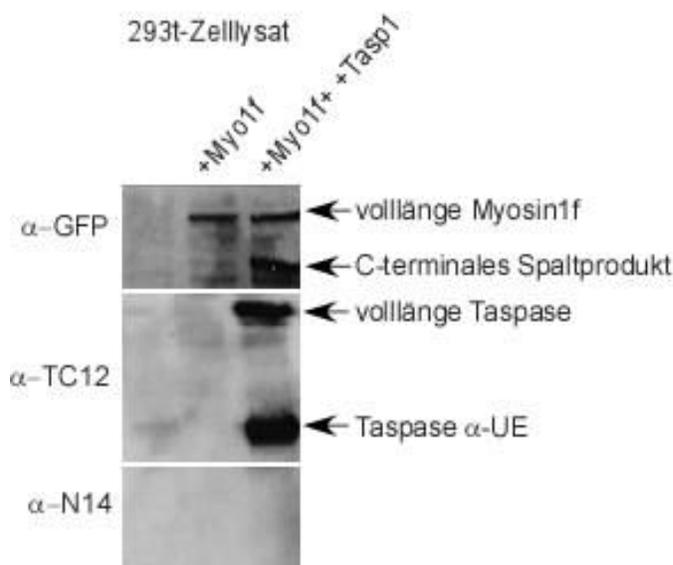


Abb. 22 Detektion der Myosin1F-Spaltung durch Taspase1. (A) 293T-Zellen wurden mit Myosin1F-GFP sowie mit und ohne Taspase1 transfiziert und nach 24-stündiger Expression lysiert. Untransfiziertes Hela-Lysat diente zur Kontrolle der Antikörper-spezifität. Die Expression und Spaltung von Myosin1F wurde mit GFP-Antikörper analysiert. Taspase1 wurde mit Tasp1-Antikörper detektiert. Der Westernblot zeigt das Auftreten einer Bande bei 150 kDa in den mit Myosin1F transfizierten Zellen sowie eine Bande auf Höhe von 120 kDa bei Koexpression von Taspase1. Die Detektion von Banden mit N-14 Antikörper war nicht möglich. Es wurden je 40 µg Protein der verschiedenen Zelllysate aufgetragen.

4.6.1 *ERSTELLUNG VON MYC-MYOSIN1F-KONSTRUKTEN ZUR SPEZIFISCHEN DETEKTION DES MYOSIN1F N-TERMINUS*

Durch Koexpression von Taspase1 und Myosin1F konnte die Anwesenheit des C-terminalen Spaltprodukts von Myosin1F gezeigt werden. Die Detektion des N-terminalen Fragments war nicht eindeutig möglich. Aus diesem Grund wurden Myc-Tag markierte Expressionskonstrukte erstellt, bei denen mittels Oligo-Annealing generierte Myc-Tags vor die Sequenz des Myosin1F kloniert wurden. Mit Hilfe dieses Tags sollte die spezifische Detektion des N-Terminus von Myosin1F und dem N-terminalen Spaltprodukts mit Myc-Antikörper möglich sein.

Die Lokalisation der Konstrukte in Hela-Zellen (Abb. 23; Daten für 293T, SW480 nicht gezeigt) zeigt das Konstrukt ebenso wie das unmarkierten Konstrukt hauptsächlich an der Zellmembran sowie zum Teil zytoplasmatisch lokalisiert. Die Myc-markierte Myosin-Mutante lokalisiert analog dem unmarkierten Konstrukt an der Zellmembran, jedoch verglichen mit dem Wildtyp stärker im Zytoplasma. Ein Einfluss des N-terminal angefügten Myc-Tag auf den Phänotyp der Myosin1F-Expression kann somit ausgeschlossen werden (Vergleich Abb. 19 mit Abb. 23 A).

Für die Untersuchung der Myc-markierten Konstrukte wurden Hela-Zellen mit den Konstrukten transfiziert und nach 24-stündiger Expression lysiert. Nach erfolgreicher Expression der Konstrukte wurden diese im Westernblot mit H44-, Myc- und GFP-Antikörpern detektiert (Abb. 23 B), wodurch gezeigt wurde, dass die Myc-Myosin1F-GFP-Konstrukte mit drei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen werden können. Für den Nachweis per IF wurden Hela-Zellen mit Myc-Myosin1F-GFP sowie Myc-Myosin1F-mut-GFP transfiziert und nach 24-stündiger Expression fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Myc-Tag-Antikörper, die belegte, dass der spezifische Nachweis der Konstrukte mit Myc-Antikörper möglich ist (Abb. 23 C).

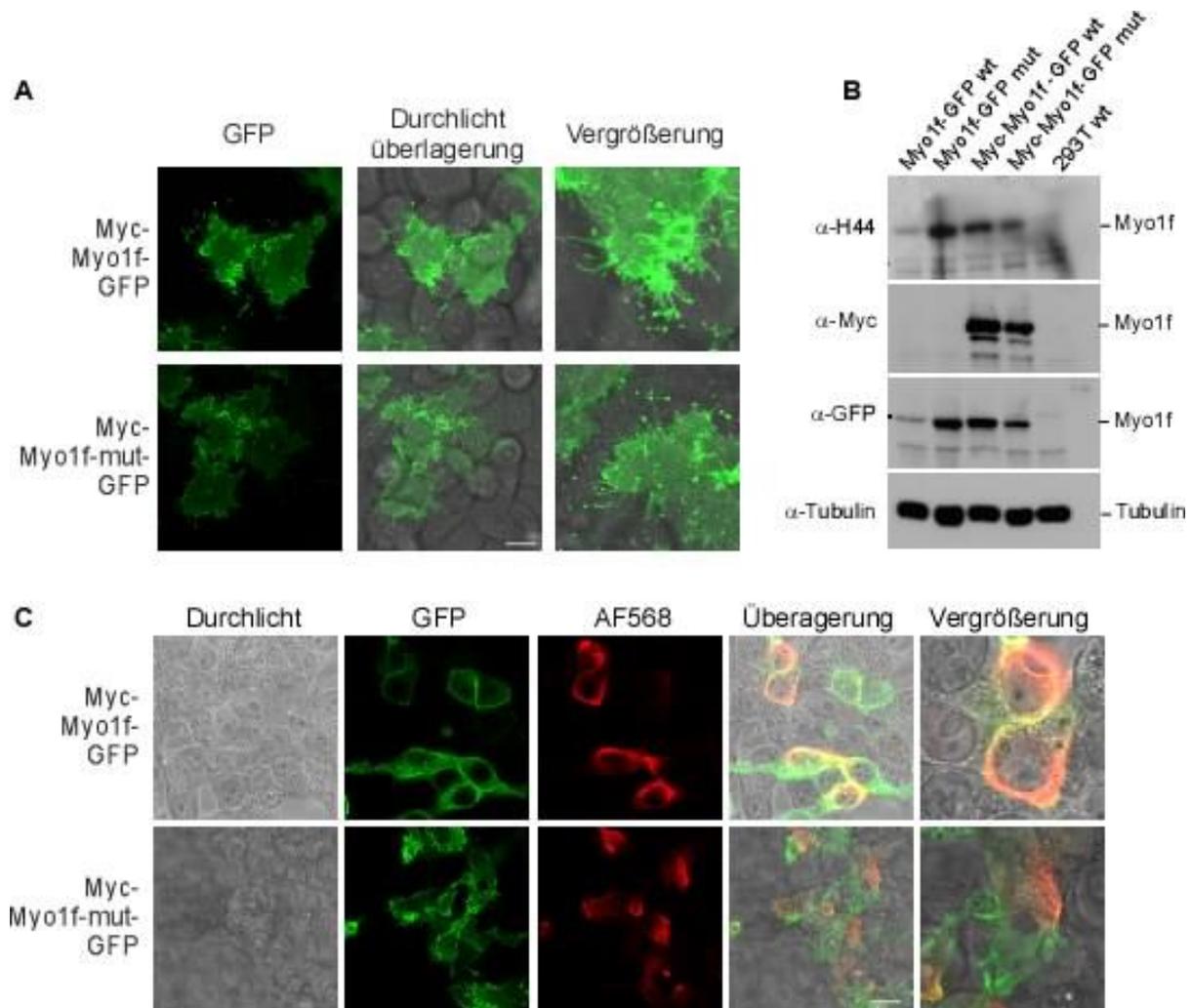


Abb. 23. Erstellung des Myc-Myosin1F-Konstrukts zur Detektion des N-Terminus. (A) Die Expression der Myc-markierten Myosin1F-Expressionskonstrukte zeigt die gleiche Lokalisation wie die unmarkierten Expressionskonstrukte (Vergl. Abb. 19). (B) Nachweis verschiedener Myosin1F-Konstrukte im Westernblot. Die Myosin1F-GFP-Konstrukte können mit drei verschiedenen Antikörpern im Westernblot nachgewiesen werden. 293T-Zellen wurden mit den vier verschiedenen Myosin1F-Konstrukten transfiziert und nach 24 h lysiert. Die Expression der vier Konstrukte wurde mit dem Myosin1F (H-44) Antikörper (oberer Teil), mit einem Myc-Antikörper (zweiter Teil) und mit einem GFP-Antikörper (dritter Teil) überprüft. Tubulin (unterster Teil) diente als Ladekontrolle. Es wurden jeweils 40 μ g des Zelllysats aufgetragen. Untransfiziertes 293T-Lysat diente der Kontrolle der Antikörperspezifität. (C) Nachweis des klonierten Myc-Tags von Myosin1F durch IF. Der Myc-Tag der Myc-Myosin1F-GFP-Konstrukte ist durch IF nachweisbar und ändert die Lokalisation von transfiziertem Myosin1F-GFP nicht. Die Färbung des Myc-Tags erfolgte mit dem Fluorophor AlexaFluor568 (AF568) und ist in rot dargestellt. Maßstab: 25 μ m.

4.6.2 *UNTERSUCHUNG DER SPALTUNG VON MYOSIN1F DURCH TASPASE1*

Nachdem erfolgreich das Myc-Myosin1F-GFP Expressionskonstrukt erstellt und ein Nachweis mit Myc-, GFP- und H44-Antikörper per IF und Westernblot erbracht worden war, wurde erneut die Untersuchung der Myosin1F-Spaltung durch Taspase1 vorgenommen.

Um die Spaltung zu zeigen, wurden Hela- und 293T-Zellen mit Myc-Myosin1F-GFP sowie der Kombination aus Myc-Myosin1F-GFP und Taspase1-BFP transfiziert. Nach 24-stündiger Expression wurden die Zellen lysiert und durch Zentrifugation in Pellet (membranäre Zellbestandteile) und Überstand (zytosolische Bestandteile) getrennt. Die Detektion des Myosin1F wurde mit GFP- und H44-Antikörper vorgenommen. Die Taspase1-Expression war zuvor durch Mikroskopie bestätigt worden (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Lysate mit GFP-Antikörper zeigt Banden auf Höhe von 150 kDa in den Pelletfraktionen der Lysate sowie sehr schwache Banden in den Überstandfraktionen. Im Vergleich zu den Hela-Zellen weisen 293T-Zellen deutlich mehr Myosin1F im Zytoplasma auf. Die Banden in den 293T-Zellen sind verglichen mit denen der Hela-Zelllysate jedoch deutlich stärker. Dies ist vermutlich auf die stärkere Expression der Proteine in den 293T-Zellen zurückzuführen. Die Detektion mit H-44 Antikörper zeigt eine Doppelbande auf Höhe von 150 kDa und ca. 120 kDa. Die untere Bande erscheint in Hela-Lysaten sowohl in An- als auch in Abwesenheit kotransfizierter Taspase1, während sie in 293T-Zellen in Abwesenheit von Taspase1 nicht eindeutig detektiert werden kann. Bei Koexpression von Taspase1 nimmt die Intensität die Bande auf 120 kDa in beiden Zelllinien zu. Die Detektion des N-terminalen Spaltprodukts mit einem Molekulargewicht von 29 kDa erfolgte über Myc- und N14-Antikörper (Abb. 24) und ergab eine Bande auf Höhe von ca. 30 kDa in der Pelletfraktion von Hela- und 293T- Zellen in An- und Abwesenheit von Taspase1. Durch Verwendung des Myc-Antikörpers tritt die Bande deutlich stärker in den 293T-Zellen auf. In beiden Zelllinien ist das Fragment in der Pelletfraktion lokalisiert. Aus welchem Grund eine bessere Detektion des Myosin1F in 293T-Zellen mit Myc-Antikörper und in Hela-Zellen mittels N14-Antikörper erfolgt, konnte nicht geklärt werden.

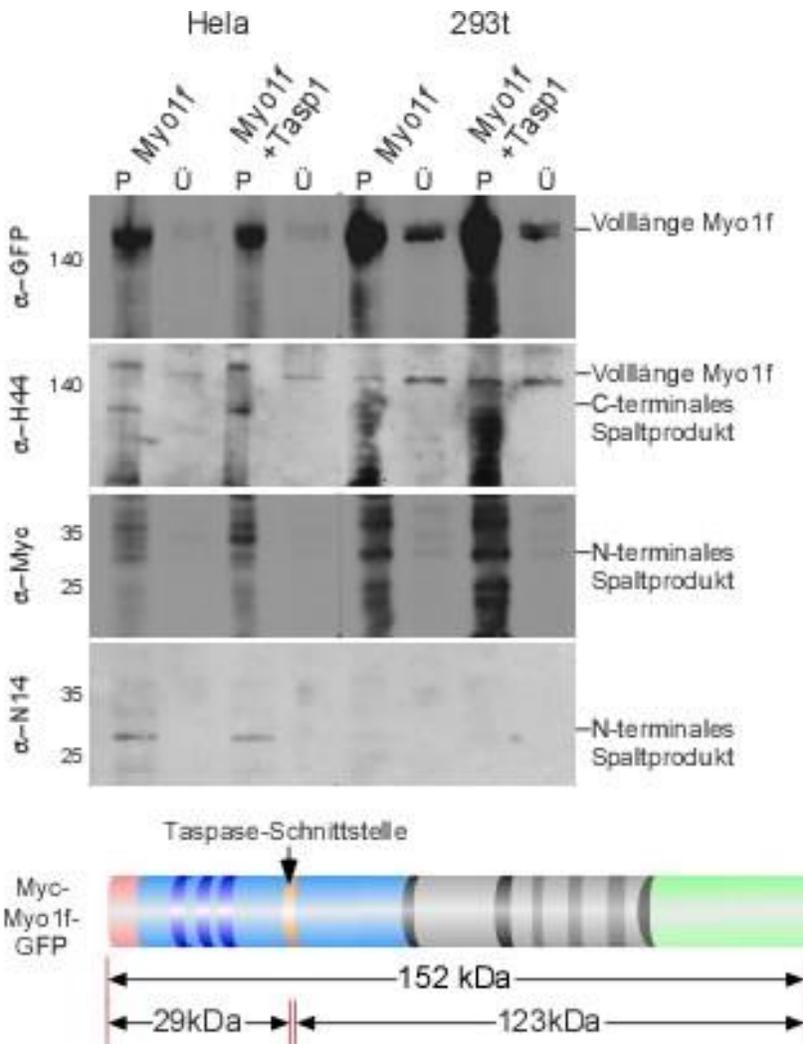


Abb. 24. Myosin1F-Spaltung durch Taspase1. Myosin1F-GFP wurde in 293T-Zellen mit und ohne Taspase1 exprimiert. Nach 24-stündiger Expression wurden fraktionierte Zelllysate erstellt. Die Fraktionen wurden mit GFP-, H44-, Myc- und N14-Antikörper hinsichtlich der Myosin1F-Spaltung analysiert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Um den möglichen Abbau der Spaltprodukte zu untersuchen und zu unterbinden, wurden die Zellen nach Transfektion mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt und anschließend lysiert und wie zuvor beschrieben fraktioniert. Die Behandlung mit dem Inhibitor zeigte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Myosin1F oder den Phänotypen der Myosin1F-exprimierenden Zellen (Abb 25 A). Die Westernblotanalyse der Zelllysate mit H44-Antikörper zeigt die Bande auf Höhe von ca. 150 kDa, die dem Molekulargewicht des Volllänge-Konstrukts entspricht. Mit Myc-Tag Antikörper konnte die Bande auf einer Höhe von ca. 30 kDa detektiert werden, die dem Molekulargewicht des N-terminalen Spaltprodukts entspricht. Die Bande ist in den Pelletfraktionen der mit Myosin1F-GFP transfizierten Zellen und den Myosin1F-Taspase1-koexprimierenden Zellen detektierbar

und bestätigt die ohne MG132 erzielten Ergebnisse. Mit N14-Antikörper wurden sehr schwache Signale auf Höhe von ca. 30 kDa in der Pelletfraktion der mit Myosin1F transfizierten Zellen detektiert sowie in Pellet- und Überstandfraktion der kotransfizierten Zellen. Die Taspase1-Expression wurde in den entsprechend transfizierten Zellen durch Taspase1-Antikörperdetektion bestätigt. Verglichen mit den Ergebnissen der unbehandelten Zelllysate konnte kein eindeutiger Unterschied durch die Behandlung mit MG132 festgestellt werden.

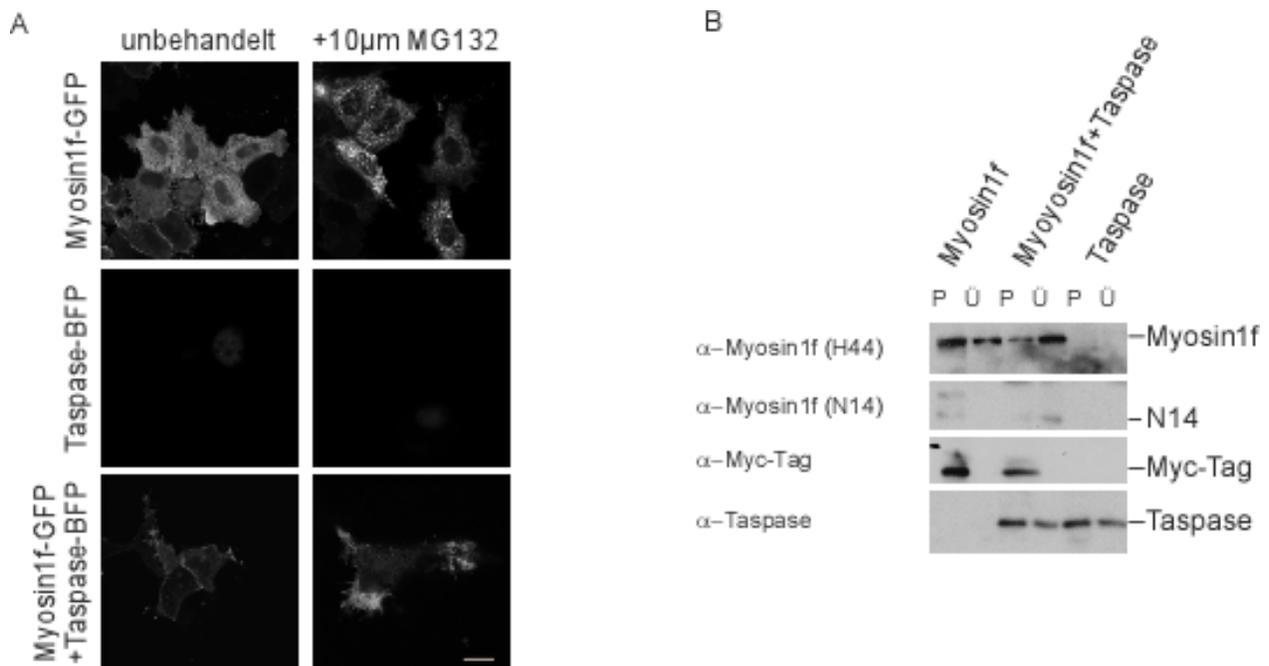


Abb. 25. MG132-Einfluss auf die Spaltung des Myosin1F durch Taspase1. (A) 293T-Zellen und HeLa-Zellen wurden mit Taspase1, Myosin1F-GFP sowie Taspase1 und Myosin1F-GFP transfiziert und nach 24 h Expression für 5 h mit MG132 behandelt. Die Behandlung mit MG132 zeigt keinen Einfluss auf die membranassoziierte Lokalisation des Myosin1F in HeLa-Zellen. (B) Nach Behandlung der Zellen mit MG132 wurden fraktionierte Zelllysate erstellt und die Detektion des Myosin1F-GFP mit H44-Antikörper vorgenommen sowie die Detektion des N-terminalen Spaltprodukts mit N14- und Myc-Antikörper und die Detektion der Taspase1 mit Taspase1-Antikörper. Bei Koexpression mit Taspase erscheint bei Verwendung von N-14 Antikörper und Myc-Antikörper eine Bande auf einer Höhe von ca. 28 kDa. Diese Bande ist in HeLa-Zellen deutlich stärker und erscheint auch ohne die Koexpression von Taspase1.

4.6.3 SPALTUNG VON MYOSIN1F DURCH AKTIVE TASPASE1

Zur Untersuchung der Taspasefunktion während der Myosin1F-Spaltung wurden in *E. coli* exprimierte und gereinigte rekombinante Taspase1-Proteine verwendet. Dazu wurden mit His-Tag markierte humane Volllänge-Taspase1 sowie Plasmidkonstrukte der einzelnen Taspase1-Untereinheiten in *E. coli* BL21DE transformiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch IPTG. Nach erfolgreicher Expression wurden die rekombinanten Proteine über Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und im Anschluss gefiltert (Durchführung von Johannes van den Boom). Nachdem der Aktivitätsnachweis der Proteine erbracht worden war, wurden diese zur Spaltung des Myosin1F eingesetzt. Dazu wurden die Proteine zu fraktionierten Zellysaten Myc-Myosin1F-GFP exprimierender Zellen hinzugefügt. Für Inkubationszeit und -temperatur wurden verschiedene Bedingungen geprüft. Gezeigt ist exemplarisch das Ergebnis nach dreistündiger Inkubation der Versuchsansätze bei 30° C (Abb. 26). Die Detektion des Myosin1F erfolgte über GFP- und H44-Antikörper. Die Analyse mit H44-Antikörper zeigt in allen aufgetragenen Lysaten deutliche Banden auf einer Höhe von 150 kDa in den Pelletfraktionen sowie sehr schwache Banden in den Überstandfraktionen. In den mit Taspase1 versetzten Lysaten ist zudem eine Bande auf Höhe von 120 kDa detektierbar. Die Untersuchung der Lysate hinsichtlich des N-terminalen Spaltprodukts mit N14-Antikörper detektierte eine schwache Bande auf Höhe von ca. 30 kDa in den mit Taspase1-Untereinheiten versetzten Lysaten. Die Verwendung des Myc-Antikörpers zeigt die Bande zudem in den Kontrolllysaten. In den mit Taspase1-Untereinheiten versetzten Lysaten ist diese Bande deutlich stärker als in dem mit Volllänge-Taspase1 versetzten Zellysat.

Die Taspase1 wurden mit Tasp1-Antikörper nachgewiesen. In den mit Volllänge Taspase1 versetzten Lysaten wurde Taspase1 als Volllänge-Protein sowie in Form der α - und β -Untereinheiten nachgewiesen. In den mit den Taspase1-Untereinheiten versetzten Lysaten wurde nur Taspase1 auf Höhe der Untereinheiten nachgewiesen.

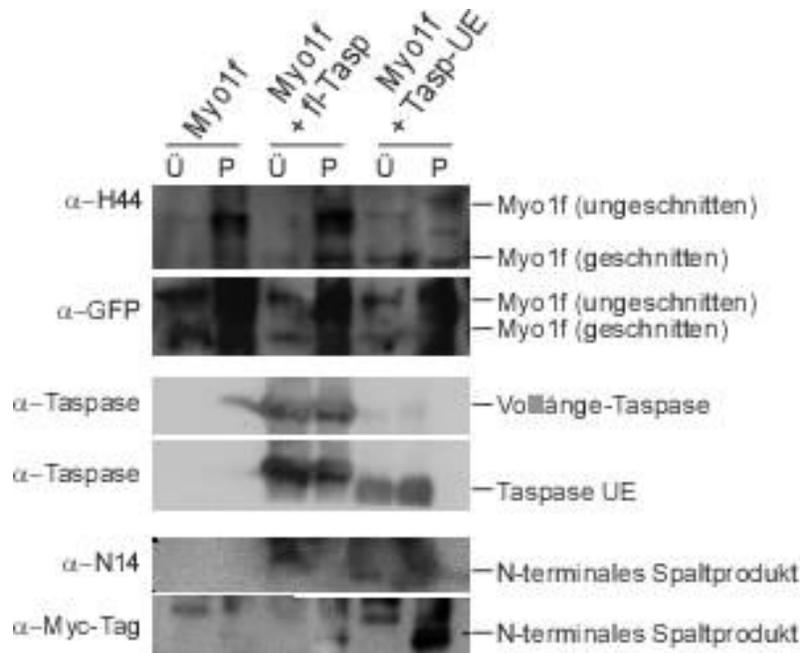


Abb. 26. Myosin1F-Spaltung durch rekombinante Taspase1-Proteine. Fraktionierte Zelllysate wurden mit zuvor exprimierten und anschließend gereinigten Taspase1-Untereinheiten (Tasp-UE) sowie Volllänge-Taspase1 (fl-Tasp) vermengt und nach Inkubation analysiert. Taspase1 wurde durch Tasp1-Antikörper detektiert. Volllänge Myosin1F wurde mit H44- und GFP-Antikörper detektiert. Das N-terminale Spaltprodukt wurde mit N14- und Myc-Tag-Antikörper detektiert. In Anwesenheit von Taspase1 kann durch Myc-Antikörper eine Bande bei ca. 29 kDa detektiert werden. Zudem kann mittels GFP-Antikörper eine Bande bei 150 kDa sowie 120 kDa detektiert werden.

4.6.4 UNTERSUCHUNG DER SPALTPRODUKTE

Für die Untersuchung der durch Taspase1-Hydrolyse entstehenden Fragmente wurden GFP-markierte Expressionskonstrukte erstellt, die für das N-terminale sowie das C-terminale Spaltprodukt in Fusion mit GFP-Tag codieren (Abb. 27 A). Durch die Konstrukte sollte die Myosin1F-Spaltung durch Taspase1 simuliert und die Untersuchung der Spaltprodukte ermöglicht werden. Für die Analyse der Myosin1F-Kopf-Domäne wurde ein Expressionskonstrukt kloniert, das die ersten 690 AS des Myosin1F umfasst.

Die Analyse der Expressionskonstrukte hinsichtlich ihrer Lokalisation in Hela-Zellen (Abb. 27; Daten für 293T-, SW480-, A431-Zellen nicht gezeigt) zeigt, dass das C-terminale Fragment teilweise an der Membran lokalisiert, verglichen mit dem Volllängeprotein jedoch deutlich stärker im Zytoplasma. Die fingerförmigen Auswüchse an der Zelloberfläche, die

bei der Expression der Wildtypform auftreten, sind nicht mehr erkennbar. Der Zellkern ist weiterhin von grüner Fluoreszenz ausgespart.

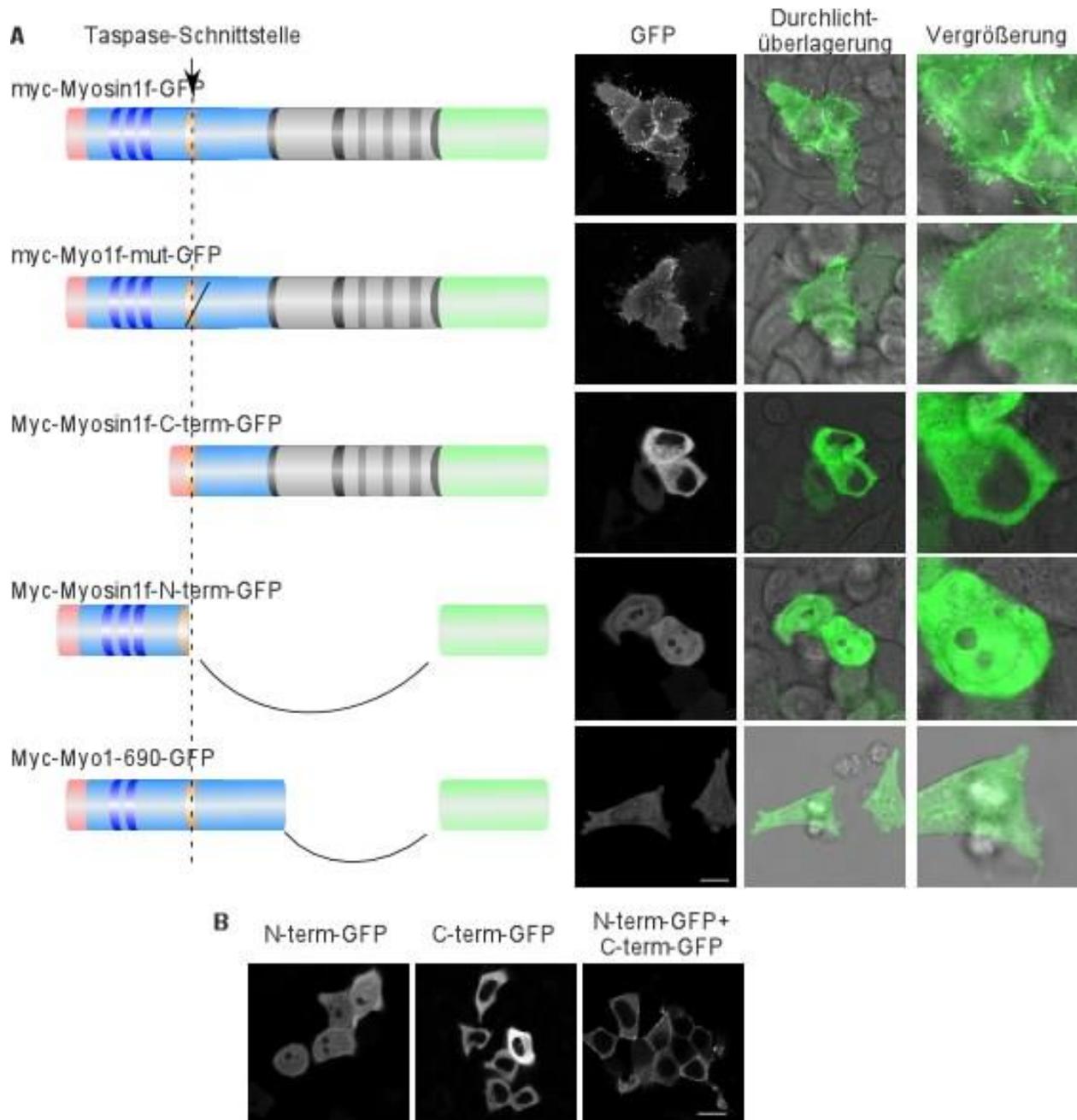


Abb. 27. Unterschiedliche Lokalisation der Spaltprodukte des Myosin1F in der Zelle. Schematische Darstellung der Myosin1F-Expressionskonstrukte sowie die Lokalisation nach 24 stündiger Expression in 293T-Zellen. Das durch Taspase1-Spaltung entstehende C-terminale Fragment ist an der Membran und im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Das bei Spaltung durch Taspase1 entstehende N-terminale Fragment lokalisiert im Zytoplasma und dem Nukleus der Zelle. Die Myosin-Head like Domäne (As 1-690) lokalisiert in der ganzen Zelle. CS: Taspase1 cleavage site. Maßstab: 25µM

Die Expression des GFP-markierten N-terminalen Spaltprodukts zeigt die deutliche Akkumulation von grüner Fluoreszenz im Zellkern. Eine Lokalisation an der Zellmembran, wie bei der Wildtypform sowie dem C-terminalen Spaltprodukt, ist hier nicht erkennbar. Die Motordomäne des Myosin1F, bestehend aus den AS 1-690 und ist zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert. Unterschiede in der Lokalisation der Konstrukte zwischen den untersuchten Zelllinien konnten nicht ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Lokalisation des N-terminalen Fragments im Kern der Zelle festgestellt wurde, wurde die Koexpression der Spaltprodukte vorgenommen, um auf eventuelle Interaktionen schließen zu können. Die Expression von C- bzw. N-terminalem Spaltprodukt zeigt die zuvor beschriebene Lokalisation der Konstrukte (Abb. 28 C), während bei Koexpression der Konstrukte die zytoplasmatische Färbung sowie eine leichte Membranfärbung (Abb. 27 B) detektierbar ist. Die Kernfärbung, die bei alleiniger Transfektion des N-terminalen Spaltprodukts ausgemacht werden konnte, kann bei Kotransfektion mit dem C-Terminus von Myosin1F nicht mehr festgestellt werden, wodurch auf die Interaktion der Proteinfragmente geschlossen werden kann.

Mit Hilfe von fraktionierten Zelllysaten sollten die Ergebnisse der zuvor beschriebenen *in vivo* Lokalisationsstudie verifiziert werden. Die Analyse zum Nachweis der Myosin1F-Konstrukte erfolgte mit Myc-, GFP- und H44-Antikörper um zudem die Spezifität der verwendeten Antikörper zu prüfen. Die exprimierten Spaltprodukte sind im Westernblot mit allen getesteten Antikörpern detektierbar (Abb. 28 A). Zudem wird durch die Trennung der Lysate in zytosolische und unlösliche Zellbestandteile deutlich, dass das C-terminale Konstrukt ebenso wie die Wildtypform hauptsächlich in der Pelletfraktion detektierbar ist. Das N-terminale Spaltprodukt ist hingegen zum größeren Teil im Überstand vorzufinden (Abb. 28 A).

Die detailliertere Lokalisationsanalyse des Myosin1F erfolgte durch die Fraktionierung von Zelllysaten mit dem Fraktionierungskit der Firma Promega. Infolge dessen war es möglich, die Zelllysate in Zellkern, Zytoplasma, Zellmembran und Zytoskelett zu separieren. Die Analyse wurde in 293T-, Hela- sowie SW480-Zellen vorgenommen (Daten nicht gezeigt). Für die Fraktionierung der mit Myosin1F-GFP und Myosin1F-mut-GFP transfizierten Zellen ist exemplarisch die Analyse der Hela-Zellen dargestellt.

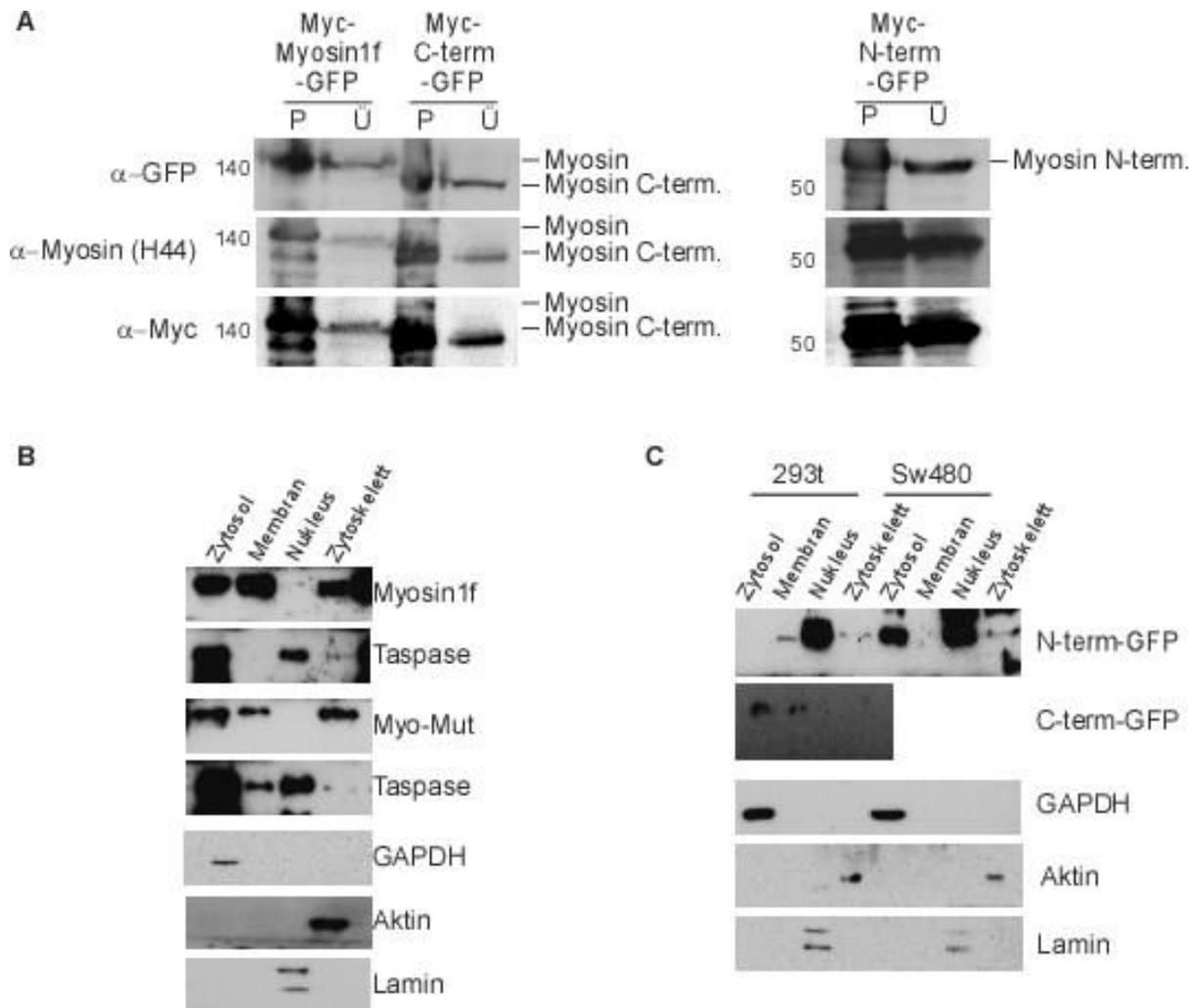


Abb. 28. Antikörpertest und Lokalisationsstudie von Myosin1F sowie den Spaltprodukten. A) Die Detektion der Konstrukte ist mit GFP-, H44-Antikörper sowie Myc-Antikörper möglich. Während die Wildtypform und das C-terminale Fragment hauptsächlich in der Pelletfraktion detektierbar sind, ist das N-terminale Fragment vorwiegend im Überstand lokalisiert. Es wurden je 40 μ g Protein der verschiedenen Zelllysate aus 293T-Zellen aufgetragen. Für Hela-Zellen konnte ein vergleichbares Ergebnis erzielt werden (Daten nicht gezeigt). B) Myosin1F-GFP lokalisiert im Zytosol, an der Zellmembran sowie am Zytoskelett. Die Mutation der Taspase1-Schnittstelle führt zur Lokalisation von Taspase1 an der Membran. 293T-Zellen wurden mit Myosin1F-GFP, der Mutante sowie dem C-terminalen Spaltprodukt transfiziert und nach 24-stündiger Expression fraktioniert. Myosin1F-GFP lokalisiert im Zytosol, an der Membran sowie am Zytoskelett. Die Mutation der Schnittstelle hat keinen Einfluss auf die Lokalisation. Taspase1 lokalisiert bei Koexpression mit der mutierten Form des Myosin1F vermehrt an der Zellmembran. Das C-terminale Spaltprodukt lokalisiert im Zytosol sowie an der Membran. Gleiche Ergebnisse wurden für Hela- und SW480-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt). C) Die Koexpression der Spaltprodukte führt zu einer Umlagerung des N-terminalen Fragments von Zellkern ins Zytoplasma der Zelle.

Der Vergleich mit 293T- sowie SW480-Zellen ergab keine eindeutigen Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Die Antikörperdetektion (Abb. 28 B) unterlegt die zuvor erzielten Ergebnisse und zeigt, dass wt-Myosin1F sowie die nicht durch Taspase1 spaltbare Myosin1F-Mutante im Zytosol, an der Membran sowie am Zytoskelett lokalisieren. Die Detektion der endogenen Taspase1 mit Tasp1-Antikörper zeigt bei Myosin1F-GFP exprimierenden Zellen die bereits beschriebene Lokalisation der Taspase1 im Zytosol und im Kern. Bei der Transfektion mit Myo-mut-GFP ist Taspase1 auch in der Membranfraktion detektierbar (Abb. 28 B).

Die Lokalisationsanalyse der Myosin1F-Spaltprodukte per Fraktionierungskit der Firma Promega bestätigt die zuvor erzielten Ergebnisse und zeigt, dass das C-terminale Spaltprodukt im Zytosol und an der Zellmembran lokalisiert. Das N-terminale Spaltprodukt befindet sich, neben einer schwachen Lokalisation in der Membranfraktion, hauptsächlich im Zellkern von 293T-Zellen. Der Vergleich mit SW480-Zellen zeigt, dass diese mehr Myosin1F-Protein im Zytosol aufweisen (Abb. 28 C).

4.7 UNTERSUCHUNG MÖGLICHER WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN MYOSIN1F UND TASPASE1

Um den Einfluss der Taspase1 auf Myosin1F zu untersuchen wurde das Myosin1F-GFP Expressionskonstrukt in Zellen mit unterschiedlichen endogenen Taspase1-Mengen transfiziert. Die Lokalisationsanalysen präsentiert die hauptsächlich membranassoziierte Lokalisation des Myosin1F, in den untersuchten Zelllinien (Abb. 29). Alle Zellen zeigen die zuvor beschriebenen langen fadenförmigen Strukturen an der Zelloberfläche. Diese scheinen bei 293T-Zellen (geringe endogenen Taspase1-Expression) stärker ausgeprägt zu sein, als bei den SW480-Zellen (starke endogen Taspase1-Proteinexpression). Zudem scheint die Lokalisation des Myosin1F-GFP in 293T-Zellen stärker membranassoziiert zu sein, als in SW480-Zellen.

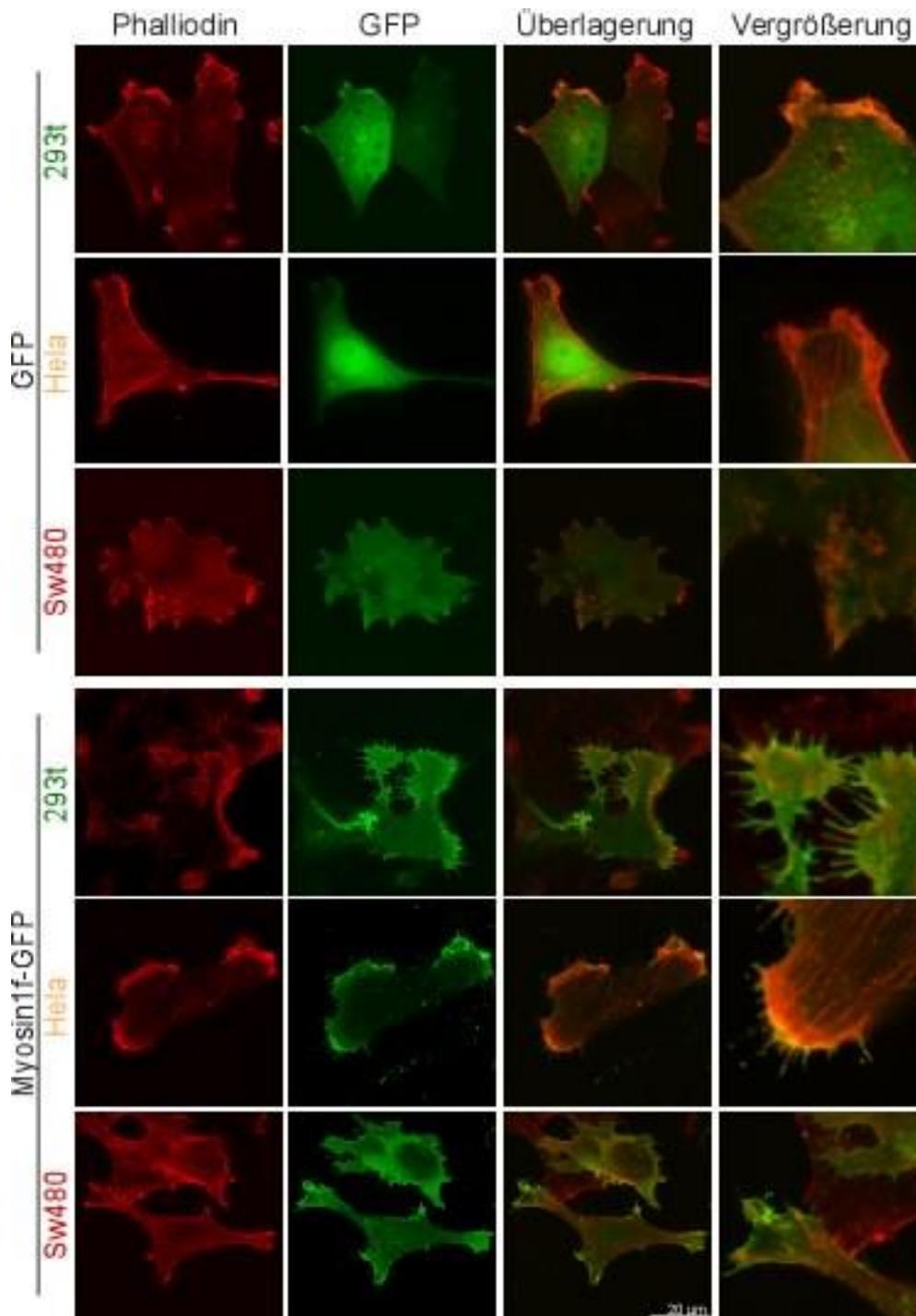


Abb. 29. Einfluss endogener Taspase1-Menge auf die Lokalisation von Myosin1F. Zellen mit unterschiedlicher endogener Taspase1-Proteinexpression wurden mit Myosin1F-GFP transfiziert. Es zeigt sich, dass mit Zunahme der endogenen Taspase1-Menge die membranassoziierte Lokalisation des Myosin1F abnimmt. Zellen mit geringen Taspase1-Proteinmengen (grüne Beschriftung) zeigen eine starke Lokalisation von Myosin1F-GFP an der Zellmembran, während Zellen mit hoher Taspase1-Proteinexpression eine eher zytoplasmatische Lokalisation des Myosin1F zeigen (rote Beschriftung). Zugleich zeigen Zellen mit hoher endogener Taspase1-Expression weniger fingerförmige Strukturen als Zellen mit wenig endogener Taspase1.

Um den Einfluss der Myosin1F-Expression auf die Ausbildung der fingerförmigen Strukturen und die Lokalisation des Myosin1F zu prüfen, wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Mengen Myosin1F-GFP transfiziert. Es zeigt sich, dass die Strukturen bereits bei kleinsten transfizierten DNA-Mengen auftreten und nicht durch die Menge der Proteinexpression beeinflusst werden, während die Membranfärbung aufgrund der stärkeren Proteinexpression zunimmt (Abb. 30 A).

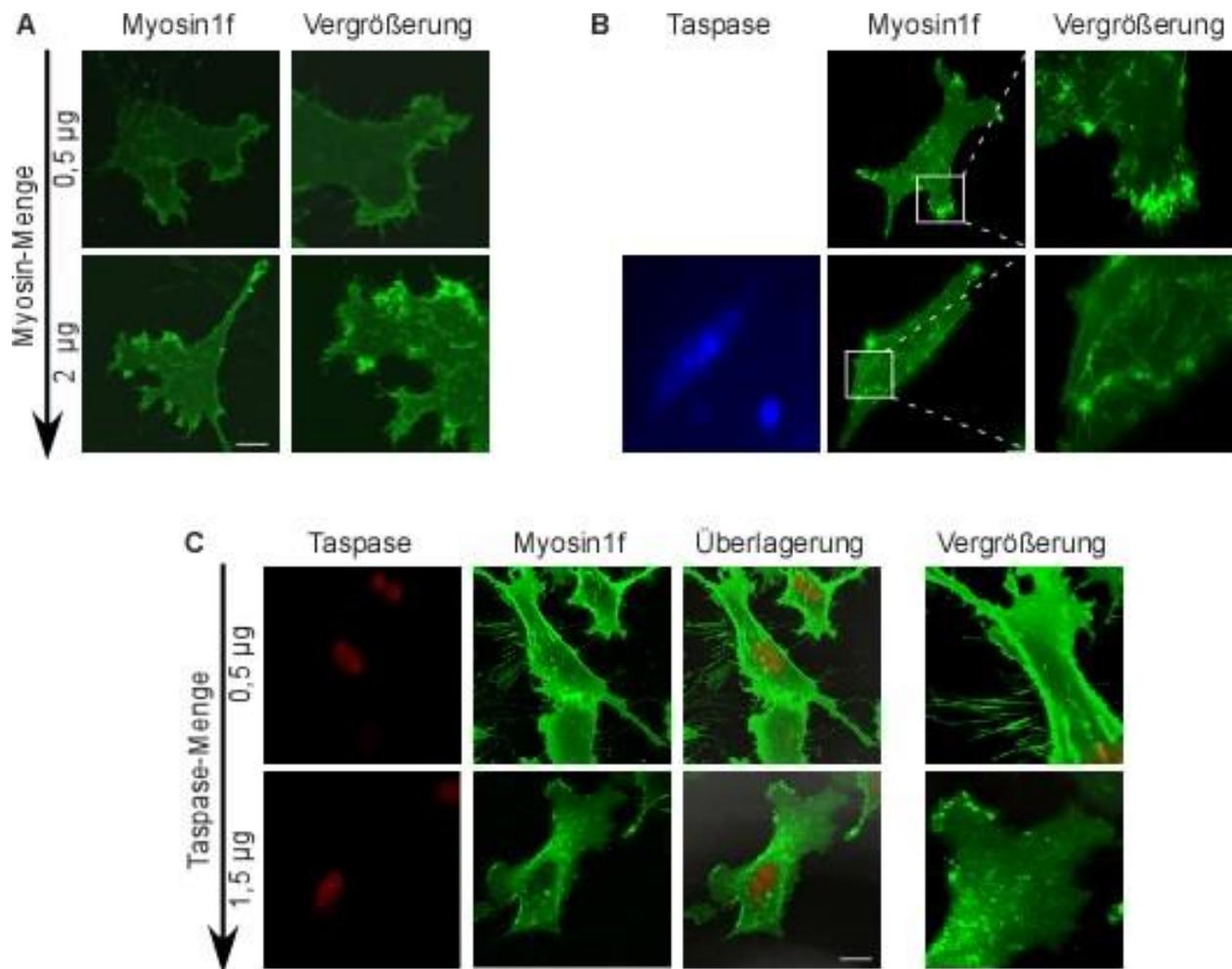


Abb. 30. Taspase1 beeinflusst die Ausbildung fingerförmiger Ausstülpungen durch Myosin1F-GFP an der Zellmembran. (A) HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen von Myosin1F-GFP transfiziert. Die erhöhte Menge Myosin1F-GFP führt nicht zu einer stärkeren Ausbildung der fingerförmigen Strukturen. (B) Die Taspase1-Koexpression führt zur Reduktion der fingerförmigen Strukturen an der Zellmembran. (C) Die Taspase1-Menge beeinflusst den Phänotypen der Myosin1F-Expression. Die konfokale Analyse der Koexpression von Tasp-BFP mit Myosin1F-GFP zeigt, dass die Kombination die Morphologie der Zellen verändert. Maßstab: 10µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Um den Einfluss der Taspase1 auf die Myosin1F-Lokalisation und die Ausbildung der fingerförmigen Strukturen zu prüfen, wurden Hela-Zellen mit Myosin1F-GFP sowie Myosin1F-GFP und Taspase1-BFP transfiziert. Die Auswertung zeigt die starke Ausbildung der fingerförmigen Strukturen bei Expression des Myosin1F-GFP, während die Koexpression von Taspase1 zu die Reduktion der Strukturen führt (Abb. 30 B).

Weiterführend wurde die Hypothese geprüft, dass die endogene Taspase1-Menge einen Einfluss auf die Lokalisation des Myosin1F sowie die Ausbildung der fingerförmigen Strukturen hat. Zu diesem Zweck wurden Hela-Zellen mit Myosin1F-GFP und unterschiedlichen Mengen an Taspase1-mCherry kotransfiziert (Abb. 30 C). Die fadenförmigen Strukturen an der Zelloberfläche sind bei geringen Mengen kotransfizierter Taspase1 ausgebildet und nehmen bei einer Erhöhung der kotransfizierten Taspase1-Menge ab.

4.8 ENTWICKLUNG UND ETABLIERUNG EINER CLEAVAGE-IP

Da die Spaltung des Myosin1F im Gesamtzelllysat aufgrund der hohen Zahl unspezifischer Antikörperbindungen nur unzureichend nachweisbar war, wurde für den anschaulicheren Nachweis eine im Folgenden als „cleavage-IP“ bezeichnete Methode entwickelt und etabliert (Abb. 31 A). Zu diesem Zweck wurden 293T-Zellen mit dem Myc-Myosin1F-GFP Konstrukt transfiziert, lysiert und mit magnetischen GFP- oder Myc-bindenden Beads inkubiert (Abb. 31 A). Der Ansatz wurde auf eine Säule gegeben, die in einem Magnetfeld platziert wurde, sodass die magnetischen Beads und die daran gebundenen Proteine an die Säule arretiert werden. Nicht gebundene Proteine fließen durch (Durchlaufprobe=D) oder werden durch Waschen (W1-Probe) von der Säule entfernt. Auf diese Weise sollte die Isolierung des Myosin1F-Proteins aus dem Gesamtzelllysat erfolgen. Bei Hydrolyse des Myosin1F durch Taspase1 sollte folglich nach Zugabe des Enzyms die eindeutige Detektion des N-terminalen Fragments möglich sein. Für die Spaltung wurde das Lysat von Taspase1-exprimierenden Zellen verwendet sowie die zuvor beschriebenen rekombinanten Taspase1-Proteine (von Johannes van den Boom). Nach der Inkubation auf der Säule wurde der Durchlauf mit der Taspase1 aufgefangen (Durchlauf+Taspase1-Probe) und die Säule erneut gewaschen (W2-Probe).

An der Säule verbleibende Proteine wurden durch Zugabe von Elutionspuffer eluiert (Eluat). Myc-Myosin1F-GFP sowie das C-terminale Spaltprodukt wurden mit GFP-Antikörper detektiert, das N-terminale Spaltprodukt wurde mittels Myc-Antikörper detektiert.

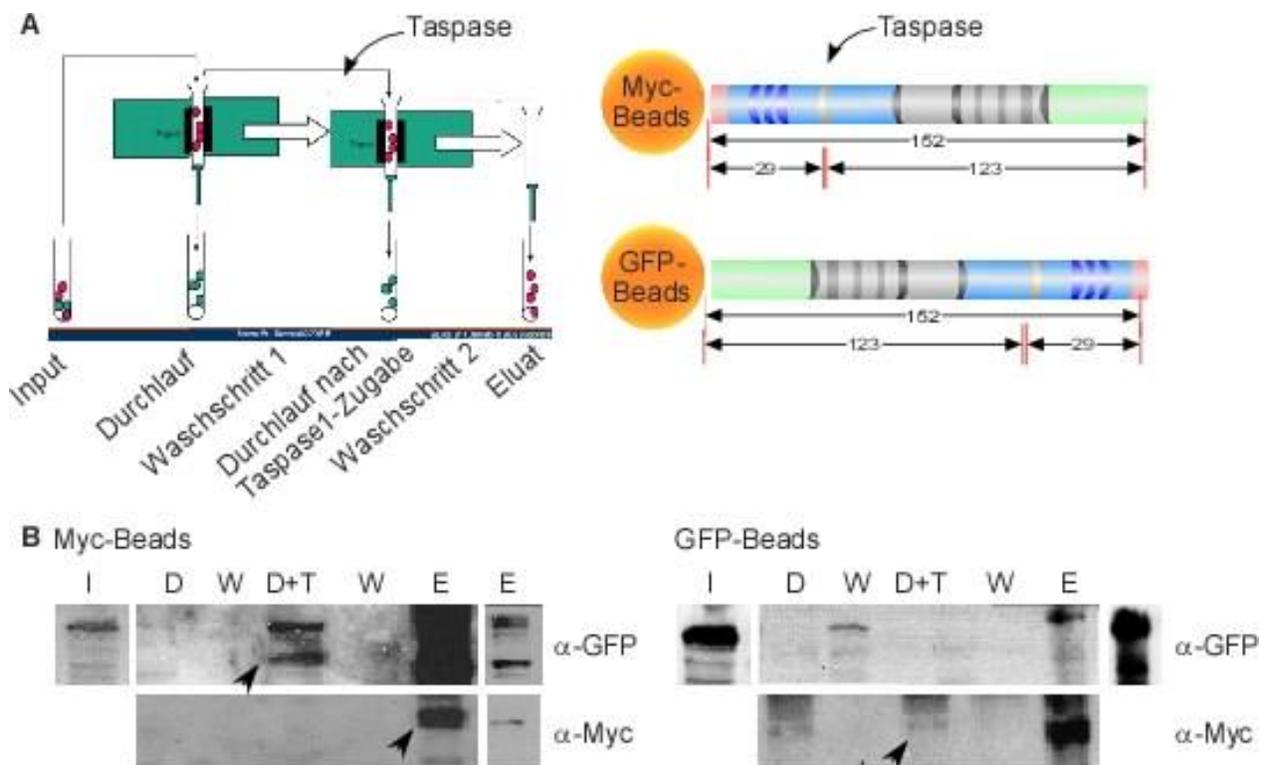


Abb. 31. Etablierung einer Taspase1-cleavage-IP. (A) Myc-Myosin1F-GFP wird in 293-Zellen exprimiert. Das 293T-Zelllysate wird mit GFP- oder Myc-bindenden Beads inkubiert und anschließend auf eine MACS-Säule gegeben. Die Beads und das daran arretierte Protein binden an die Säule, während nicht gebundene Proteine durchfließen. Die Säule wird gewaschen (W1-Waschschrift 1) und Taspase1-Lysat auf die Säule gegeben. Nach Inkubation wird der Durchlauf mit dem Taspase1-Lysat aufgefangen (D+T) und die Säule erneut gewaschen (W2). Anschließend erfolgt die Elution der an die Säule arretierten Proteine. Das Myc-Myosin1F-GFP kann sowohl an GFP- als auch an Myc-bindende Beads gebunden werden. (B) Die Durchführung mit Gesamtzelllysaten zeigt die Spaltung des Myc-Myosin1F-GFP bei Zugabe von Taspase1-Lysat. Bei Bindung des Myc-Myosin1F-GFP durch Myc-Beads wird das C-terminale Fragment abgespalten und kann mit GFP-Antikörper in der D+T-Fraktion detektiert werden. Das N-terminale Fragment bleibt an der Säule gebunden und ist im Eluat mit Myc-Antikörper zu detektieren. Bei der Bindung des Myosin1F an GFP-Beads wird das N-terminale Fragment abgespalten und kann per Myc-Antikörper in der D+T-Fraktion detektiert werden. Das C-terminale Fragment bleibt an der Säule gebunden und ist im Eluat über GFP-Antikörper detektierbar. Ein großer Teil des N-terminalen Spaltprodukts ist jedoch im Eluat detektierbar.

Myc-Myosin1F-GFP ist in 293T-Zellen im Input detektierbar (Ab. 31 B), der als Ausgangsfraktion (Input) für die Affinitätschromatographie dient. Nach Arretierung des Myc-Myosin1F-GFP auf der Säule und Inkubation mit Taspase1 ist in den Durchlauf fraktionen neben der Bande auf Höhe von 150 kDa eine Bande auf Höhe von ca. 120 kDa detektierbar, die dem Molekulargewicht des C-terminalen Spaltprodukts entspricht. Der an den Beads verbleibende Myc-markierte N-Terminus des Myosin1F ist nach Elution von der Säule im Eluat detektierbar.

Bei Verwendung GFP-bindender Beads ist nach Zugabe von Lysat Taspase1 exprimierender Zellen im Durchlauf (D+Tasp) eine Bande von ca 30 kDa detektierbar, die dem Molekulargewicht des N-terminalen Spaltprodukts entspricht. Das C-terminale Fragment bleibt bis zur Elution an die Säule gebunden. Eine Bande von 120 kDa, die dem verbliebenen C-terminalen Fragment entspricht, ist entsprechend im Eluat detektierbar. Bei Verwendung der rekombinanten Taspase1-Proteine wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

4.9 UNTERSUCHUNG DES MYOSIN1F HINSICHTLICH EINES MÖGLICHEN KERN-EXPORT-SIGNALS (NES)

Bereits 1997 konnte eine Isoform des Myosin1 im Zellkern beschrieben werden. So wurde eine N-terminale Peptidsequenz des Myosin1C gefunden, die im Zellkern mit der RNA-Polymerase II kolokalisiert.

Da mit Hilfe von Expressionskonstrukten gezeigt werden konnte, dass sowohl das N-terminale Spaltprodukt, als auch ein Teil der Motordomäne im Zellkern lokalisieren, sollte im Folgenden die nähere Analyse hinsichtlich möglicher Kernexportsignale vorgenommen werden.

4.9.1 CHEMISCHE EXPORTINHIBITION

Für die Untersuchung möglicher Kernexportsignale im Myosin1F wurden HeLa-Zellen mit Myosin1F-GFP, Myosin1F-mut-GFP, dem C-terminalen und dem N-terminalen Spaltprodukt transfiziert. Nach 24-stündiger Expression wurden die Zellen mit dem Exportinhibitor LMB behandelt. LMB hemmt Crm1, das den Kernexport von Proteinen mit Kernexportsequenz (NES) katalysiert. Die Einflüsse auf die zelluläre Verteilung wurden über einen Zeitraum von 24 h konfokalmikroskopisch verfolgt. Die dargestellten Resultate zeigen, dass die Behandlung mit LMB keinen Einfluss auf die Lokalisation des Myosin1F und die Mutante ausübt (Abb. 32 A). Sowohl ohne LMB (t=0) als auch nach 5-stündiger LMB-Behandlung sind die Konstrukte an der Membran und im Zytoplasma lokalisiert.

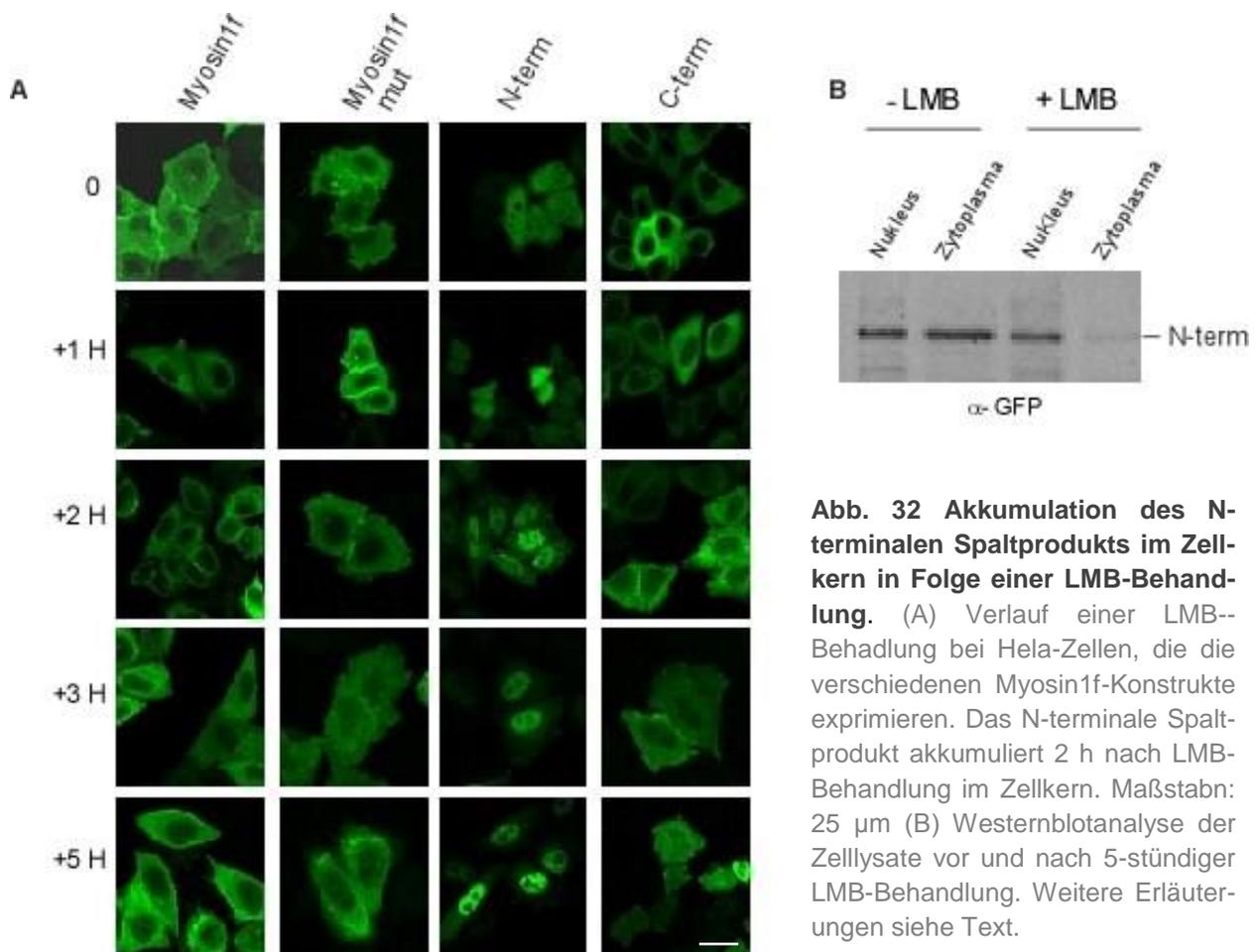


Abb. 32 Akkumulation des N-terminalen Spaltprodukts im Zellkern in Folge einer LMB-Behandlung. (A) Verlauf einer LMB-Behandlung bei HeLa-Zellen, die die verschiedenen Myosin1f-Konstrukte exprimieren. Das N-terminale Spaltprodukt akkumuliert 2 h nach LMB-Behandlung im Zellkern. Maßstab: 25 µm (B) Westernblotanalyse der Zelllysate vor und nach 5-stündiger LMB-Behandlung. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Der Kern ist weiterhin ausgespart. Für das C-terminale Spaltprodukt nimmt die Fluoreszenz im Zellkern nach LMB-Behandlung leicht zu. Während die Kerne vor der Behandlung von der Färbung ausgespart waren, ist nach 5-stündiger Behandlung eine leichte Kernfärbung zu erkennen. Für das N-terminale-Spaltkonstrukt kann die starke Akkumulation im Kern in Folge der LMB-Behandlung beobachtet werden. Bereits ohne LMB Behandlung ist das Konstrukt zum Teil im Kern lokalisiert, es liegt jedoch eine Gleichverteilung mit dem Zytoplasma vor. Eine Stunde nach Inhibierung des Kernexports kann die Verlagerung des Fluoreszenzsignals in den Kern beobachtet werden. Nach 2 h ist die deutliche Akkumulation im Kern erkennbar und nach 5 h ist kaum noch grüne Fluoreszenz im Zytoplasma detektierbar. Der Effekt auf das N-terminale Spaltprodukt durch die Behandlung mit LMB auf die Lokalisation konnte durch Westernblotanalyse verifiziert werden. Für die Detektion des N-terminalen Spaltprodukts wurde GFP-Antikörper verwendet. Ohne Behandlung mit LMB sind gleiche Mengen des Proteins in Kern und Zytoplasma vorzufinden. Nach Behandlung mit LMB ist das Protein fast ausschließlich im Zellkern detektierbar (Abb. 32 B).

4.9.2 *BIOINFORMATISCHE ANALYSE MÖGLICHER LOKALISATIONSSIGNALE*

Aufgrund der zuvor beschriebenen Akkumulation des N-terminalen Spaltproduktes im Zellkern in Folge einer LMB Behandlung, lag die Vermutung nahe, dass sich ein LMB-sensitives Kernexportsignal im Myosin1F befindet. Aus diesem Grund wurde die Myosin1F-Sequenz hinsichtlich einer hydrophoben besonders Leucin-reichen Sequenz untersucht, wie sie typisch für Kern-Export-Signale (NES) ist. Dazu wurde die Sequenz des Myosin1F mit dem NES-Finder2.0 hinsichtlich eines möglichen Kernexportsignals untersucht. Insgesamt wurden 12 potenzielle NES-Sequenzen gefunden, wovon zwei vor der Taspase1-Schnittstelle und damit im N-terminalen Spaltprodukt der Taspase1-Spaltung vorzufinden sind. Dementsprechend werden bei den folgenden Analysen nur die ersten beiden potenziellen NES untersucht und die weiteren 12 vernachlässigt, da sie für einen putativen Export des N-terminalen Spaltprodukts nicht relevant sind.

A

MEQKLISEEDLGTGSKERFWQSHNVKQSGVDDMVLLP
 QITEDAIAANLRKRFMDDYIFTYIGSVLISVNPFFKQMPYFT
 DREIDL YQGA AQYENPPHIYALTDNMYRNMLIDCENQCV
 IISGESGAGKTVA AKYIMGYISKVSGGGEKVQHVKDIILQS
 NPLLEAFGNAKTVRNNSSRF GK YFEIQFSRGGEPDGG
 KISN F LLEKSRVVMQNE NERNFHIYYQLLEGASQEQRQN
 LGLMTPDY YYYLNQSDTY **QVDGTD**RSDFGETLSAMQV
 IGIPPSIQQLVLQLVAGILHLGNISFCEDGNYARVESVDLL
 AFPAYLLGIDSGRLQEKLTSRKMDSRWGGRSESINVTLN
 VEQAAYTRDALAKGLYARLFDLVEAINRAMQKPQEEYS
 IGVLDIYGFEIFQKNGFEQFCINFVNEKLQQIFIETLTKAEQ
 EYYVQEGIRWTPIQYFN NKVVCDLIENKLSPPGIMSVLDD
 VCATMHATGGGADQTL LQKLQAAVGTHEHFNSWSAGFV
 IHYAGKVS YDVSGFCERNRDLVFSDLIELMQTSEQAFL
 RMLFPEKLDGDKKGRPSTAGSKIKKQANDLVATLMRCT
 PHYRICKPNETKRPRDWEENRVKHQVEYLG LKENIRVR
 RAGFAYRRQFAKFLQRYAILTPETWPRWRGDERQGVQ
 HLLRAVNMEPDQYQMGSTKVFVKNPESLFLLEEVRERK
 FDGFARTIQKAWRRHVAVRKYEEMREEASNILLNKERR
 RNSINRNFVGDYLGLEERPELRQFLGKRERVDFADSVTK
 YDRRFKPIKRD LILTPKCVYVIGREKVKKGPEKGQVCEVL
 KKKVDIQALRGVSLSTRQDDFFILQEDAADSFLSVFKTE
 FVSL LCKRFEEATRRLPLTFSDTLQFRVKKEGWGGGG
 TRSVTF **SRGFGDLAVLKV**GGRTLT VSVGDGLPKSSKPT
 RKGMAKGKPRRSSQAPTRAAPAPPRGMDRNGVPPSAR
 GGPLPLEIMSGGGTHRPPRPPSTSLGASRRPRARPPS
 EHNTFLNVPDQGMAGMQRKRSVGRPVPGVGRPKPQ
 PRTHGPRCRALYQY **VGQDVDELSF**NVNEVIEILMEDPSG
 VVWKGRHLHGQEGFLFPGNYVEKI

B

Start position	Sequenz	Pot. NES
44	IFTYIGSVLISV	
135	VQHVKDIIL	
256	TLSAMQVIGI	2-2-1
274	LQLVAGILHL	2-3-1
279	GILHLGNISF	2-2-1
296	RVESVDLLAF	2-2-1
383	GVLDIYGFEI	2-2-1
410	LQQIFIETL	3-2-1
601	VKHQVEYLGL	3-2-1
894	FSRFGDLAV	3-2-1
897	GFGDLAVLKV	2-2-1
1053	VGQDVDELSF	3-2-1

C

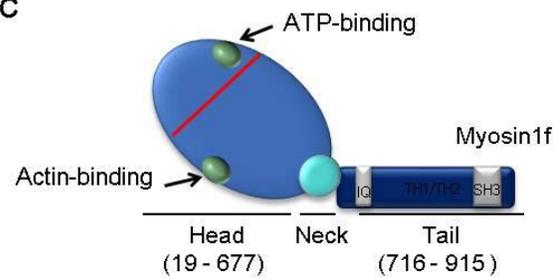


Abb. 33. Untersuchung der Myosin1F-Sequenz hinsichtlich potenzieller NES-Sequenzen. Die Analyse der Myosin1F-Sequenz (A) mit dem NES-Finder 2.0 ergab 12 potenzielle NES-Sequenzen (B), von denen zwei vor der Taspase1-Schnittstelle und damit im N-terminalen Spaltprodukt lokalisiert sind. Grün: untersuchte Sequenzen, Rot: Taspase1-Schnittstelle

4.9.3 PROTEINEXPRESSION UND MIKROINJEKTION

Aufgrund der Vermutung, dass es sich bei den beiden hydrophoben besonders Leucinreichen Sequenzen vor der Taspase1-Schnittstelle um ein NES handelt, wurden bakterielle pGEX-GST-NES-GFP-Expressionskonstrukte erstellt. Durch Oligo-Annealing wurden Inserts der beiden NES-Sequenzen mit BamHI und NheI-Schnittstelle generiert, sodass diese *in frame* in den BamHI/NheI-Verdauten pGex-Vektor zwischen das bereits enthaltene GST-Tag und GFP-Tag integriert werden konnten. Die so generierten pGEX-GST-NES-GFP-Plasmide wurden in *E. coli* Bakterien des Stammes BL21 transformiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch IPTG. Nach erfolgreicher Proteinexpression wurden die rekombinanten GST-GFP-Fusionsproteine über

Glutathion-Sepharose isoliert und zur Reinigung über Nacht dialysiert. Die Mikroinjektion der rekombinanten Proteine erfolgte in den Zellkern von Vero-Zellen und wurde anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie über den Zeitraum von 24 Stunden beobachtet und dokumentiert. Die aufgezeichnete Kinetik (Abb. 34) zeigt keine Translokation des rekombinanten NESI aus dem Zellkern in das Zytosol. Sowohl unmittelbar nach der Injektion in den Zellkern ($t=0$), als auch nach 3 und 24 h (Daten nicht gezeigt) ist das rekombinante Protein im Kern der Zelle lokalisiert. Für das rekombinante NESII-Protein (zweites putatives NES) kann hingegen die partielle Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Zelle nach zwei Stunden festgestellt werden.

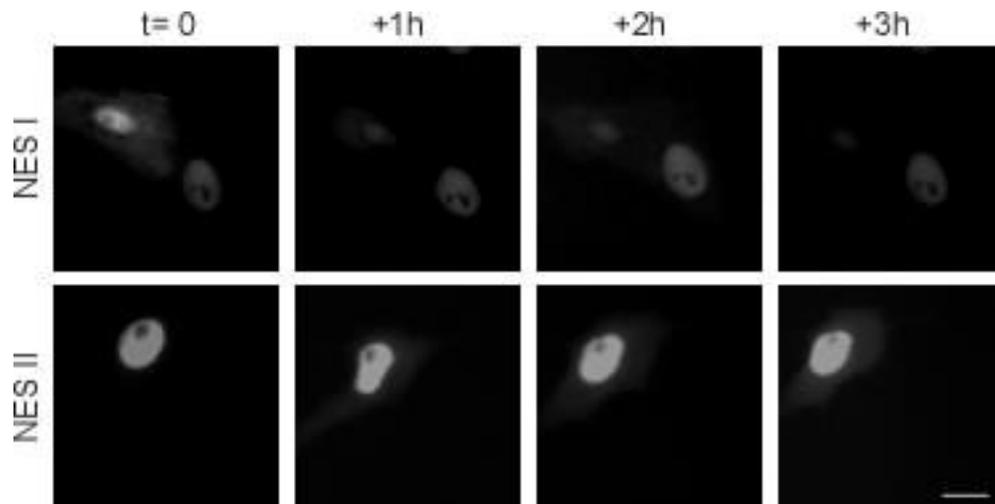


Abb. 34. Export des rekombinanten Myosin1F-NESII aus dem Zellkern. Zeitkinetik des ersten (NESI) und zweiten (NESII) potenziellen rekombinanten NES von Myosin1F in Fusion mit GFP und GST nach Mikroinjektion in den Zellkern im Abstand von einer Stunde. Maßstab: 20 μ m. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.10 MYOSIN1F-LOKALISATION WÄHREND MITOSE UND ZELLTEILUNG

Bereits 2007 konnte der Einfluss von Myosin16b auf die verzögerte Progression der S-Phase des Zellzyklus sowie eingeschränkte Zellteilung gezeigt werden (Cameron *et al.* 2007). Später wurde für Myosin16b die regulatorische Rolle bei der Zellzyklus-

progression nachgewiesen. RNA- und Proteinmenge sind zellzyklusspezifisch geregelt, und der Myosin16b-Mangel führt zu Veränderungen der Zellzyklusphasen (Cameron *et al.* 2013). Zudem ist bekannt, dass bei tierischen Zellen während der Telophase ein kontraktile Ring aus Aktinfasern gebildet wird, der zusammen mit Myosin verengt wird, bis die Plasmamembranen der Tochterzellen fusionieren und diese sich voneinander trennen. Die Kontraktion verläuft analog zur Muskelkontraktion über den sogenannten molekularen Ruderschlag, bei dem sich die Filamente gegeneinander verschieben.

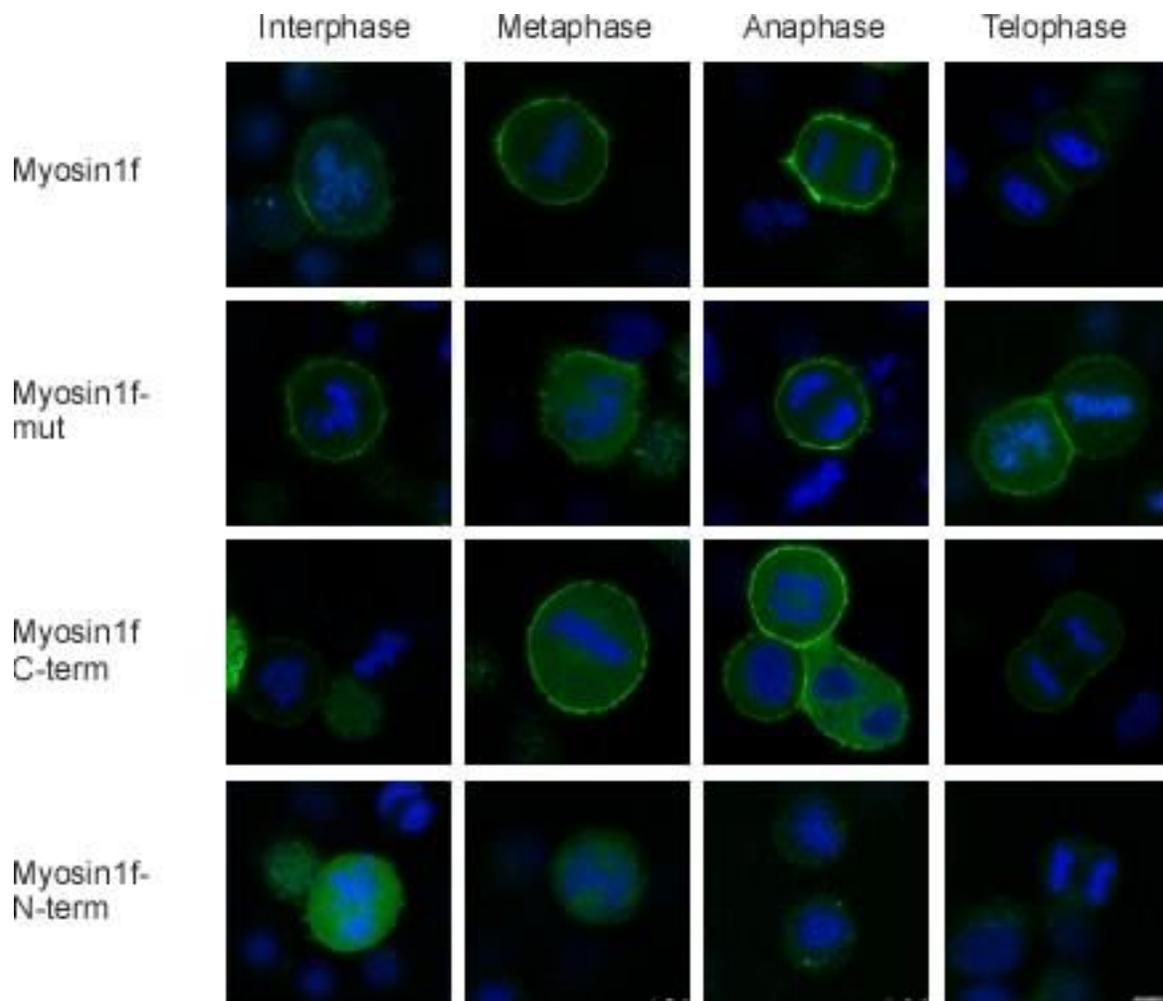


Abb. 35. Lokalisation der Myosin1F-Konstrukte während der Mitose. Im Mitose-Stadium synchronisierte HeLa-Zellen wurden mit den verschiedenen Myosin1F-GFP-Konstrukten transfiziert und die Lokalisation der Konstrukte während der Mitose untersucht. Sowohl Myosin1F-GFP, als auch Myosin1F-mut-GFP und das C-terminale Spaltprodukt lokalisieren während der Mitose an der Zellmembran. Das N-terminal Spaltprodukt zeigt hingegen zytoplasmatische Lokalisation. Maßstab: 25 µm

Da das N-terminale Fragments von Myosin1F im Zellkern nachgewiesen wurde, sollte Myosin1F hinsichtlich der Lokalisation und potenziellen Funktionen während der Zellteilung untersucht werden. Hierzu wurden Hela-Zellen mit Myosin1F-GFP, Myosin1F-mut-GFP sowie den Konstrukten der Spaltprodukte transfiziert. Die Zellen wurden nach erfolgreicher Transfektion durch Thymidin-Block in der S-Phase des Zellzyklus arretiert, um die Zahl der mitotischen Zellen zu erhöhen. Die Lokalisationsanalyse der Konstrukte erfolgte mit Konfokalmikroskopie. Myosin1F-GFP, Myosin1F-mut-GFP und das Konstrukt des C-terminalen Spaltprodukts lokalisieren in allen Mitosestadien an der Zellmembran. Das das N-terminale Spaltprodukt ist im Zytoplasma lokalisiert.

Bei Myosin1F sowie der spaltungsdefizienten Mutante fiel im weiteren Verlauf der Mitose die Konzentration der grünen Fluoreszenz bei Trennung der Tochterzellen an den Kontaktstellen zwischen den Zellen auf (Abb. 36). Diese Lokalisation entspricht dem beschriebenen kontraktilen Ring auf Höhe der Metaphaseplatte.

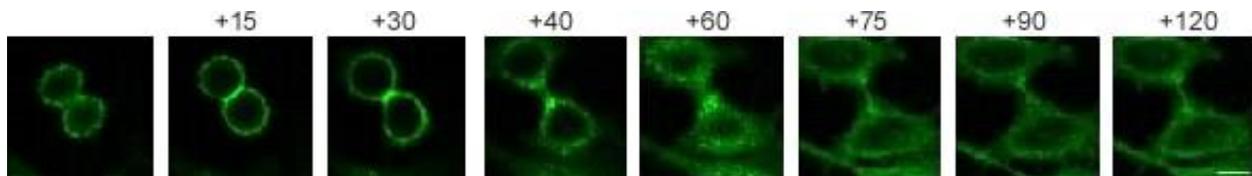


Abb. 36. Lokalisation von Myosin1F während der Zellteilung. Dargestellt ist die Zellteilung Myosin1F-exprimierender Hela-Zellen. Die dargestellte Kinetik zeigt den Verlauf der Zellteilung im Abstand von 15 Min. Die grüne Fluoreszenz des Myosin1F-GFP konzentriert sich bei Trennung der Tochterzellen an den Kontaktstellen zwischen den Zellen. Weitere Erläuterungen siehe Text. Maßstab: 25µm

4.11 UNTERSUCHUNG DER MYOSIN1F-AKTIN-INTERAKTION

Da Myosine eine Aktinbindestelle besitzen und aus diesem Grund als Aktin-abhängige Motorproteine bekannt sind, wurde die Interaktion des Myosin1F mit Aktin untersucht. Durch Expression des Myosin1F-GFP und anschließender Färbung der Zellen mit Phalloidin wurde die Kolokalisation der beiden Proteine festgestellt (Abb. 37).

Die Immunpräzipitation (IP) der Proteine ergab, dass das Aktin-RFP Konstrukt unspezifisch an die Säule band, sodass mit dieser Methode keine Aussage über die Interaktion der rekombinanten Proteine getroffen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Um die Interaktion beider Proteine dennoch zu untersuchen, wurden die IP mit endogenen Proteinen vorgenommen. Myosin1F-GFP wurde im Input- (I) als auch im Eluat (E) gezeigt (Abb. 37). Daraus lässt sich auf die erfolgreiche Expression sowie die erfolgreiche Bindung des Proteins an die Beads schließen. Die Lysate fungierten als Input für die IP, bei der Myosin1F-GFP über GFP-Antikörper aus den Gesamtzelllysaten isoliert wurde. Endogenes Aktin konnte in den Gesamtzelllysaten (Input) der Myosin1F-GFP exprimierenden Zellen sowie in den Kontrolllysaten der untransfizierten Zellen auf Höhe von 42 kDa detektiert werden. Nach Elution mit Elutionspuffer von der Säule wurde in den Eluaten der mit Myosin1F transfizierten Zellen eine sehr schwache Bande auf Höhe von 42 kDa nachgewiesen.

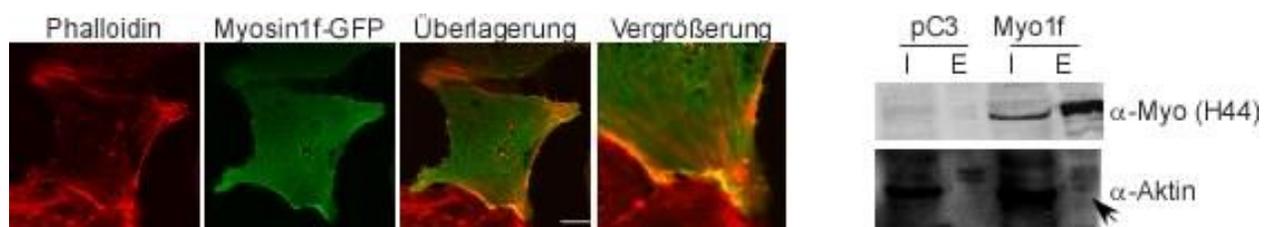


Abb. 37. Myosin1F interagiert mit Aktin. Myosin1F transfizierte Zellen wurden mit Phalloidin gefärbt und zeigen die Kolokalisation der Proteine. Um die Interaktion beider Proteine zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit Myosin1F-GFP transfiziert und nach 24-stündiger Expression eine IP vorgenommen. Endogenes Aktin konnte sowohl in den Gesamtzelllysaten (Input, I) mit Myosin1F-GFP, als auch in den Kontrolllysaten der untransfizierten Zellen detektiert werden. Diese Lysate fungierten als Input (Spur 1 und 3, rechte Abb.) für die IP. Während im Eluat der Kontrolle (Spur 2 / E pC3) kein Aktin detektiert werden konnte, konnte im Eluat der Myosin1F transfizierten Zellen (Spur 4 / E pC3) eine sehr schwache Bande detektiert werden. Myosin1F wurde mit Myosin1F-H44-Antikörper detektiert. Aktin wurde mit Aktin-Antikörper detektiert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.12 INTERAKTION VON MYOSIN1F MIT PAXILLIN

Nachdem die Interaktion von Myosin1F mit Aktin gezeigt wurde, wurde weiterführend die mögliche Interaktion mit Paxillin untersucht, da Paxillin ein wichtiges Adaptorprotein in der Signaltransduktion darstellt. Über die direkte Verbindung ist es mit dem zytoplasmatischen Teil des β -Integrinrezeptors assoziiert und bindet an eine Vielzahl verschiedener Proteine wie Thyrosin-Kinasen, Src, und Fetal-Adhesion-Kinase. Außerdem bindet es Strukturproteine wie Vinculin und trägt zu einer Regulation der Aktinorganisation bei. Die Kolokalisations- sowie Interaktionsstudie von Myosin1F und Paxillin sollte helfen Einblicke in die Funktion des Myosin1F zu gewinnen. Die Analyse der möglichen Kolokalisation (Abb. 38 A) zeigt die tiefrote Fluoreszenz des Fusionsproteins Paxillin-mKate mit und ohne Kotransfektion von Myosin1F-GFP an der Zellmembran (Abb. 38 A) von Hela-Zellen. Die Überlagerung mit der grünen Fluoreszenz des Myosin1F-GFP zeigt die Kolokalisation der Proteine. Im nächsten Schritt sollte eruiert werden, ob die Kolokalisation von Myosin1F und Paxillin möglicherweise das Resultat einer Interaktion der beiden Proteine ist. Zu diesem Zweck wurde eine IP vorgenommen. Die Detektion des Myosin1F unter Verwendung des H44-Antikörpers zeigt, die Bande auf Höhe von ca 150 kDa, in den Lysaten der Myosin1F-GFP sowie den Myosin1F-GFP und Paxillin-mKate koexprimierenden Zellen. Die Detektion des Paxillin erfolgte mit Paxillin-Antikörper und führte zur Detektion der Bande auf Höhe von ca. 95 kDa im Lysat der Paxillin sowie den Myosin1F-Paxillin koexprimierenden Zellen. Die Expression des Paxillin in den kotransfizierten Zellen ist verglichen mit den nur Paxillin exprimierenden Zellen sehr schwach (Abb. 38 B).

Myosin1F wurde in den Eluaten der Myosin1F-GFP sowie den Myosin1F-GFP und Paxillin-mKate koexprimierenden Zellen detektiert. Dies lässt auf die erfolgreiche Bindung des Myosin1F an die Beads schließen. Paxillin-mKate ist im Eluat ebenfalls in den Paxillin und den Myosin1F-Paxillin koexprimierenden Zellen detektierbar, was auf die unspezifische Bindung des Paxillin-mKate an die GFP-Beads hindeutet (Abb. 38 B). Aus diesem Grund wurden die Proben hinsichtlich endogenem Paxillin (68 kDa) untersucht. Die Analyse präsentiert eine Bande auf Höhe von ca. 68 kDa bei Verwendung von Paxillin-Antikörper (Abb. 38 C) in den Myosin1F-GFP enthaltenden Proben. Im Kontrollansatz ohne Myosin1F-GFP ist diese Bande nicht nachweisbar.

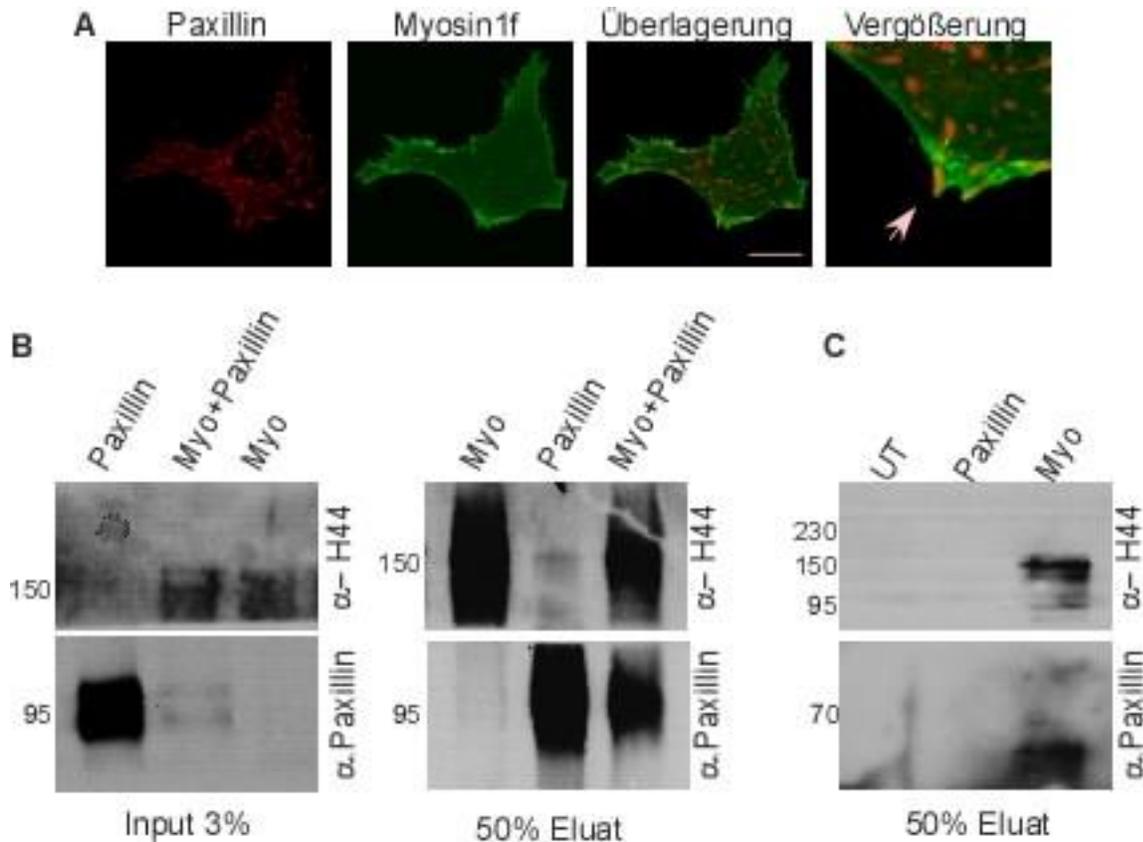


Abb. 38. Interaktion von Myosin1F mit Paxillin. A) Konfokalmikroskopische Analyse von Myosin1F-GFP und Paxillin-mKate. Die Überlagerung von grüner und roter Fluoreszenz zeigt die Kolokalisation beider Proteine an der Zellmembran. (B) Die Interaktion von Myosin1F und Paxillin wurde mittels IP untersucht. Paxillin-mCh bindet unspezifisch auch ohne vorherige Arretierung von Myosin-GFP an die GFP-Säule. (C) Mit Paxillin-Antikörper konnte endogenes Paxillin (68 kDa) im Eluat des immunpräzipitierten Myosin1F-GFP detektiert werden, was die Interaktion der beiden Proteine impliziert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.13 INTERAKTION VON MYOSIN1F UND RAC1

In Verbindung mit den beschriebenen Ausstülpungen an der Membran und der Interaktion mit Aktin und Paxillin sollte Myosin1F hinsichtlich seiner Rolle bei der Ausbildung von Lamellipodien untersucht werden. Kleine GTP-asen der Rho-Familie, wie Rac1, Cdc42 und RhoA konnten bereits als maßgeblich an der Reorganisation des Zytoskeletts beschrieben werden. Rac1 beansprucht dabei eine maßgebliche Rolle bei der Ausbildung von Lamellipodien.

Zur Untersuchung der Funktion des Myosin1F in der Reorganisation des Zytoskeletts sowie der Zellmigration wurde die Kotransfektion von Myosin1F-GFP mit mCh-markierten Rac1-Expressionskonstrukten vorgenommen. Es wurde das Konstrukt der Wildtypform des Rac1 verwendet und ein Rac1-Konstrukt das durch eine Q->L Mutation die konstitutiv aktive Form des Rac1 simuliert. Die Resultate zeigen die Kolokalisation des Myosin1F-GFP mit der Wildtypform des Rac1 und der konstitutiv aktiven Mutante in den fingerförmigen Strukturen an der Zellmembran (Abb. 39). Es scheint jedoch die stärkere Kolokalisation bei Kotransfektion der aktiven Mutante vorzuliegen.

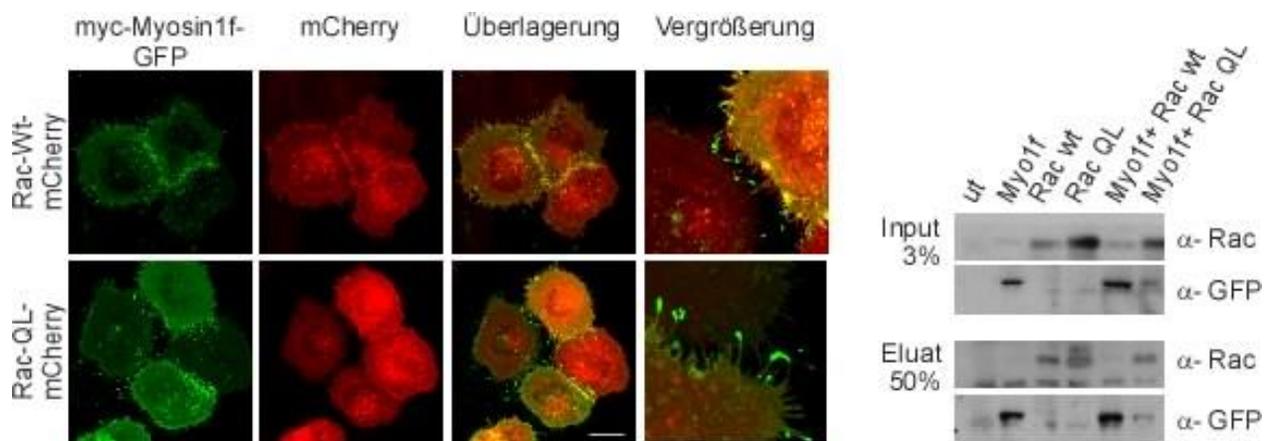


Abb. 39. Kolokalisation von Myosin1F mit Rac1. Der rechte Teil zeigt die Koexpression von Myosin1F und Rac1-mCh, sowie der aktiven Form des Rac1 (Rac1QL). Durch Konfokalmikroskopie konnte die Kolokalisation beider Proteine festgestellt werden (rechter Teil). Die Interaktion wurde durch IP untersucht. Rac-wt und Rac-QL wurden mit Rac-Antikörper detektiert. Myosin1F-GFP wurde mit GFP-Antikörper detektiert. Rac-QL und Rac-wt konnten sowohl in An- und Abwesenheit von immunpräzipitierten Myosin1F-GFP im Eluat detektiert werden, was die unspezifische Wechselwirkung mit der Säulenmatrix impliziert. Maßstab: 25µm. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Aufgrund dieser Kolokalisation wurde die Interaktion der Proteine untersucht werden. Dazu wurden 293T-Zellen mit Myosin1F-GFP in An- und Abwesenheit von Rac1-wt und Rac1QL transfiziert. Nach erfolgreicher Proteinexpression wurden die Zellen lysiert und eine Ko-IP vorgenommen. Mit GFP-Antikörper wurde Myosin1F-GFP auf Höhe von ca. 150 kDa im Input und den Eluaten der Myosin1F-GFP enthaltenden Lysate detektiert. Die Detektion der Rac1-Konstrukte erfolgte mit Rac-Antikörper und zeigt diese auf Höhe von

ca. 50 kDa im Input der mit Rac1 transfizierten Zellen (Abb. 39) sowie in den Eluaten mit und ohne Myosin1F. Dies deutet auf die unspezifische Bindung der Rac1-Konstrukte an die GFP-Beads hin, wodurch die Aussage über die Interaktion mit Myosin1F nicht möglich war. Der Nachweis von endogenem Rac1 war aufgrund mangelnder Antikörperspezifität ebenfalls nicht zweifelsfrei möglich (Daten nicht gezeigt).

4.14 INTERAKTION VON MYOSIN1F UND CDC42

Aufgrund der Myosin1F-Untersuchungen hinsichtlich einer Funktion bei der Filopodienausbildung sollte in Folge der ermittelten Kolokalisation mit Rac1 eine mögliche Interaktion mit Cdc42 geprüft werden. Ebenso wie bei Rac handelt es sich bei Cdc42 um eine kleine GTP-ase der Rho-Familie. Cdc42 hat aktivierende Wirkung auf den Arp2/3 Komplex, was zur Ausbildung von Endosomen führt. Analog zu den Kolokalisations- und Interaktionsstudien mit Rac1 wurden die Kolokalisation und Interaktion mit Cdc42 untersucht. Auch in diesem Fall wurde das Wildtyp-Konstrukt sowie das Konstrukt mit einer Q->L Mutation verwendet. Die Kotransfektion von GFP-markierten Myosin1F mit mCh-markierten Cdc42 Expressionskonstrukten zeigt die Kolokalisation des Myosin1F mit wt-Cdc42 und der Cdc42-Mutante in den fingerförmigen Strukturen an der Zelloberfläche. Zudem scheint auch in diesem Fall eine stärkere Kolokalisation mit der aktiven Mutante im Vergleich mit der Wildtypform vorzuliegen. Die potenzielle Interaktion wurde wie zuvor beschrieben durch Ko-IP untersucht. Die Detektion der Cdc42-Konstrukte erfolgte mit Cdc42-Antikörper. Myosin1F wurde mit GFP-Antikörper detektiert. Cdc42 ist auf Höhe von ca. 50 kDa im Input der mit Cdc42 transfizierten Zellen nachweisbar. Myosin1F wurde in den mit Myosin1F transfizierten Zellen durch Detektion der entsprechenden Bande auf Höhe von ca. 150 kDa nachgewiesen. Die Bande ist ebenfalls in den Eluaten der mit Myosin1F-GFP transfizierten Zellsaten detektierbar, was die Bindung des Myosin1F GFP-Konstrukts an die GFP-Beads bestätigt. Der Nachweis von Cdc42QL wurde im Eluat der mit Myosin1F und Cdc42-QL transfizierten Zellen erbracht, wodurch die Interaktion von Myosin1F mit der konstitutiv aktiven Form des Cdc42 vermutete werden kann.

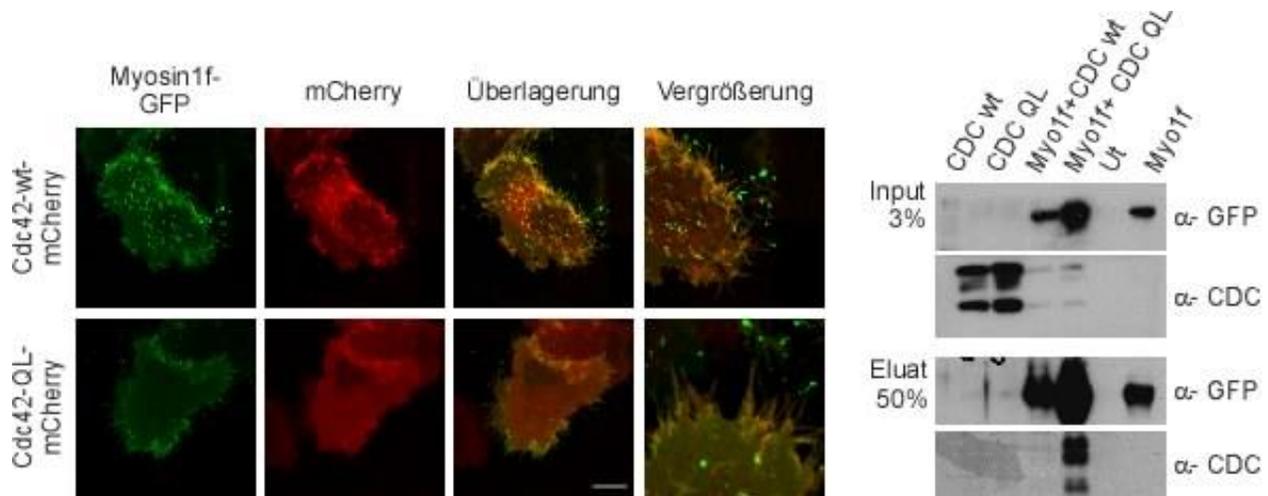


Abb. 40. Interaktion von Myosin1F mit Cdc42-QL. Das rechte Panel zeigt die Koexpression von Myosin1F und Cdc42-mCh. Durch Konfokalmikroskopie kann die Kolokalisation beider Proteine festgestellt werden. Die Interaktion wurde durch IP untersucht. Cdc42-wt und Cdc42-QL wurden mit Cdc42-Antikörper detektiert. Myosin1F wurde mit GFP-Antikörper detektiert. Cdc42-QL und Cdc-wt konnten mit und ohne Koexpression von Myosin1F im Input detektiert werden. Im Eluat wurde hingegen nur die Bande bei Koexpression von Myosin1F mit Cdc42-QL detektiert. Weitere Erläuterungen siehe Text.

4.15 INVOLVIERUNG IN ZELLULÄRE SIGNALWEGE

Aufgrund der Hinweise auf die Involvierung des Myosin1F in die Filopodienausbildung sollte im Folgenden eine Untersuchung möglicher involvierter zellulärer Signalkaskaden erfolgen. Bezug nehmend auf die membranassoziierte Lokalisation und die potenzielle Funktion in den Filopodien der Zelle wurde hierzu die mögliche Involvierung in Integrin-abhängige Signalwege sowie die PI3-Kinase vermittelte Signaltransduktion und EGF-abhängige Regulationsmechanismen untersucht.

4.15.1 INVOLVIERUNG DES MYOSIN1F IN INTEGRIN-VERMITTELTE SIGNALWEGE

Integrine besitzen bedeutende Funktion für die Zellenadhäsion sowie die Ausbildung von Filopodien. Zudem wurde 2004 vorgeschlagen, dass Integrine von unbekanntem Myosinen transportiert werden und damit zum zellulären Umbau beitragen. Daraufhin

konnte die Interaktion zwischen dem unkonventionellen Myosin-X mit der zytoplasmatischen Domäne des β -Integrin gezeigt werden. Weiterführend wurde gezeigt, dass es zu einer MyosinX-vermittelten Organisation der Integrine kommt, die vermutlich zur Bildung von Haftstrukturen dient und die Erweiterung filopodiale Strukturen zu fördert (Zhang *et al.* 2004). Aufgrund der Daten wurde diese hinsichtlich ihrer reproduzierbarkeit auf das Myosin1F untersucht.

Für die Analyse hinsichtlich der Interaktion von Myosin1F mit den Integrinen α und β wurden Hela-Zellen mit Myosin1F transfiziert und nach erfolgreicher Expression mit Integrin- α und $-\beta$ Antikörper gefärbt. Die dargestellte Färbung zeigt die Kollokalisierung des Myosin1F mit Integrin- α und Integrin- β (Abb. 41 A). Bei Färbung von Integrin- α fällt auf, dass die Kollokalisierung mit Myosin1F besonders in den fingerförmigen Strukturen der Zellen vorliegt. Um die Interaktion der Proteine zu untersuchen, wurde analog zu den anderen Interaktionsstudien eine IP durchgeführt. Die Detektion des Myosin1F mit H44-Antikörper wies dieses auf Höhe von 150 kda im Input sowie im Eluat der mit Myosin1F transfizierten Zellen nach (Abb.41). Dies lässt auf die erfolgreiche Expression sowie die Bindung des Myosin1F an die Beads schließen. Integrin- α wurde über Integrin- α Antikörper unabhängig von der Myosin1F-Expression im Input und im Eluat detektiert. Dies deutet auf die unspezifische Bindung des Integrins an die Beads hin. Die Aussage über die Interaktion der beiden Proteine kann aus diesem Grund nicht mit Sicherheit erfolgen. Das gleiche Ergebnis wurde bei Detektion des Integrin- β erzielt. Auch in diesem Fall lag die unspezifische Bindung des Proteins an die Beads vor, sodass sich keine Aussage über die Interaktion vom Myosin1F mit den Integrinen treffen lässt.

Die β -Untereinheit des Integrinrezeptors ist auf der intrazellulären Seite über Adapterproteine (z. B. Talin, α -Aktinin, Filamin und Vinculin) an Aktinfilamente gekoppelt (Zamir und Geiger 2001). Talin ist wie Paxillin ein Markerprotein früher fokaler Adhäsionen. Es ist ein Aktin-Integrin-verbindendes Protein und wird benötigt um Kräfte zu übertragen. Aus diesem Grund wurde die Kollokalisierung von Myosin1F mit Talin untersucht. Diese Kollokalisierung konnte an der Zellmembran Myosin1F-exprimierender Zellen festgestellt werden. Um die Interaktion der Proteine zu erforschen, wurden 293T-Zellen mit Myosin1F-GFP transfiziert und nach erfolgreicher Expression eine IP durchgeführt. Als Kontrolle wurde das pC3-GFP-Plasmid verwendet. Die Interaktionsanalyse erfolgte hinsichtlich endogener Proteine.

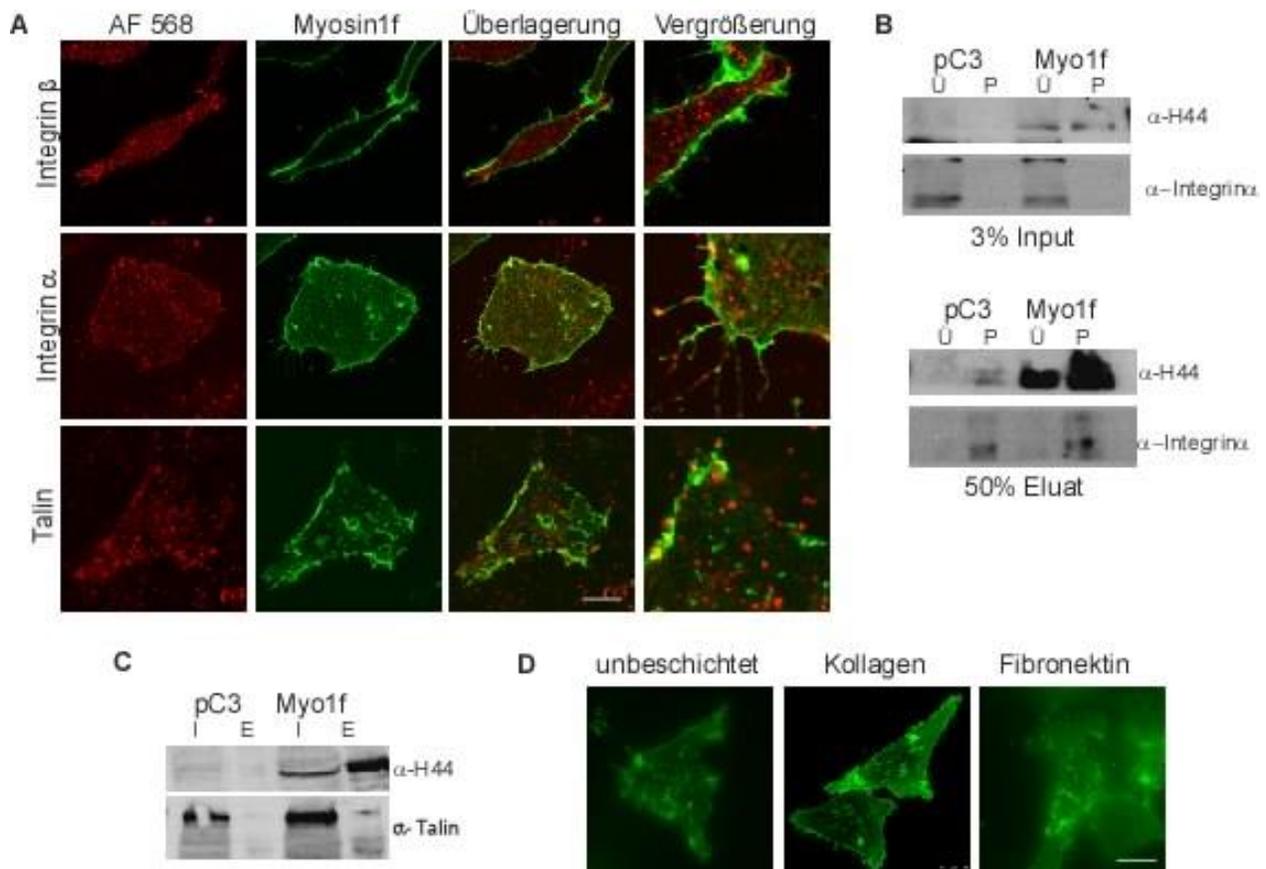


Abb. 41. Involvement von Myosin1F in Integrin-abhängige Signalwege. (A) HeLa-Zellen wurden mit Myosin1F transfiziert und nach erfolgreicher Expression mit α -Integrin und Integrin- β Antikörper gefärbt. Die Färbung zeigt die Kolokalisation des Myosin1F mit Integrin- α , und Integrin- β . Des Weiteren wurde die Kolokalisation von Myosin1F mit Talin an der Zellmembran der gefärbten Zellen festgestellt. (B) Um die Interaktion der Proteine zu untersuchen wurden 293T-Zellen mit Myosin1F-GFP transfiziert und nach erfolgreicher Expression eine IP durchgeführt. Als Kontrolle wurde das pC3-GFP-Plasmid verwendet. Die Interaktionsanalyse erfolgte hinsichtlich endogener Proteine. Die Detektion des Myosin1F erfolgte mit H44-Antikörper, Integrin- α wurde mit Integrin- α Antikörper detektiert. (C) Für den Nachweis einer Interaktion von Myosin1F und Talin wurde ebenfalls eine IP durchgeführt. Der Nachweis von Talin erfolgte durch Talin-Antikörper und wies dieses im Eluat der Myosin1F enthaltenden Zelllysate nach. (D) Die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen oder Fibronectin beeinflusst die Lokalisation des Myosin1F und die Ausbildung der fingerförmigen Strukturen nicht. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Interaktionsstudie von Myosin1F mit Talin zeigt eine Bande auf Höhe von 150 kDa im Input und im Eluat der mit Myosin1F transfizierten Zellen. Dies lässt auf eine erfolgreiche Expression sowie die erfolgreiche Bindung des Myosin1F an die Beads schließen. Durch den Talin-Antikörper konnte Talin im Input der mit Myosin1F transfizierten Zellen und den Kontrollzellen detektiert werden. Im Eluat ist Talin hingegen nur in den mit Myosin1F

transfizierten Zellen detektierbar. Dies unterstützt die Vermutung einer Interaktion von Myosin1F mit Talin (Abb. 41 C).

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Beschichtungen der Zellkulturschalen mit Interginstimmulierenden Substanzen auf den Phänotypen der Myosin1F-Expression auswirken. Dazu wurden Hela-Zellen auf unbeschichteten, mit Kollagen sowie mit Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen ausgesät und mit Myosin1F-GFP transfiziert. Es zeigt sich, dass die Lokalisation des Myosin1F und die Ausbildung der fingerförmigen Strukturen wird durch die Beschichtung der Kulturgefäße mit Kollagen oder Fibronectin nicht beeinflusst wird (Abb. 41 D)).

4.15.1 INVOLVIERUNG DES MYOSIN1F IN DEN EGF-REZEPTOR-ABHÄNGIGE SIGNALWEG

2012 konnte gezeigt werden, das Myosin1F in COS-7 Zellen durch EGF-Stimulation zur Zellmembran rekrutiert wird (Chen und Iijima 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit geprüft und weiterführend Untersuchungen zu der Interaktion von Myosin1F mit dem EGF-Rezeptor vorgenommen. Für die Kolokalisationsuntersuchung des EGF-Rezeptors und Myosin1F wurden Myosin1F-GFP exprimierende Zellen mit einem EGFR-Antikörper gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine wie beschrieben an der Zellmembran lokalisiert sind. Die Überlagerung beider Färbungen zeigt die deutliche Kolokalisation beider Proteine. In der Vergrößerung wird deutlich, dass die Kolokalisation besonders in den Myosin1F-Strukturen an der Membran detektiert werden kann.

Um die Kolokalisation von Myosin1F und dem EGF-Rezeptor hinsichtlich einer Interaktion zu prüfen, wurde eine IP von Myosin1F-GFP mit endogenem EGF-Rezeptor durchgeführt. Myosin1F wurde bei Detektion mit dem H44-Antikörper in den mit Myosin1F-GFP transfizierten Zellen im Input und im Eluat nachgewiesen. In den mit pC3-Vektor transfizierten Kontrollzellen kann kein Myosin1F detektiert werden. Der EGF-Rezeptor wurde im Input beider Zellysate, jedoch nur in den Myosin1F enthaltenden Eluaten nachgewiesen. Neben der zuvor gezeigten Kolokalisation konnte die Interaktion der Proteine gezeigt werden (Abb 42).

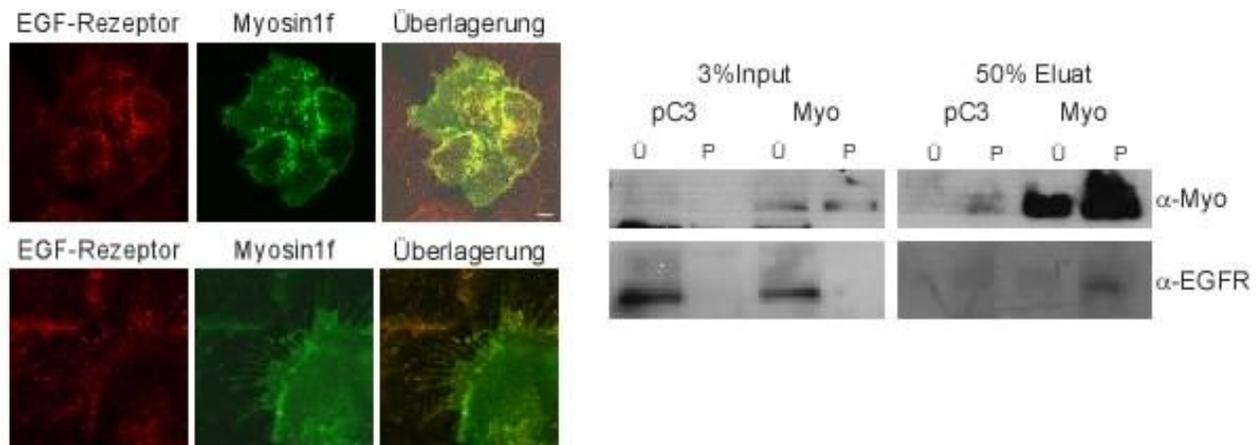


Abb. 42. Interaktion von Myosin1F mit dem EGF-Rezeptor. Myosin1F-GFP exprimierende Zellen wurden mit EGFR-Antikörper gefärbt. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Proteine an der Zellmembran lokalisiert sind. Die Überlagerung beider Färbungen zeigt die deutliche Kolokalisation beider Proteine. Maßstab 25 μ m. Die Interaktion der Proteine konnte durch die dargestellte IP belegt werden. Myosin1F wurde mit H44-Antikörper detektiert, endogener EGF-Rezeptor wurde mit EGFR-Antikörper detektiert.

Die beschriebene Rekrutierung des Myosin1F an die Zellmembran durch EGF-Stimulation wurde durch *live cell* Untersuchungen Myosin1F-GFP exprimierender Zellen untersucht. Die aufgezeichnete Kinetik einer EGF-Behandlung (Abb.43) zeigt Myosin1F ohne Einfluss von EGF an der Membran lokalisiert. Die Membranfärbung scheint jedoch unter dem Einfluss von EGF deutlich stärker zu werden. Um diese Eindrücke zu verifizieren, wurden vor und nach Behandlung mit EGF fraktionierte Zelllysate erstellt und per Westernblot analysiert. Der Nachweise der Myosin1F-GFP Expression mit GFP-Antikörper zeigt Myosin1F in den mit Myosin1F-GFP transfizierten Zellen, nicht jedoch in den untransfizierten Zellen. Der Vergleich der Expressionsmengen von unbehandelten Zellen mit EGF-behandelten Zellen zeigt, dass die Intensität der Myosin1F-Bande in der Pelletfraktion der mit EGF behandelten Zellen deutlich zunimmt.

Um den Einfluss des EGF-Rezeptor-Inhibitors Cetuximab zu testen, wurden HeLa-Zellen mit Myosin1F-GFP transfiziert und mit Cetuximab behandelt. Myosin1F-GFP ist ohne Cetuximab-Behandlung an der Membran lokalisiert (Abb. 43). Die Myosin1F-Expression ist nicht durch die Behandlung mit Cetuximab gehemmt, allerdings entsteht der Eindruck einer stärkeren membranassoziierten Lokalisation nach 30-minütiger Cetuximab-Behandlung. Um den spezifischen Nachweis des Einflusses von Cetuximab auf die Proteinmenge und -lokalisierung zu erbringen muss jedoch die Analyse mittels Westernblot erfolgen.

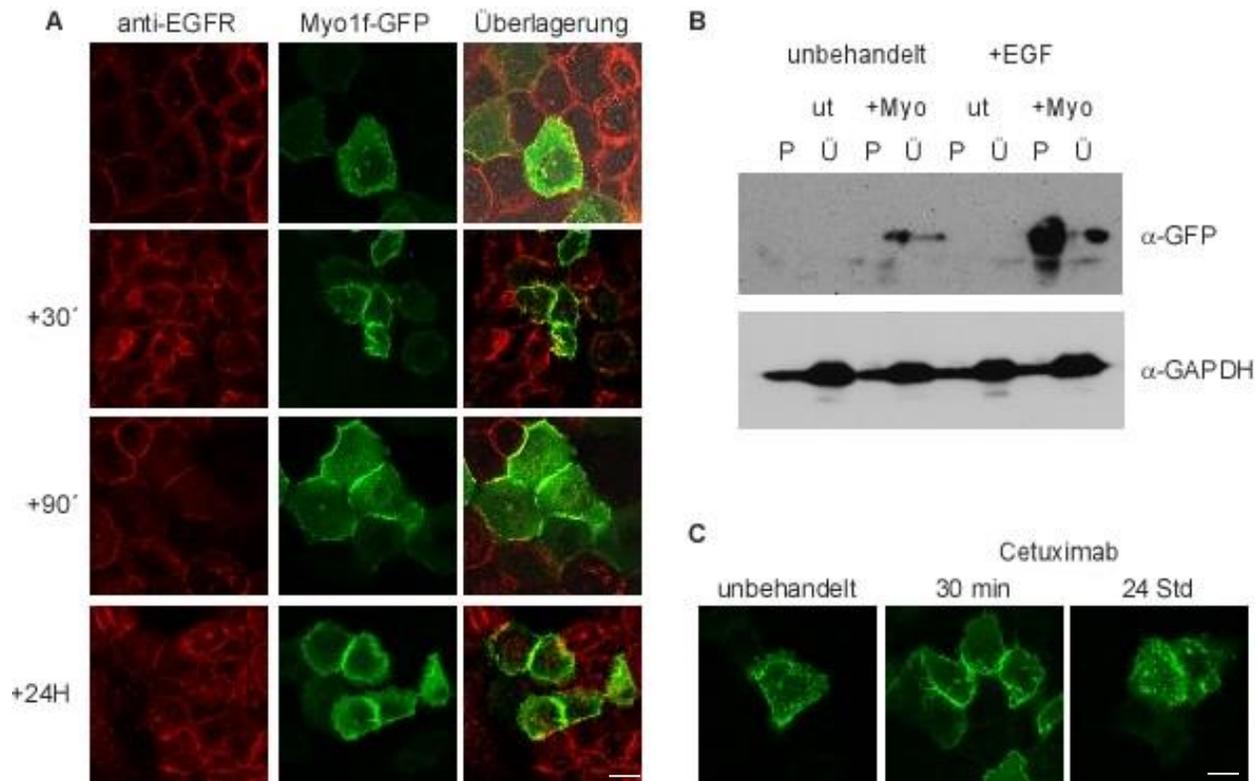


Abb. 43. Einfluss von EGF auf Myosin1F-GFP. A) Myosin1F-GFP exprimierende Zellen wurden mit EGFR-Antikörper gefärbt. Myosin1F lokalisiert bei Behandlung mit EGF stärker an der Membran. Maßstab: 25 μ M B) Vor und nach Behandlung mit EGF wurden fraktionierte Zelllysate erstellt und per Westernblot analysiert. Der Nachweise der Mysosin1f-GFP Expression erfolgte mit GFP-Antikörper. GAPDH dient als Ladekontrolle. Der Vergleich der Expressionsstärke von unbehandelten Zellen mit EGF behandelten Zellen zeigt, dass die Intensität der Myosin1F Bande in der Pelletfraktion der mit EGF behandelten Zellen deutlich zunimmt. C) Die Behandlung mit Cetuximab zeigt keine Effekte auf den Myosin1F- Phänotypen. Maßstab: 25 μ M

4.15.2 INVOLVIERUNG DES MYOSIN1F IN DEN PI3-AKT-SIGNALWEG

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinase, PI3K) sind Enzyme zu deren vielfältigen Funktionen Schlüsselfunktionen wie Migration und Zelladhäsion gehören. Der wichtigste Signalweg, den die PI3K aktiviert ist der PI3K/Akt Signalweg. Die PI3K/AKT-Kaskade ist als Ras-Effektor-Signalweg beschrieben, der parallel zu Raf/MEK/ERK verläuft. Zudem sind PI3K abhängige Signalwege zur Suppression der Apoptose in der Lage. Gegenspieler der PI3K ist die Phosphatase PTEN, die als wichtiger Tumorsuppressor bekannt ist.

Die Untersuchung der Kolokalisation von Myosin1F mit Akt erfolgte zunächst durch Expression von Myosin1F-GFP und der anschließenden Färbung von Akt mit Akt-Antikörper. Beide Proteine sind an der Membran lokalisiert (Abb. 44). Die Überlagerung zeigt die deutliche Kolokalisation von Myosin1F mit Akt.

Um die Interaktion zu prüfen, wurde eine IP durchgeführt. Myosin1F wurde mit H44-Antikörper in Input und Eluat der Myosin1F-enthaltenden Zellysate detektiert. Endogenes Akt wurde mit Akt-Antikörper im Input der mit und ohne Myosin1F transfizierten Zellen sowie im Eluat nur bei Anwesenheit von Myosin1F nachgewiesen.

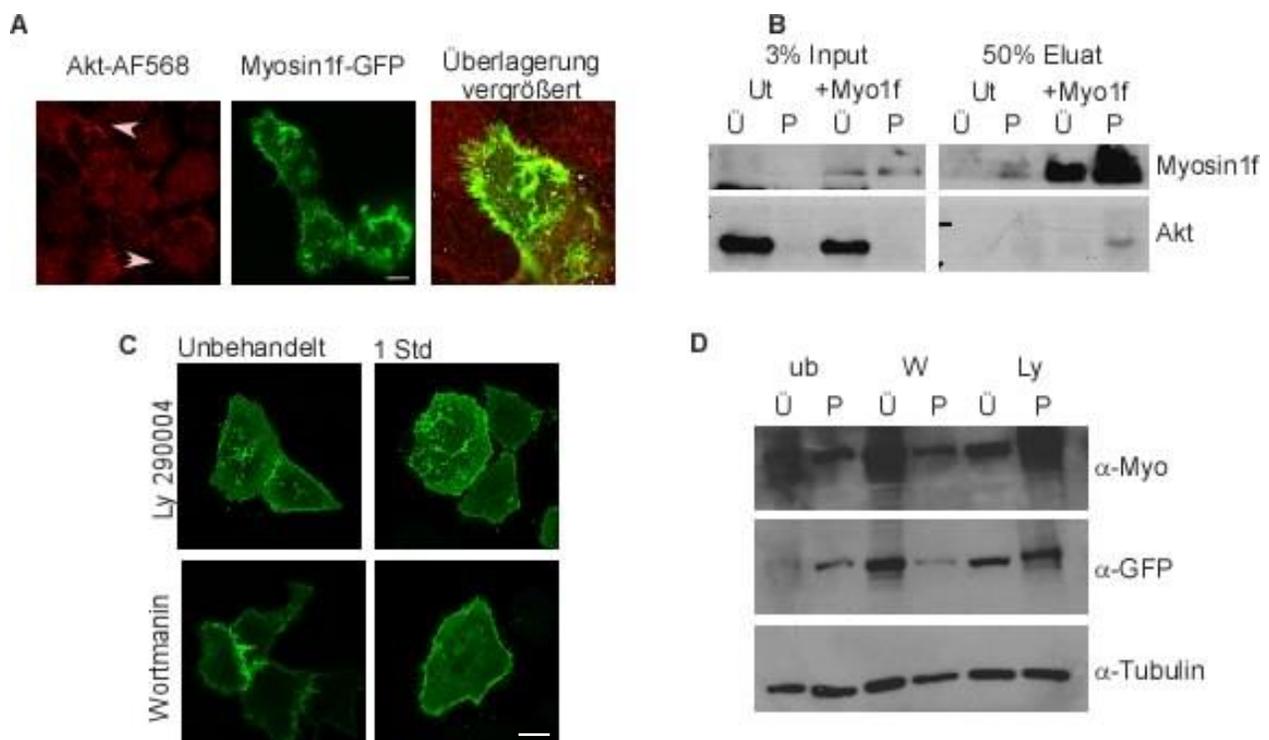


Abb. 44. Involvierung von Myosin1F in den PI3K-Akt-Signalweg. A) HeLa-Zellen wurden mit Myosin 1F-GFP transfiziert und mit Akt-Antikörper gefärbt. Die Überlagerung zeigt die Kolokalisation der Proteine. Maßstab: 25 μ M. B) Zur Verifizierung der Proteininteraktion wurde eine IP durchgeführt. Myosin1F wurde mit GFP-Antikörper detektiert, endogenes Akt mit Akt-Antikörper. C) HeLa-Zellen wurden mit Myosin1F-GFP transfiziert und mit Ly29004 und Wortmanin behandelt. Die konfokalmikroskopische Analyse zeigt die stärkere Lokalisation von Myosin1F an der Zellmembran nach 1-stündiger Ly29004 Behandlung. Das Ergebnis konnte durch Westernblot bestätigt werden. Maßstab: 25 μ M. D) Die Behandlung mit Wortmanin zeigt keine konfokalmikroskopisch erkennbaren Unterschiede. C). Die Westernblotanalyse zeigt hingegen die erhöhte Menge von Myosin1F in der Überstandfraktion.

Für weitere Untersuchungen der Involvierung des Myosin1F in die PI3K-Signalkaskade wurde die PI3K durch die Inhibitoren Wortmannin und LY29004 inhibiert. Wortmannin ist ein hochpotenter PI3K-Inhibitor und kann in höheren Konzentrationen Proteine wie mTOR, die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), Phosphatidylinositol-4-Kinasen, die Myosin-leichte-Ketten-Kinase und die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) inhibieren. LY29004 inhibiert ebenfalls die PI3K und unterbindet dadurch die Aktivierung von AKT (Vlahos, Matter *et al.* 1994). Die Inkubation Myosin1F-exprimierender Zellen mit LY294002 oder Wortmanin sollten Aufschlüsse über die potenzielle Einbindung des Myosin1F in die PI3K-abhängige Signalübertragung geben. Die Daten einer Behandlung Myosin1F-exprimierender Zellen mit Wortmannin und LY29004 erwecken den Eindruck einer vermehrt zytoplasmatischen Lokalisation des Myosin1F infolge der Behandlung.

Die fraktionierten Zelllysate zeigten Myosin1F in den unbehandelten Zellen hauptsächlich in der Pelletfraktion. Die Bande der Überstandfraktion scheint im Vergleich deutlich schwächer. Die Lysate der mit Wortmanin behandelten Zellen zeigen die deutlich stärkere Expression von Myosin1F sowohl bei Detektion mit GFP-Antikörper als auch mit H44-Antikörper in der Überstandfraktion. Die nach Ly294002 Behandlung erstellten Lysate zeigen ebenfalls die leichte Erhöhung der zytoplasmatischen Myosin1F-Menge verglichen mit den unbehandelten Zellen. Die Myosin1F-Expression ist folglich nicht durch die PI3K-spezifischen Inhibitoren Wortmannin und LY294002 beeinflusst. Es konnte stattdessen ein spezifischer Einfluss auf die zelluläre Verteilung des Myosin1F gezeigt werden.

4.16 DIE LOKALISATION VON MYOSIN1F IN DER ZELLADHÄSION

Die Großzahl von Myosinen konnte bereits als bedeutend für Adhäsion und Migration von Zellen beschrieben werden. Für Myosin1F konnte gezeigt werden, dass es eine Rolle bei der Adhäsion von Immunzellen spielt. Aus diesem Grunde sollte die Übertragbarkeit Funktion auf Nicht-Immunzellen überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden Hela-Zellen mit Myosin1F transfiziert. Nach Expression wurden die Zellen von der Platte gelöst und erneut ausgesät. Die Adhäsion nach Aussaat wurde durch Konfokalmikroskop dokumentiert. Es zeigt sich das mit Myosin1F transfizierte Zellen auf unbeschichteten Kulturgefäßen schneller adhäreren, als mit GFP transfizierte

Kontrollzellen. Die fingerförmigen Strukturen, die durch Myosin1F-GFP transfektion auftreten, sind nach 15 Min an der Zellmembran erkennbar. Zudem prägen sich die Strukturen im Laufe der Zeit stärker aus.

Neben der Analyse der Zelladhäsion auf unbeschichteten Zellkulturgefäßen wurde die Adhäsion auf Fibronectin beschichteten Zellkulturgefäßen überprüft. Auch in diesem Fall sind die fingerförmigen Strukturen bereits 15 Min nach aussaht an der Membran der Zellen ausgeprägt. Zudem zeigt sich im Vergleich zu den auf unbeschichteten Schalen ausgesäten Zellen, dass diese unter dem Einfluss von Fibronectin schneller adhäreren.

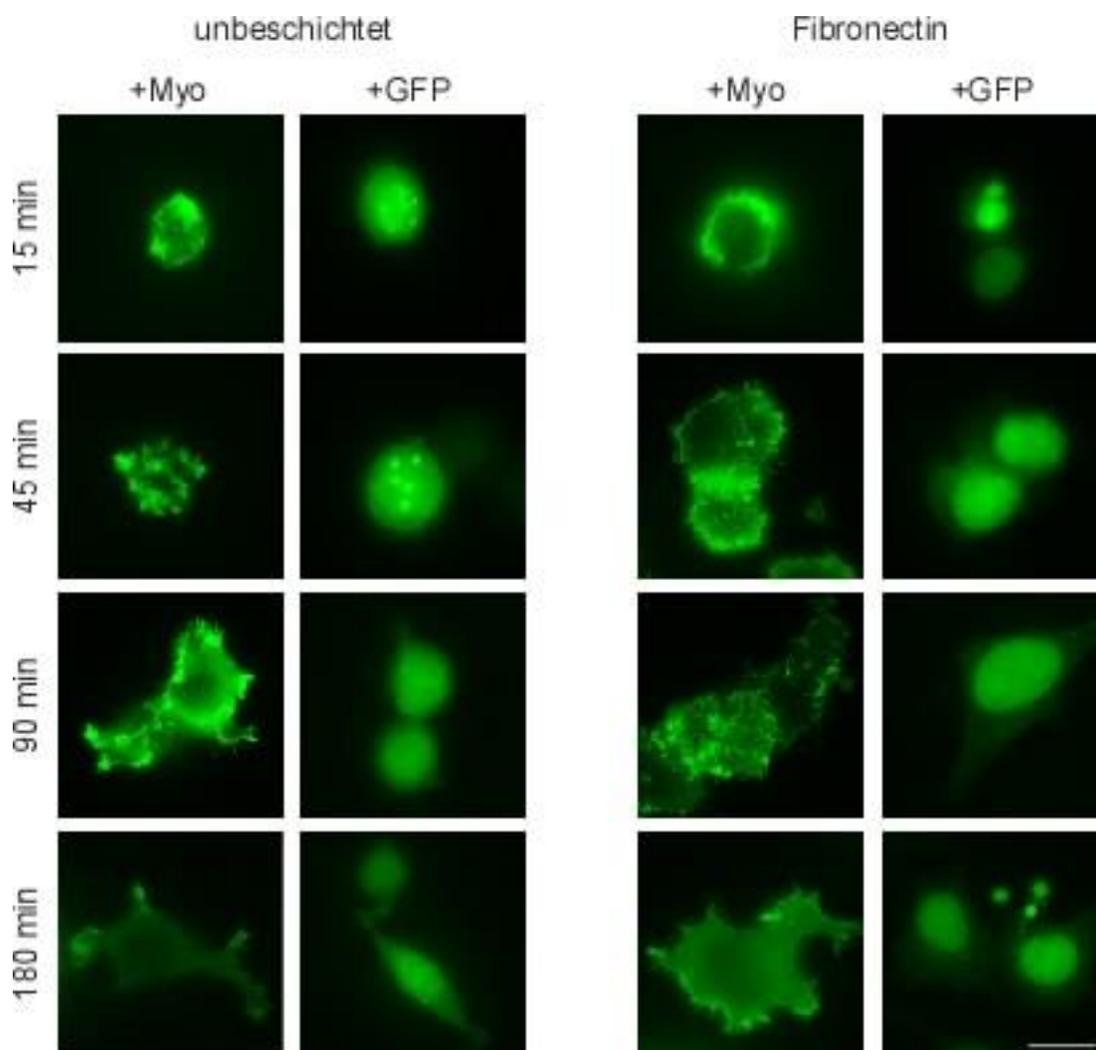


Abb. 45. Einfluss von Myosin1F auf die Zelladhäsion. HeLa-Zellen wurden mit Myosin1F sowie GFP transfiziert und nach Expression erneut auf unbeschichteten und mit Fibronectin beschichteten Schälchen ausgesät. Mit Myosin1F transfizierte Zellen adhäreren schneller als mit GFP transfizierte Zellen. Ebenso adhäreren die Zellen auf Fibronectin beschichteten Schälchen schneller als auf unbeschichteten Schälchen. Maßstab. 25 µm

5 DISKUSSION

5.1 EXPRESSION VON TASPASE1 UND MYOSIN1F IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLTYPEN

Proteasen gewannen in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung in den letzten Jahren aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen in nahezu allen biologischen Vorgängen, wie z.B. in der Apoptose und der Signalweiterleitung, aber auch auf molekularer Ebene hinsichtlich der Regulation von Proteininteraktionen und -lokalisierung (Lopez-Otin und Overall 2002, Turk 2006) zunehmend an Bedeutung. Störungen in der biologischen Funktion wie auch Regulation dieser Enzyme können unter anderem zur Entstehung von Krankheiten wie Krebs beitragen (Lopez-Otin und Bond 2008).

Als prominentes Beispiel gilt die Taspase1, die ihre biomedizinische Relevanz aufgrund ihrer Beteiligung an der Entstehung und Progression von MLL-vermittelten Leukämien erlangte (Bursen *et al.* 2004), aber nachweislich auch in soliden Tumoren exprimiert wird (Chen *et al.* 2010). C. Bier konnte zeigen, dass Taspase1 in Tumorproben verschiedenster Entitäten in Bezug auf die zugehörigen Normal-Gewebeproben erhöht exprimiert ist. Quantitative Real-Time-PCR-Analysen an cDNAs von Normal- und Tumorgewebe sowie Metastasen unterschiedlicher Patienten hatten zudem die erhöhte Taspase1-Expression in Tumoren, aber auch Metastasen dieser Tumorentität bestätigt (Bier 2010). Um Einblicke in die Regulation der Protease zu gelangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich eine qPCR zur quantitativen Analyse der Genexpression von Taspase1 und Myosin1F etabliert. Durch den Vergleich der mRNA-Menge in 293T-, SW480-, A431- und J774-Zellen gegenüber Hela-Zellen wurde gezeigt, dass 293T-Zellen die größte Menge an Taspase1-mRNA aufweisen. Der Vergleich von Tumor- und Nicht-Tumorzellen mit 293T-Zellen als Nicht-Tumorzellen kann jedoch nur bedingt getroffen werden, da es sich bei HEK-Zellen um künstlich transformierte menschliche embryonale Nierenzellen handelt. Durch die Einführung von Fremd-DNA erlangten die Zellen artifiziell Charakteristika von Krebszellen, wodurch sie als Modell für Nicht-Krebszellen nur bedingt taugt (Shein und Enders 1962, Zur Hausen 1967). Erfolgt der Expressionsvergleich mit den murinen Makrophagen-Zellen (J774-Zellen), so zeigen diese deutlich geringere Taspase1-Mengen als die Tumorzellen. Da es sich bei diesen Zellen nicht um Tumorzellen handelt, entsprechen die Daten den von C. Bier generierten Ergebnissen der

erhöhten Taspase1-Expression in Tumorzellen. Zudem zeigen die Daten erstmals, dass die adhärenen Zelllinien (Hela, 293T, SW480, A431) eine bis zu 30-fach höhere Menge Taspase1-Transkript als die Suspensionszellen (J774) aufweisen. Diese neu entdeckten, distinkten Unterschiede der Taspase1-Expression in adhärenen Zellen und Immunzellen deuten auf die möglicherweise spezifische Funktion der Taspase1 in adhärenen Zellen hin. Dies unterstützt die Hypothese, dass diese Protease nicht nur für MLL-vermittelte Leukämien, sondern darüber hinaus auch für solide Tumore von Bedeutung ist (Takeda *et al.* 2006, Chen *et al.* 2010). So konnten Chen *et al.* im Rahmen von Maus-Experimenten feststellen, dass Taspase1 nicht nur für die Tumor-Initiation, sondern auch für dessen Progression wichtig ist.

Hinsichtlich der Expression von Myosin1F wurde im Rahmen dieser Arbeit die stark erhöhte Mengen an Myosin1F-Transkript in der Makrophagen-Zelllinie J774 im Vergleich zu den adhärenen Zelllinien aufgezeigt. Die Daten entsprechen den beschriebenen Daten einer erhöhten Myosin1F-Expression in Zellen des Immunsystems (Kim *et al.* 2006). Zeitgleiche Arbeiten konnten mit Hilfe von Transkriptom-Analysen eine Untergruppe von Myosinen ausmachen, die ein immunzell-spezifisches Expressionsmuster aufweisen, namentlich Myosin1c, e, f und g, Myosin2a (Myh9), 5a, 7a, 9b, 10 und 18a (Maravillas-Montero und Santos-Argumedo 2012).

In der Dissertation von C. Bier (2010) wurde erstmals die erhöhte Expression von Myosin1F mit einer ähnlichen Tendenz wie die Taspase1-Expression in den entsprechenden Geweben in einer kleinen Auswahl von Tumor- und Metastase-Geweben nachgewiesen (Bier 2010). Der Vergleich der Taspase1 und Myosin1F-Expression in adhärenen humanen Zelllinien bestätigte die gleichgeartete Tendenz der mRNA-Transkriptmengen und somit eine korrelierte mRNA-Expression von Myosin1F und Taspase1 in adhärenen Tumor- und Nicht-Tumorzellen. Die Makrophagen-Zellen zeigen für beide Transkripte den gegenteiligen Trend, indem sie eine vergleichbar geringe Menge an Taspase1-Transkript, aber eine hohe Expression von Myosin1F-mRNA aufweisen. Dies kann als erster Hinweis darauf gewertet werden, dass die Genexpression von Myosin1F und Taspase1 einen möglicherweise wichtigen Unterschied zwischen adhärenen Zellen und Suspensionszellen darstellt. Durch den Vergleich der Myosin1F mRNA-Mengen der verschiedenen untersuchten Zelllinien relativ zur Taspase1-mRNA-Expression konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das Taspase1-Expressionsniveau

weit über dem des Myosin1F liegt. Zusammenfassend wurde erstmal aufgezeigt, dass die Menge an Taspase1-mRNA um ein Vielfaches höher ist als das der Myosin1F-mRNA, der Trend in den adhärenen Zelllinien jedoch vergleichbar ist. Die J774-Zellen zeigen im Vergleich deutlich stärkere Myosin1F-Expression und vergleichbar niedrige Taspase1-Expression. Zur Bestätigung dieser Daten ist jedoch die Untersuchung weiterer Zellen wie z. B. von Primärzellen des Immunsystems nötig.

Die Ergebnisse der qPCR konnten mit Ausnahme der 293T- und J774-Zellen auf die zellulären Proteinmengen übertragen werden. Der RNA-Expressionsvergleich mit den endogenen Taspase1-Mengen zeigt die Korrelation der RNA-Expression mit der endogenen Proteinmenge. Lediglich bei 293T-Zellen wurden hohe Transkriptmengen detektiert und vergleichbar wenig endogenes Taspase1-Protein. J774-Zellen zeigten im Gegensatz dazu geringe Menge an Taspase1-Transkript, aber vergleichsweise viel endogenes Taspase1-Protein. In den soliden Tumorzelllinien scheint die RNA-Expression folglich mit der Proteinexpression zu korrelieren. Die Regulation in J774-Zellen scheint hingegen deutlich komplexer und nicht direkt korreliert zu sein. Die direkte Übertragung der Genexpression auf die Proteinmenge ist ohnehin nur selten möglich, da Gen- und Proteinexpression komplexen und strikt regulierten Prozessen unterliegen. Anders als bei sogenannten Haushaltgenen, die konstitutiv exprimiert werden, unterliegt die Regulation der Genexpression der meisten Gene vielfältigen Regulationsmechanismen auf verschiedenen Stufen (Latchman 2005, Alberts 2012, Stryer 2013). Dadurch werden die Gene anhängig von Typ, Zyklus Stadium der Zellen oder Wachstumsbedingungen exprimiert. Insbesondere bei Eukaryoten kommt es durch das Zusammenspiel von Genetik und Epigenetik zu hoch komplexen Regulationsmechanismen. Des Weiteren wird die Proteinexpression durch Faktoren wie die Exportrate der mRNA aus dem Zellkern, die folgende Translationsrate, sowie wie die letztendliche Proteinstabilität beeinflusst (Alberts 2012, Stryer 2013). Letztlich kann davon ausgegangen werden, dass die Proteinexpression von Myosin1F und Taspase1 durch eine Vielzahl von Bedingungen und Regulationsmechanismen beeinflusst wird, die jedoch in beiden Fällen nur unzureichend bekannt sind.

Dennoch konnte die von C. Bier ermittelten Daten zur Proteinexpression von Taspase1 reproduziert werden. Lediglich in A431-Zellen konnte ein Unterschied in der endogenen

Proteinmenge detektiert werden. Dieser könnte durch eine stark vorangeschrittene Passagenzahl begründet sein und würde auf eine entsprechende Regulation der Taspase1-Expression in der Zellalterung hindeuten. Die Zellzyklus-abhängige Regulation der Taspase1 konnte bereits beschrieben werden. So konnte durch die fehlende MLL-Prozessierung in Taspase-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass Taspase1 den Zellzyklus indirekt über die MLL-E2F Achse reguliert und dadurch die Zellproliferationsrate beeinflusst (Blais und Dynlacht 2004, Takeda *et al.* 2006, Bier 2010).

Für Myosin1F sind die Daten der qPCR ebenfalls auf die Proteinebene übertragbar. Im Vergleich zu den Makrophagen-Zellen war allerdings kaum Myosin1F in SW480-Zellen, Saos-, 293T-, Hela- und Vero-Zellen detektierbar. Unterschiede in der Gen- sowie der Proteinexpression von Myosin1F und Taspase1 könnten unter anderem die Unterschiede im Migrationsverhalten der verschiedenen Zelltypen erklären. Besonders stark migrierende Zellen wie die des Immunsystems weisen starke Migration jedoch kaum Adhäsion auf (Madri und Graesser 2000, Luster *et al.* 2005). Dies könnte die hohe Expression von Myosin1F im Vergleich zu den adhären Zellen begründen. Die Menge der Taspase könnte im Zusammenhang mit ihrer enzymatischen Aktivität stehen. So würde eine hohe Taspase1-Expression mit verstärkter Aktivität einhergehen. Im Falle des Myosin1F könnte die Spaltung zu einer Funktionsänderung oder der Aktivierung des Proteins führen, was wiederum in der Veränderung des Adhäsionsverhaltens resultieren kann. Da in der Zelle jedoch eine Vielzahl weiterer Taspase1-Zielproteine vorliegt, muss davon ausgegangen werden, dass diese Proteine ebenfalls durch Taspase1 hydrolysiert werden und dadurch mit zu den zellulären Unterschieden beitragen. Diese Vermutung wird durch die Tatsache getützt, dass Taspase1-defiziente Mäuse wesentlich extremere Defekte als transgene Mäuse zeigen, die anstelle des Wildtyp-Gens eine nicht mehr spaltbare Form von MLL tragen. Dies unterstützt die Vermutung dass neben MLL und TFIIA noch weitere Taspase1-Zielproteine von Bedeutung sind (Takeda *et al.* 2006).

Auf die Funktion der Myosin1F Spaltung aus bestehenden Daten zu schließen ist jedoch kaum möglich, da die Funktion der Spaltung durch Taspase1 für die meisten Taspase1-Zielproteine ungeklärt ist. Bei den bereits untersuchten Zielproteinen TF2A und MLL besitzt die Spaltung zudem deutlich kontroverse Funktionen. So führt eine Spaltung des MLL zur Stabilisierung des Proteins und zur Ausbildung eines Multiproteinkomplexes, der aktivierend auf die HOX-Genexpression wirkt. TF2A wird in folge einer Spaltung

destabilisiert und proteasomal abgebaut (Nakamura *et al.* 2002, Guenther *et al.* 2005, Zhou *et al.* 2006). So können aus den bestehenden Daten aufgrund der kontroversen Auswirkung der Spaltung keine Hinweise auf die Funktion der Myosin1F-Spaltung gewonnen werden.

IF-Färbungen von endogenem Myosin1F zeigten hauptsächlich zytoplasmatische und nur schwach membranassoziierte Lokalisation in adhärennten Zellen, während in J774- sowie Raw-Zellen eine deutliche Membranfärbung nachweisbar war. Dies unterlegt die durch Westernblot aufgezeigten erhöhten Myosin1F-Proteinmengen in den Immunzellen. Die membranassoziierte Lokalisation von endogenem Myosin1F konnte durch Verwendung des pc3-Myosin1F-GFP Expressionskonstrukts bestätigt werden, was zudem die spezifische Antikörperdetektion von endogenem Myosin1F in J774-Zellen und Raw-Zellen belegt. Im Vergleich zu den J774-Zellen handelt es sich bei den Raw-Zellen um adhärennte Makrophagenzellen. Dies unterlegt die Hypothese einer per se erhöhten Myosin1F-Expression in Immunzellen, die nicht vom Adhäsionsverhalten abhängt. Um diese Aussage zu bestätigen, müssen jedoch die Untersuchungen weiterer verschiedener Zellen, insbesondere von Immunzellen und Primärzellen folgen.

5.2 WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN MYOSIN1F UND TASPASE1

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wildtyp-Form des Myosin1F stärker membranaassoziiert lokalisiert als die nicht durch Taspase1 prozessierbare Mutante. Weiterführende Lokalisationsstudien zeigten, dass Myosin1F sowie die nicht durch Taspase1 spaltbare Form im Zytosol, an der Membran sowie am Zytoskelett lokalisiert sind. Die nachgewiesene Lokalisation am Zytoskelett deutet auf die Interaktion mit Aktin und die damit verbundene Funktion als Motorprotein hin (Alberts 2012). Die stärker zytoplasmatische Lokalisation durch die Mutation der Taspase1-Schnittstelle deutet auf die spezifische Regulation des Myosin1F durch die Proteolyse hin.

Die Lokalisation von Myosin1 in der Peripherie der Zelle wurde erstmals 1992 beschrieben. Bereits damals wurde eine starke Akkumulation in Regionen der Zelle beobachtet, die mit beweglicher Aktivität verbunden sind (d.h. Filopodien, Lamellipodien und Wachstumskegel) und so die dynamische Funktion an der Plasmamembran vermutet (Barylko *et al.* 1992). 1989 wurde für das Myosin-I der *Acanthamoeba* die durch dessen

TH1-Domäne vermittelte Bindung an die Zellmembran beschrieben (Hokanson *et al.* 2006; Patino-Lopez *et al.* 2010). Fan dokumentierte 2012 die Akkumulation von Myosin1F am Leitsaum der Zelle bei der Migration von Zellen (Fan *et al.* 2012; Fukui *et al.* 1989). Gleichzeitig wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Assoziation von Myosin-I mit Membranlipiden eine Vielzahl von Zellbewegungen antreibt. Als mögliche Arten der Myosin-I angetrieben Zellbewegung wurden der Organellentransport entlang von Aktinfilamenten, Membranbewegungen relativ zu Aktinfilamenten im Zytoplasma, Plasmamembranbewegung relativ zu Aktinfilamenten sowie die Bewegung von Membranmolekülen entlang kortikaler Aktinfilamente genannt (Adams und Pollard 1989). 2012 konnte in zeitlich parallel verlaufenden Arbeiten gezeigt werden, dass das Myosin1F des *Dictyostelium discoideum* in Neutrophilen durch chemotaktische Stimulation an der Zellmembran mit Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (PtdIns(3,4,5)P(3)) Interagiert (Chen und Iijima 2012).

Weiterführend konnte im Rahmen von Fraktionierungsversuchen gezeigt werden, dass Taspase1 stärker im Zytosol von 293T-, HeLa- und A431-Zellen lokalisiert. In Raw-, J774- und SW480-Zellen zeigt sich Taspase1 jedoch deutlich stärker in der Membranfraktion. Zudem lokalisiert endogene Taspase1 in mit Myosin1F transfizierten SW480-Zellen deutlich stärker an der Zellmembran als in untransfizierten Zellen. Bezogen auf die Proteinmengen führt dies zu dem Schluss, dass höhere Taspase1-Mengen die membranassoziierte Lokalisation des Proteins verstärken, unterlegt also die zuvor aufgestellte Vermutung der Rekrutierung der Taspase1 durch Myosin1F an die Membran. IF-Untersuchungen konnten diese These stützen, da sie eine stärker zytoplasmatische Färbung bei Expression hoher Taspase1-Mengen zeigten. Zudem konnte infolge einer IP die Interaktion von Myosin1F mit Taspase1 bestätigt werden.

Die Daten lassen auf die zelllinienspezifische Regulation der Taspase1-Lokalisation in der Zelle schließen, die durch Ihre vielfältigen Funktionen und die Vielzahl verschiedener Substrate in der Zelle bedingt sein kann. Da Taspase1 eine Vielzahl potenzieller Substrate in sämtlichen Kompartimenten der Zelle aufweist (Bier 2010), ist die Regulation ihrer Lokalisation von zentraler Bedeutung. Um eindeutige Aussagen zur Korrelation der Myosin1F-Lokalisation mit der endogenen Taspase1-Proteinmenge machen zu können, müssen jedoch weitere Versuche folgen. Es lässt sich jedoch vermuten, dass die Spaltung

des Proteins durch Taspase1 direkten Einfluss auf die Funktion des Myosin1F nimmt. So führt die Spaltung durch Taspase1 zur Abspaltung der ATP-Bindestelle vom Volllängeprotein, wodurch die biologische Funktion des Myosin1F stark beeinträchtigt wird.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf die Regulation von Gewebeinvasion und Metastasierung von Tumorzellen hin, welche 2000 bereits als charakteristisch für Krebszellen erkannt werden konnte (Hanahan und Weinberg 2000). So könnte insbesondere über die Spaltung des Myosin1F die Migrations- und Adhäsionsfähigkeit der Zelle beeinflusst werden. Dies unterstützt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass das Zusammenspiel von Taspase1 und Myosin1F so Gewebeinvasion und Metastasierung von Tumorzellen reguliert. Die Daten stützen weiterhin die These, dass die Protease Taspase1 nicht nur für MLL-vermittelte Leukämien, sondern darüber hinaus auch für solide Tumore von Bedeutung ist (Bier *et al.* 2012).

5.3 NACHWEIS DER MYOSIN1F-SPALTUNG DURCH TASPASE1

Knauer *et al.* konnten 2011 zeigen, dass die Spaltung des MLL-Fusionsproteins durch die Taspase1 als kritischer Schritt der Tumorgenese angesehen werden kann (Benedikt *et al.* 2011, Knauer *et al.* 2011). Insbesondere bei Beteiligung der t(4; 11)-Translokation konnte ein Einfluss auf die Entstehung von Leukämien gezeigt werden (Reichel *et al.* 2001). So konnte im Fall des Fusionspartners AF4 ergänzend belegt werden, dass lediglich das die Taspase1-Schnittstelle tragende Translokationsprodukt als Auslöser für die Leukämieentstehung fungiert (Bursen *et al.* 2004, Bursen *et al.* 2010). Die Prozessierung des entstehenden Derivat4 (AF4•MLL) durch Taspase1 resultiert in einer Aktivierung und Stabilisierung dieses Onkogens, was zur Entstehung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) führt (Bursen *et al.* 2004). Interessanterweise entsteht bei der Translokation von MLL mit Myosin1F nur ein einziges Translokationsprodukt, welches die Taspase1-Schnittstelle des Myosin1F trägt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Taspase1-Spaltung von onkologischer Relevanz ist. Auch für das Taspase1-Substrat MLL konnte gezeigt werden, dass dessen Spaltung einen wichtigen Faktor der Initiation und Progression solider Tumore darstellt (Khan *et al.* 2005). Es ist bisher noch unbekannt, ob MLL•Myo1f Fusionsproteine eine Rolle in der Leukämieentstehung spielen und ob ein

gain- oder *loss-of-function* von Myosin1F zu diesem Prozess beiträgt (Taki *et al.* 2005, Kim und Flavell 2008). Ein möglicher Ansatzpunkt könnte im Myosin1F-Anteil des Fusionsproteins liegen, da für einige Gene der Myosin-Familie (z.B. Myo18B) ein Zusammenhang mit der Onkogenese beschrieben werden konnte (Nishioka *et al.* 2002). Der Nachweis der Prozessierung von Myosin1F durch Taspase1 sollte Einblicke in die Funktion der Taspase1 sowie der Spaltung im zellulären Kontext sowie geben.

Die Verifizierung der Taspase1-Schnittstelle erfolgt analog zu der von Bier durchgeführten Analyse über das Taspase1-Biosensor-System. Dieses besteht aus der Kombination des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), der Glutathion-S-Transferase (GST), einem Myc-fusionierten NES, einem NLS sowie der Taspase1-Schnittstelle des Myosin1F. Dieser autofluoreszierende Sensor erlaubt es, dass der ungeschnittene Sensor zwischen Kern und Zytoplasma kontrolliert wandert, aber aufgrund des stärkeren Export-Signals hauptsächlich im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist. Erfolgt die spezifische Hydrolyse durch Taspase1, wird das NES abgespalten und der vordere, grün fluoreszierende Teil des Sensor-Proteins akkumuliert aufgrund des verbleibenden NLS im Kern der Zelle.

Durch konfokalmikroskopische Analysen und Westernblot wurde gezeigt, dass aktive Taspase1 in der Tat die spezifische Spaltung der Myosin1F-Schnittstelle induziert und so die Taspase1-Schnittstelle im Myosin1F verifiziert. Da die Hydrolyse des Sensors in lebenden Zellen untersucht wird, wird etwaigen Problemen, wie sie bei der Verwendung rekombinanter Protein-Assays vorkommen können, vorgebeugt. Ein möglicher Einfluss zellulärer Regulationsmechanismen auf die Spaltung, wie z.B. die Notwendigkeit post-translationaler Modifikationen des Enzyms oder des Substrats, muss zunächst nicht besonders berücksichtigt werden, da sich sowohl Taspase1 als auch das Substrat in natürlicher Umgebung befinden. Allerdings führte die Wahl dieses zellulären Assaysystems aufgrund des Vorhandenseins endogener Taspase1 zur Spaltung des Sensors auch ohne Koexpression von Taspase1. Dies ist bei der Interpretation sämtlicher im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten zu berücksichtigen. Andererseits kann das Sensor-System daher (allein transfiziert) zur Analyse der Aktivität der endogenen Taspase1 in verschiedenen Zelltypen herangezogen werden. Durch die statistische Auswertung der Lokalisation des Sensor-Systems wurde festgestellt, dass Hela-Zellen verglichen mit 293T-Zellen ohne die Koexpression von Taspase1 deutlich mehr Sensor-Protein im Kern der Zelle aufweisen. Auch der Anteil an Zellen mit Gleichverteilung des

Sensors zwischen Kern und Zytoplasma ist im Hela-Hintergrund deutlich größer als in 293T-Zellen. Die Lokalisationsunterschiede des Sensor-Systems bei alleiniger Expression sind somit durch die zuvor nachgewiesenen Unterschiede der Taspase1-Mengen in Hela- und 293T-Zellen erklärbar. Die im Vergleich zu den 293T-Zellen hohe Menge endogener Taspase1 in Hela-Zellen bedingt die entsprechend starke Akkumulation des Sensors im Kern der Zelle. Das hohe Taspase1-Proteinniveau könnte dementsprechend mit erhöhter Aktivität einhergehen. Das Sensor-System konnte somit neben der Verifizierung der Taspase1-Schnittstelle im Myosin1F zur Analyse der Enzymaktivität in den verschiedenen Zelltypen herangezogen werden.

Nach Verifizierung der Taspase1-Schnittstelle im Myosin1F-Sensor-System wurde die Spaltung des Volllänge-Myosin1F untersucht. Erste Hinweise auf die Prozessierung des Volllänge-Proteins wurden bei der Analyse der endogenen Proteinmengen über die Detektion einer Doppelbande gewonnen, welche den Molekulargewichten des Volllänge-Proteins und dem C-terminalen Spaltprodukt entsprachen. Trotz diverser Modifikationen der Lysat-Herstellung wie auch der Westernblot-Bedingungen war die Detektion von endogenem Myosin1F mit N-14 Antikörper nicht möglich. Da folglich eine Detektion des N-terminalen Spaltprodukts aufgrund mangelnder Antikörperbindung nicht möglich war, wurden Konstrukte erstellt, bei denen ein N-terminales Myc-Tag vor die Sequenz des Myosin1F fusioniert wurde. So war es möglich, das Konstrukt nicht nur über Myosin1F H44- und GFP-Antikörper, sondern auch eindeutig mit einem entsprechenden Myc-Tag-Antikörper zu detektieren. Die zelluläre Lokalisation der Fusions-Konstrukte ist mit den unmarkierten Myosin1F-GFP-Konstrukten vergleichbar, was einen möglichen Einfluss des Myc-Tags auf die Lokalisation unwahrscheinlich macht. Weiterführend konnten bei Anwesenheit von Taspase1 neben dem Volllänge-Protein nun auch die beiden Spaltprodukte detektiert werden und somit erstmalig die Spaltung des Volllänge-Myosin1F durch Taspase1 experimentell belegt werden.

Das C-terminale Fragment konnte in Hela-Lysaten sowohl in An- als auch in Abwesenheit kotransfizierter Taspase1 detektiert werden, was durch die zuvor aufgezigten endogenen Taspase1-Mengen erklärt werden kann. Da die Koexpression von Taspase1 zu einer stärkeren Spaltung führt, kann jedoch von der spezifischen Spaltung durch Taspase1 ausgegangen werden. Die Erhöhung der Enzymmenge resultiert folglich direkt in der verstärkten proteolytischen Enzymaktivität.

Dennoch erschwerte die endogene Taspase1-Aktivität in den Zellen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente und deren Interpretationen. Aufgrund endogener Taspase1-Aktivität waren auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit eindeutige Aussagen nur unter Berücksichtigung der endogenen Taspase1 zu treffen. Um den Einfluss der endogenen Taspase1 zu unterbinden sind im folgenden Taspase1-*Knockout* Experimente geplant. Zudem werden Untersuchungen von Fibroblastenzellen aus Taspase1-*knockout* Mäusen erfolgen. Eine weitere Möglichkeit zur Unterbindung der Taspase1-Aktivität wäre die Verwendung des Cre-lox Systems. Das Cre-loxP-System ermöglicht das gezielte entfernen von DNA-Sequenzen (Feil *et al.* 1997, Metzger und Chambon 2001), wodurch gezielt die Induktion eines Taspase1- *Knockouts* möglich wäre. Um zelluläre Einflüsse auf die Taspase1-Aktivität sowie die Myosin1F-Spaltung zeitlich definiert zu untersuchen, wurde rekombinant hergestelltes Taspase1-Protein in gereinigter Form verwendet. Mit einem His-Tag fusionierte Taspase1 wurde dazu in BL21-Bakterien exprimiert und mittels Ni-NTA aufgereinigt. Neben dem Volllänge-Protein wurde auch die Aktivität der getrennt exprimierten Taspase1-Untereinheiten untersucht. Diese sollten sich auch *in vitro* zu einem aktiven Enzym zusammenlagern. In der Tat konnte die Spaltung des Myosin1F in den mit rekombinanter Volllänge-Taspase1 versetzten Lysaten erzielt werden. Im direkten Vergleich traten jedoch deutlich stärkere Spaltprodukt-Banden bei Verwendung der rekombinanten Taspase1-Untereinheiten auf. Dies lässt darauf schließen, dass Taspase1 in Form der α - und β -Untereinheit höhere hydrolytische Aktivität aufweist als das Volllänge-Protein. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass das rekombinante Volllänge-Protein möglicherweise nicht so effizient autoproteolytisch gespalten wird, wie es im zellulären Kontext der Fall ist, da im Westernblot große Mengen von ungeschnittenem Protein detektiert werden konnten. Dies unterstreicht den Einfluss des zellulären Kontext auf die Taspase1-Aktivität.

Die Verwendung des Proteasom-Inhibitors MG132 zur Unterbindung eines möglichen Abbaus der Spaltprodukte resultierte nicht in abweichenden Ergebnissen. Es ist daher zu vermuten, dass das N-terminale Spaltprodukt nach Hydrolyse des Volllänge-Myosin1F durch Taspase1 zumindest nicht direkt proteasomal abgebaut wird, wie es für das Taspase1-Substrat TF2A postuliert ist. Anzumerken ist, dass MG132 die Aktivität der Taspase1 nicht zu inhibieren vermag (Rabenstein 2008).

Da das N-terminale Fragment scheinbar nicht direkt proteasomal abgebaut wird, wird durch diese Ergebnisse wieder die Theorie einer Funktionsänderung, oder Aktivierung des Myosin1F durch Taspase1-Spaltung gestützt. Für die Regulation der Spaltung ist es des Weiteren nicht auszuschließen, dass die Aminosäuren in der direkten Umgebung der Spaltstellen-Konsensus-Sequenz das Taspase1-Schnittverhalten beeinflussen. So zeigt Myosin1F ebenso wie das bekannte Substrat TFIIA eine Ansammlung saurer Aminosäuren in nur geringem Abstand zur Schnittstelle. Es ist folglich möglich, dass die Aminosäuren in der Umgebung der Schnittstelle zwar nicht für die Substraterkennung durch Taspase1 benötigt werden, aber Einfluss auf die Effizienz der Prozessierung haben. Da die Substraterkennung im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden konnte, könnten die Aminosäuren in der Umgebung der Schnittstelle neben der Beteiligung an der Hydrolyse der Amidbindung als Protonen-Donor dienen und dadurch zu Veränderung der Sekundär-Struktur führen (Bier 2010, Stryer 2013). Dies würde wiederum die Hypothese einer Ablösung von der Membran nach Spaltung des Myosin1F bekräftigen.

Um den Einfluss endogener Taspase1 auf die Myosin1F-Spaltung zu reduzieren und zudem die Anzahl unspezifischer Antikörperbindungen bei Analyse des Gesamtzelllysats zu minimieren, wurde zum zweifelsfreien Nachweis der Myosin1F-Spaltung durch Taspase1 eine als „cleavage-IP“ bezeichnete Methode entwickelt und etabliert. Die Methode beruht auf der magnetischen Proteinaufreinigung durch das Macs-System (Macs Milteny). So kann das Myosin1F-Protein aus Zelllysaten durch Bindung des GFP- bzw. Myc-Tag an entsprechende magnetische Beads in speziellen Säulen immobilisiert werden. Im Anschluss kann durch Zugabe des Enzyms die Hydrolyse des Myosin1F auf der Säule induziert werden. Die Spaltprodukte können nach der Elution spezifisch nachgewiesen werden. Hierzu wurde Gesamtzelllysate Taspase1-exprimierender Zellen verwendet wie auch die zuvor bereits beschriebenen rekombinanter Taspase1-Proteine (von Johannes van den Boom). So konnte die Spaltung des Myosin1F durch Taspase1 bestätigt werden. Entsprechend der zur Bindung verwendeten Beads war nach Zugabe des Enzyms das abgespaltene Fragment im Durchfluß detektierbar, wohingegen der gebundene Rest im Eluat nachgewiesen werden konnte.

Das System kann im Folgenden zur Analyse weiterer spezifischer Enzym-Substrat-Spaltungen herangezogen werden. So ist es denkbar, das bislang nur ansatzweise

bekannte Repertoire möglicher Zielproteine von Taspase1 genauer zu untersuchen, um zukünftig ein besseres molekulares Verständnis der biologischen Funktion zu gewinnen. Weiterführend kann der Einfluss potenzieller Enzyminhibitoren auf die Enzymaktivität untersucht werden. Zudem wäre es möglich, durch gezieltes Einbringen von Mutationen in der die Schnittstelle umgebenden Sequenz den Einfluss der umliegenden Aminosäuren auf die Substratspaltung zu untersuchen.

5.4 UNTERSUCHUNG DER MYOSIN1F-SPALTPRODUKTE

Zur Untersuchung möglicher biologischer Funktionen der Myosin1F-Spaltprodukte wurden GFP-markierte Expressionskonstrukte des durch Taspase1-Hydrolyse entstehenden N- und C-terminalen Fragments erstellt. Zur Analyse der Myosin1F-Motordomäne wurde zudem ein entsprechendes, die N-terminalen 690 AS des Myosin1F umfassendes Konstrukt generiert.

Lokalisationsstudien in Hela-, 293T-, SW480- und A431-Zellen ergaben, dass das C-terminale Fragment weiterhin zum Großteil an der Membran, jedoch deutlich stärker als des Volllängekonstrukts im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist. Des Weiteren ist es nicht wie das Volllänge-Protein mit dem Zytoskelett der Zelle assoziiert, wodurch die vermutete Bindung des Myosin1F an Aktin durch die vor der Taspase1-Schnittstelle lokalisierte Aktin-Bindedomäne unterlegt wird. Eine nukleäre Lokalisation ist ebenso vergleichbar dem Volllängekonstrukt nicht zu detektieren. Da die passive Diffusion in den Kern aufgrund der Größe nicht möglich ist, kann folglich auch der aktive Transport in und damit eine Funktion im Kern ausgeschlossen werden. Auch die fingerförmigen Auswüchse an der Zelloberfläche, die bei Expression der Wildtypform auftreten können bei Expression des C-terminalen Spaltprodukts nicht ausgemacht werden. Folglich scheint die Ausbildung der Strukturen an das Volllänge-Protein gebunden zu sein.

Die Motordomäne von Myosin1F, bestehend aus den AS 1-670 lokalisiert ebenso wie das N-terminale Spaltprodukt im Zytoplasma und im Kern der Zelle, was entsprechend der fehlenden C-terminalen SH3-Domäne für die Membranbindung über den C-Terminus spricht. Die Untersuchung des N-terminalen Fragments zeigte im Vergleich zu den anderen Konstrukten dessen starke Akkumulation im Zellkern.

Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass Myosin1F über seine C-terminal lokalisierte TH1-Domäne mit der Zellmembran assoziiert ist (Gillespie *et al.* 2001; Chen und Iijima 2012), wie es bereits für das Myosin1E belegt werden konnte. Zudem stützen sie die aufgestellte Hypothese, dass das geschnittene Myosin1F ebenso wie die Mutante durch Konformationsänderungen weniger stark als das Volllängekonstrukt an der Membran lokalisiert. Dies wurde erklären, warum die Bindung an die Zellmembran über die basische TH1-Domäne von Myosin1F nicht bestehen bleibt und weiterführend zu der Hypothese einer Funktionsänderung in folge der Taspase1-Spaltung führen.

Entsprechend führt die starke Akkumulation im Zellkern zu der Vermutungen einer Aktivierung des Myosin1F durch die Taspase1-Spaltung und einer daraus resultierenden potenziellen Funktion des N-Terminus im Zellkern.

Bereits 1997 gab es erste Hinweise auf eine Lokalisation von Myosin-I im Zellkern (Nowak *et al.* 1997). So ist die Ausbildung eines filamentösen Netzwerkes im Kern der Zelle bekannt, aber weitestgehend unerforscht. Dennoch wurde bereits damals postuliert, dass Myosin-I zu einem Transport von Kernorganellen und Kernkompartimenten im Nukleoskelett beiträgt (Nowak *et al.* 1997).

Zusammenfassend kann vermutete werden, dass die Spaltung des Myosin1F durch Taspase1 in der Funktionsänderung resultiert und das N-terminale Spaltprodukt dadurch im Zellkern fungieren kann. Die Lokalisation wird durch die Größe des N-terminalen Spaltprodukts möglich, aufgrund der es in den Kern diffundieren kann.

Zelllinienspezifische Unterschiede in der Lokalisation der Konstrukte konnten nicht ausgemacht werden. Dies erscheint logisch, da nach Spaltung des Myosin1F-Proteins in seine Untereinheiten, wie experimentell durch die Deletionskonstrukte simuliert, kein Einfluss der Taspase1-Expression mehr zu erwarten ist.

Aufgrund der bekannten Assemblierung der MLL-Spaltprodukte in folge einer Spaltung durch Taspase1 (Hsieh *et al.* 2003) wurde die Myosin1F-Spaltprodukte ebenfalls hinsichtlich einer solchen potenziellen Assemblierung untersucht. Dazu wurde das N-terminalen Fragment mit dem C-terminalen Spaltprodukt kotransfiziert, um so auf eventuelle Interaktionen der beiden Untereinheiten schließen zu können. Separat transfiziert lokalisierte das C-terminale Fragment wie zuvor beschrieben an Zellmembran und im Zytoplasma, während das N-terminale Fragment im Kern akkumulierte. Nach Koexpression ist die grüne Fluoreszenz im Zytoplasma sowie membranassoziiert, jedoch

nicht mehr im Zellkern detektierbar. Daraus lässt sich auf die Interaktion der entstehenden Spaltprodukte nach Spaltung des Volllänge-Myosin1F durch Taspase1 schließen. Um die Interaktion zu verifizieren, muss jedoch eine Bestätigung mit biochemischer Methoden folgen. Die Interaktion könnte den Eintritt des N-terminalen Fragments in den Kern der Zelle regulieren, oder in der Formation eines Multiproteinkomplexes resultieren, wie es für das Taspase1-Substrat MLL bekannt ist (Hsieh *et al.* 2003). Nach Spaltung des MLL durch Taspase1 lagern sich die beiden großen Fragmente p320 und p180 zu einem Hetero-Dimer zusammen. Die Hetero-Dimerisierung stellt im Folgenden den entscheidenden Schritt für die Stabilisierung sowie die nukleäre Lokalisation von p320 und für die geregelte *HOX*-Genexpression dar (Hsieh *et al.* 2002, Yokoyama *et al.* 2002, Hsieh *et al.* 2003). Eine vergleichbare Dimerisierung sowie die Koordination der nukleären Lokalisation des N-terminalen Spaltprodukts wären für das Myosin1F denkbar.

Die Tatsache, dass das N-terminale Spaltprodukt im Gegensatz zu anderen Expressionskonstrukten im Kern lokalisiert, könnte möglicherweise auf die Beteiligung aktiver zellulärer Transportprozesse zur Regulierung der biologischen Funktion von Myosin1F hindeuten. Daher erfolgten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Existenz möglicher Transportsignale. Dazu wurden zunächst bioinformatische Analysen sowie die chemische Inhibition des Kernexports vorgenommen. Experimentelle Daten zeigten, dass das N-terminale Spaltkonstrukt nach Behandlung mit dem Exportinhibitor LMB im Zellkern akkumuliert. Die Lokalisation der Myosin1F-Wildtypform sowie der spaltungsdefizienten Mutante wurde hierdurch nicht beeinflusst, allerdings konnte eine schwache Umlagerung des C-terminalen Spaltprodukts in den Kern der Zelle beobachtet werden. Auch dies könnte auf eine mögliche nukleäre Funktion des Myosin1F N-Terminus im Zellkern hindeuten. Für eine N-terminale Peptidsequenz des MYO1C konnte bereits eine Lokalisation im Zellkern und eine damit verbundene Kolokalisation mit der RNA-Polymerase II beschrieben werden (Nowak *et al.* 1997, Pestic-Dragovich *et al.* 2000).

Um zu analysieren, ob ein LMB-sensitives Kernexportsignal im Myosin1F existiert, wurde in der Sequenz nach einer hydrophoben, besonders Leucin-reichen Region gesucht, welche typisch für nukleäre Exportsignale (NES) ist. Bioinformatische Analysen mit dem Programm NES-Finder 2.0 identifizierten insgesamt 12 potenzielle NES-Sequenzen. Da der Effekt der Akkumulation im Kern nach LMB-Behandlung für das N-terminale Fragment

am eindeutigsten war, wurden für weitere Analysen die beiden potenziellen NES-Signale im entsprechenden N-terminal der Taspase1-Schnittstelle liegenden Aminosäurebereich ausgewählt.

Die Sequenzen wurden in pc3-GST-NES-GFP-Plasmide integriert, in Bakterien des Stammes BL21 exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die rekombinanten Proteine wurden nachfolgend in den Zellkern von Vero-Zellen mikroinjiziert. Die Analyse der Transportkinetik erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Binnen der ersten zwei Stunden war die Translokation eines der beiden potenziellen Exportsignale (NESII) vom Zellkern in das Zytoplasma der Zelle zuverzeichnen, während die zweite Peptidsequenz (NESI) keine Lokalisationsänderungen zeigte. Nach 3 Stunden waren auch keine weiteren Veränderungen in der Lokalisation des NESII erkennbar. Die Fluoreszenz des injizierten Proteins nahm jedoch stark ab, sodass eine Dokumentation nur noch schwer möglich war. Der Export aus dem Zellkern lässt jedoch auf die Existenz eines schwachen LMB-sensitiven NES schließen. So könnte das N-terminale Fragment aktiv aus dem Kern transportiert werden, der erneute Zugang zum Zellkern wäre aufgrund des geringen Molekulargewichts über passive Diffusion möglich. So könnte das N-terminale Fragment nach Abspaltung als Signalmolekül im Kern fungieren und anschließend wieder aktiv aus dem Kern exportiert werden. Die Regulation dieser Signalkaskade könnte durch Taspase1-Spaltung und die Bindung an das C-terminale Fragment reguliert sein und so als potenzieller Signalweg für Adhäsion und Migration dienen. In der Dissertation von C. Bier fiel zudem auf, dass epitheliale humane H441-Lungenadenokarzinom-Zellen, die Myosin1F-GFP stabil über einen längeren Zeitraum exprimieren, anscheinend irgendwann nicht mehr in der Lage sind, zu proliferieren (Bier 2010). Die molekulare Ursache dieses Phänomens ist jedoch noch völlig unklar (Bier 2010) und müsste durch umfassende weiterführende Studien geklärt werden. Allerdings wäre zusammen mit den Daten von Bier (2010) ein Einfluss des Myosin1F auf den Zellzyklus durchaus denkbar. Eine mögliche Verbindung könnte in der potenzielle Funktion des Myosin1F an den Lammelipodien zu finden sein. Lammelipodien fungieren als Sensoren für die Zellumgebung und sind von großer Bedeutung für die Zelladhäsion (Christoph Wagener 2009). Da sowohl die Umgebung, als auch die Zelladhäsion wichtige Parameter für die Zellteilung darstellen könnte das Myosin1F somit Einfluss auf den Zellzyklus nehmen. Möglicherweise könnte die

Abspaltung des N-terminalen Fragments als Signal fungieren. Zudem besitzt die Regulation der Zelladhäsion während des Zellzyklus eine bedeutende Funktion. So wird über spezifische Regulationsmechanismen gewährleistet, dass die Zellen während der Interphase adhären sind und sich zur Teilung vom Substrat ablösen (Schmitz 2009, Alberts 2012).

5.5 FUNKTIONSUNTERSUCHUNGEN VON MYOSIN1F

5.5.1 MYOSIN1F IN DER ZELLTEILUNG

Aufgrund der nukleären Lokalisation von Teilen des Myosin1F und der in der Arbeit von C. Bier gewonnenen Hinweise auf eine möglicherweise verminderte Zellteilungsrate infolge einer stabilen Myosin1F-Expression, wurde Myosin1F hinsichtlich möglicher Funktionen im Zellzyklus analysiert. 2007 wurde der Einfluss von Myo16b auf die verzögerte Progression der S-Phase des Zellzyklus sowie eingeschränkte Zellteilung gezeigt (Cameron *et al.* 2007). Später wurde die regulatorische Funktion von Myo16b in der Zellzyklus-Progression nachgewiesen. Zudem unterliegen die RNA- und Proteinmengen der zellzyklusspezifischen Regulation und ein Myo16b-Mangel führt zu Veränderungen der Zellzyklusphasen (Cameron *et al.* 2013).

Für Myosin1F sowie seine spaltungsdefiziente Mutante und das C-terminale Spaltprodukt konnte im Rahmen dieser Arbeit die membranassoziierte Lokalisation in allen Mitosestadien festgestellt werden. Das N-terminale Spaltprodukt ist hingegen nicht membranassoziiert, sondern zytoplasmatisch lokalisiert. Diese Daten spiegeln zunächst die Lokalisation in Interphasezellen wieder, weisen jedoch auf die generelle Membranassoziation des Myosin1F über dessen C-terminale TH1-Domäne hin. Diese ermöglicht folglich die Bindung an die Membran in mitotischen wie auch Interphase-Zellen, ist also nicht Zellzyklus-abhängig.

Beim Wildtyp-Konstrukt wie auch der Mutante fiel im weiteren Verlauf der Mitose die starke Konzentration der grünen Fluoreszenz zwischen den sich trennenden Tochterzellen auf. Bei tierischen Zellen kommt es während der Telophase zur Bildung eines kontraktiven Ring aus Aktinfasern auf Höhe der Metaphaseplatte (Stryer). Dabei wird die Zellmembran zwischen den Tochterkernen nach innen gezogen. Der kontraktile Ring

wird zusammen mit Myosin so weit verengt, bis die Plasmamembranen fusionieren und sich die Tochterzellen voneinander trennen (Häcker 2005). Die Kontraktion verläuft analog zur Muskelkontraktion über den sogenannten molekularen Ruderschlag, bei dem sich die Filamente gegeneinander verschieben (Sweeney und Houdusse 2010). Da der kontraktile Ring neben Aktin-Filamenten und aus Myosinfilamenten besteht, ist eine zellteilungsspezifische Funktion von Myosin1F durchaus denkbar. Die Hypothese wird weiterhin dadurch gestützt, dass auch für Taspase1 bereits eine Funktion in der Zellproliferation nachgewiesen werden konnte (Chen *et al.* 2010). Im Zuge dieser Vermutungen sind jedoch weitere Experimente notwendig um diese Hypothese zu bestätigen. So sind z.B. Myosin1F und Taspase1 siRNA-Versuche sowie Zellteilungsanalysen oder Untersuchungen der Wachstumsraten für den Nachweis einer zellteilungsspezifischen Funktion von Myosin1F unumgänglich. Im Falle von siRNA-Versuchen sind besonders Untersuchungen der Teilungskinetik sowie die Analyse des Phänotypen im Bezug auf Chromosomale-Abberationen, oder die Ausbildung von Mikronulei wichtig.

5.5.2 DIE FUNKTION DES MYOSIN1F IN DER ZELLADHÄSION

Das im Rahmen der chromosomalen Translokation mit dem MLL entstehende Fusionsprotein beinhaltet nahezu das komplette Myosin1F einschließlich dessen Schnittstelle für Taspase1. Da das entstehende Fusionsprotein weder eine Transaktivierungs- noch eine Dimerisierungs-Domäne enthält, welche für eine aberrante Genaktivierung benötigt werden, ist bislang unklar, wie das MLL•Myosin1F-Fusionsprotein an der Leukämieentstehung beteiligt ist (Taki *et al.* 2005, Duhoux *et al.* 2011). Besonders im Fall des Myosin1F handelt es sich um ein bisher nur unzureichend charakterisiertes Taspase1-Substrat. Die mögliche Antwort zur Involvierung des Myosin1F in Leukämogenese und Onkogenese könnte in dem besseren molekularen Verständnis seiner molekularen Funktion zu finden sein.

Kim *et al.* (2006) wiesen eine hohe Myosin1F-Expression in Zellen des Immunsystems nach und zeigten, dass Myosin1F das Migrations- und Adhäsionsverhalten von Immunzellen beeinflusst. Ein weiterer Hinweis auf die Funktion konnte im Rahmen der Dissertation von C. Bier gewonnen werden, die zeigte, dass das Ablösen von Myosin1F-

exprimierenden Zellen von ihrem Untergrund mittels Trypsin deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt als bei GFP-exprimierenden Kontrollzellen der gleichen Linie (Bier 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die bis *dato* beschriebene Funktion von Myosin1F in Immunzellen auf die Adhäsion und Migration von adhären Ten Tumor- und Nicht-Tumorzellen erweitert werden kann. Es wurde nachgewiesen, dass Zellen durch die Expression von Myosin1F schneller auf unbeschichteten Kulturgefäßen adhäreren als GFP-exprimierende Kontrollzellen. Die fingerförmigen Strukturen, die sich infolge der Myosin1F-GFP- Expression nachweisen lassen, sind bereits 15 min nach Aussaat der Zellen deutlich an der Zellmembran erkennbar und prägen sich im weiteren Verlauf der Adhäsion stärker aus. Weiterführend ist die Adhäsion durch Integrin- stimulierende Substanzen beeinflusst. So adhäreren Myosin1F-exprimierende Zellen verglichen mit GFP-exprimierenden Zellen auf Fibronectin-Beschichtung deutlich schneller. Die extrazelluläre Proteindomäne der Integrine erkennt Substanzen wie Fibronectin, die die Zelladhäsion fördern (Keselowsky *et al.* 2003). Da Myosin1F-exprimierende Zellen verglichen mit GFP-exprimierenden Zellen auf Fibronectin-Beschichtung schneller adhäreren kann von einem Einfluss der Integrine auf die Adhäsion von Myosin1F-exprimierenden Zellen ausgegangen werden. Zusammenfassend kann die bis *dato* beschriebene Funktion von Myosin1F in Immunzellen auf die Adhäsion und Migration von adhären Ten Tumor- und Nicht-Tumorzellen erweitert werden. So ist zu vermuten, dass Taspase1 über die Spaltung von Myosin1F das Adhäsionsverhalten der Zellen zu verändern vermag und so die im Rahmen der Zellteilung nötige Ablösung vom Untergrund beeinflusst. Unterstützt werden Vermutungen in diese Richtung zudem durch die Ausbildung der fadenförmigen Strukturen an der Zelloberfläche. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen müssen jedoch im Folgenden analysiert werden.

5.5.3 INVOLVIERUNG DES MYOSIN1F IN DIE AUSBILDUNG VON LAMELLIPODIEN

Erste Hinweise auf eine mögliche Funktion des Myosin1F in der Zellmigration konnten durch die Lokalisation des Myosin-I am Leitsaum von Zellen bei der Migration gewonnen werden (Fukui *et al.* 1989). Die amöboide Bewegung beruht im Wesentlichen auf der dynamischen Umgestaltung zweier Zellstrukturen und auf der Anheftung an die extrazelluläre Matrix. Strukturell führen die Verlängerung fibrillärer Proteine (Aktin) und

der nachfolgende Einbau von Membranvesikeln in Bewegungsrichtung zur Bildung der Zellfortsätze (Filopodien und Lamellipodiums). Durch Expression von Myosin1F konnte die Ausbildung langer fadenförmiger Strukturen an der Zelloberfläche adhärenter Zellen beobachtet werden. Da der auftretende Phänotyp dem für Myo16 aufgezeigten Phänotyp entspricht, bei dem es sich um Filopodien und Lamellipodien handelt (Cameron *et al.* 2007), kann darauf geschlossen werden, dass Myosin1F in den Filopodien der Zellen lokalisiert ist.

Durch den Nachweis der Kolo-kalisation von Myosin1F mit Markerproteinen der Lamellipodien wie Paxillin, Aktin oder Integrin- β wurde die Lokalisation des Myosin1F in den Lamellipodien im Rahmen dieser Arbeit bestätigt.

Die Lokalisation von Myosinen in diesen Strukturen konnte bereits 1992 für Myosin I gezeigt werden (Wagner *et al.* 1992). Aufgrund dieser zahlreichen Indizien wurde die Funktion von Myosin1F in der Zellbewegung weiterführend im Detail untersucht.

Zeitgleiche Arbeiten konnten zeigen, dass Myosin1E sich zu den Spitzen der aktiven Lamellipodien und Aktin-reichen frühen Adhäsionspunkten bewegt, im Gegensatz zu Myosin1G, 1B oder 1C, den sogenannten Kurzschwanz-Isoformen (Gupta *et al.* 2013). Darüber hinaus hängt die Bewegung des Myosin1E von der Aktin-bindenden Domäne sowie der Anwesenheit der SH3 Oligomerisierungsdomäne ab (Gupta *et al.* 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte analog hierzu die Interaktion von Myosin1F mit Aktin nachgewiesen werden. So könnte sich auch Myosin1F, wie für unkonventionelle Myosine postuliert, entlang von Aktin-Filamenten zu den Spitzen der Filopodien bewegen (Hasson und Cheney 2001, Richards und Cavalier-Smith 2005). Ebenso wie das Myosin1E handelt es sich bei Myosin1F um ein Langschwanz-Myosin, welche durch die in der Schwanzregion lokalisierten Th1-, TH2 und TH3-Domänen (auch als SH3-Domänen bezeichnet) definiert sind. Die Domänen dienen als Bindestelle für eine Vielzahl von Interaktionspartnern (Crozet *et al.*, 1997; Krendel und Mooseker, 2005). Die nachgewiesene Funktion des Myosin1E als Transporter, lässt sich somit vermutlich auf Myosin1F und damit den Langschwanz-Myosinen im Allgemeinen ausweiten.

In der Arbeit von Gupta wurde des Weiteren gezeigt, dass die Überexpression einer Myosin1E-Deletionsmutante, welcher die am C-Terminus lokalisierte (SH3)- Domäne fehlt, die Lebensdauer und Stabilität von Adhäsionspunkten verringert (Gupta *et al.* 2013). Im Rahmen der Untersuchungen des Myosin1F wurden diese Daten für das Myosin1F

bestätigt, da das C-terminale Fragment weiterhin zum Großteil an der Membran lokalisiert, jedoch deutlich stärker als das Volllänge-konstrukt im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Zudem sind die fingerförmigen Auswüchse an der Zelloberfläche, welche bei der Expression der Wildtypform auftreten, nicht mehr erkennbar. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Publikation von Gupta *et al.* eine wichtige Funktion beim Transport essenzieller Proteine der Aktin-Polymerisierung, wie auch an der Stabilisierung von Adhäsionspunkten beteiligter Proteine postuliert. Das Aktin-Netzwerk assembliert in aktiven Lamellipodien kontinuierlich am Rand der Zellen, wandert dann weiter ins Innere der Zelle und disassembliert dort wieder (Verkhovskiy *et al.* 1999, Verkhovskiy *et al.* 1999). Hierbei stellt sich die Frage, wie Aktin-bindende Proteine oder andere Komponenten zum Leitsaum der Zelle transportiert werden und entstehende Adhäsionen stabilisiert werden. Der aktive Transport von Komponenten spielt damit eine bedeutende Funktion in der Zellbewegung, allerdings sind die beteiligten Komponenten nahezu unbekannt. Für Myosin1F kann folglich durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse eine Funktion als Transporter für diverse Komponenten zum Leitsaum der Zelle postuliert werden. Dadurch hilft es die entstehenden Adhäsionen zu stabilisieren. Folglich wären weitere Interaktionsstudien mit anderen Proteinen der frühen fokalen Adhäsionen von Interesse. Zudem wären Untersuchungen eines Myosin1F-*Knockdown* von großer Relevanz um die Funktion des Proteins in den Lamellipodien besser definieren zu können.

5.5.4 EINFLUSS VON TASPASE AUF DIE AUSBILDUNG VON FILOPODIEN

Filopodien sind Aktin-reiche Ausstülpungen der Plasmamembran, die für viele essenzielle Prozesse wie Zelladhäsion, Migration, Angiogenese und die Formation von Zellkontakten von wichtiger Bedeutung sind (Mattila und Lappalainen 2008). Durch das Abtasten der Umgebung, die Ausbildung, Ausrichtung und Lokalisation von Fokalkontakten determinieren sie zudem die Bewegungsrichtung der Zelle, indem sie an der Front des Leitsaums die Umgebung nach geeigneten Voraussetzungen für die Anheftung ans Substrat sondieren (Riveline *et al.* 2001, Steketee *et al.* 2001, Wang *et al.* 2005). Besonders in Zellen des Immunsystems ist die Ausbildung von Strukturen zur Sondierung der Umgebung von Bedeutung, z. B. um Schadmaterial aufzufinden. Zudem sind die Zellen des Immunsystems besonders beweglich und weisen hohe

Wanderungsgeschwindigkeiten über hohe Distanzen auf (Schafer *et al.* 2009). Dies ist gut mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen der Proteinmengenanalyse zu korrelieren. An den Spitzen der Ausstülpungen könnte Myosin1F somit an der Sondierung der Umgebung durch sogenannte Lamellipodien beteiligt sein. Zudem könnte gefolgert werden, dass eine große Menge an Myosin die schnelle Migration fördert. Der dynamische Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionen spielt vor allem bei der Zellmigration eine zentrale Funktion.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterführend gezeigt werden, dass das Myosin1F-Taspase1- Zusammenspiel die Ausbildung der Filopodien beeinflusst.

Untersuchungen von Zellen mit unterschiedlich starker Myosin1F-GFP-Expression zeigten, dass die Ausbildung der Filopodien bereits bei kleinsten transfizierten DNA-Mengen nachweisbar ist. Die Erhöhung der Plasmidmenge und damit einhergehenden Myosin1F-Expression führte nicht zur vermehrten oder stärkeren Ausbildung der Strukturen in adhären Zellen. Die transfizierte Plasmid- und damit einhergehende Myosin1F-Menge in der Zelle beeinflusst somit nicht den Phänotyp der ausgebildeten Strukturen. Aus welchem Grund die untersuchten Immunzellen eine derart stark erhöhte Menge an Myosin1F-Transkript zeigen, ist daher weiterführend zu untersuchen. Dafür wäre eine Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Zelllinien sowie alle Komponenten des Immunsystems interessant. Dadurch könnten weiterführend die Expressionsunterschiede besser mit möglichen Funktionen in Verbindung gebracht werden. Jedoch ist auch in diesem Fall der Einfluss eines Myosin1F- *Knockdown* zu untersuchen und insbesondere der Vergleich zu Zellen mit weniger starker Myosin1F-Expression von großem Interesse.

In Zelllinien mit niedrigen endogenen Taspase1-Mengen lokalisiert Myosin1F deutlich an der Zellmembran und führt zur Ausbildung von Filopodien. In Zellen mit hohen endogenen Taspase1-Mengen konnte hingegen eine reduzierte Filopodienausbildung sowie die verminderte Membranassoziation des Myosin1F gezeigt werden. Analog dazu wurde nachgewiesen, dass die Filopodien bei geringen Mengen kotransfizierter Taspase1 stark ausgebildet sind. Die Erhöhung der Taspase1-Menge führt jedoch zu einer Abnahme dieser Strukturen und zu der stärker zytoplasmatischen Lokalisation des Myosin1F. Aufgrund der im Vergleich hohen Taspase1-Menge und der Detektion des Spaltprodukts im Westernblot könnte die starke Zytoplasmafärbung durch die vermehrt

zytoplasmatische Lokalisation nach Spaltung des Volllänge-Proteins erklärt werden. Folglich kann dadurch wiederum die zuvor diskutierte vermehrte Myosin1F-Spaltung bei starker Taspase1-Expression unterlegt werden. Findet eine Prozessierung durch Taspase1 statt, wird ein Teil der Kopfdomäne gemeinsam mit der ATP-Bindestelle abgespalten. Zudem resultierte die Immunfluoreszenzfärbung von endogenem Myosin1F mit dem N-terminal (N14)- bindenden Antikörper in einer Färbung der Zellkerne, was mit der Expression des N-terminalen Spaltprodukts korreliert. Dies unterstreicht ebenfalls die mögliche Spaltung und die damit einhergehende verminderte membranassoziierte Lokalisation von Myosin1F und gibt demnach ein erster Hinweis darauf, dass die Abspaltung des N-Terminus die Lokalisation des Spaltprodukts im Zellkern nach sich zieht.

Zusammenfassen ist nicht die Myosin1F-Expression in der Zelle sondern die Taspase1-Menge von zentraler Bedeutung für die Regulation der Filopodienausbildung. Die erhöhte Zahl von Filopodien konnte bereits mit erhöhter Invasierung, erhöhter Aggressivität und verminderter Überlebensrate in einer Vielzahl von Krebstypen nachgewiesen werden. Die Invasion von Tumorzellen in das umgebende Gewebe ist Voraussetzung für die Ausbreitung von Krebs. Aus bestehender Literatur wird deutlich, dass viele Filopodien-induzierende Proteine ebenfalls in die Entstehung einiger Krebsarten involviert sind (Arjonen *et al.* 2011). Dies stützt erneut die These, dass Myosin1F wie auch Taspase1 nicht nur eine Funktion in Zellen des Immunsystems und der Leukämogenese, sondern auch in adhärennten Zellen und der Onkogenese im Allgemeinen spielen. Wie bereits erwähnt, scheint die Prozessierung von Myosin1F neben dem veränderten Adhäsions-auch ein verstärktes Migrationsverhalten zu bewirken, was darüber hinaus für die Metastasierung von Krebszellen von großer Bedeutung sein könnte.

5.5.5 MYOSIN1F IN DER SIGNALTRANSDUKTION

Frühe Adhäsionen, sogenannte Fokalkomplexe, entstehen beim Vorschub des Lamellipodiums (Protrusion) nahe der Zellfront. Sie sind recht klein ($0.25\mu\text{m}^2$) und enthalten neben $\alpha_5\beta_3$ -Integrin andere Proteine wie Talin, Paxillin und Phosphotyrosin.

Paxillin und Talin sind Adapterproteine in der Signaltransduktion (Zamir und Geiger 2001, Zaidel-Bar *et al.* 2004) und Marker-Proteine der frühen fokalen Adhäsionen (zusätzlich zu

Integrin- β 1). Im Rahmen dieser Arbeit konnte, neben den zuvor diskutierten Kolokalisationen, die Interaktion von Myosin1F mit Paxillin und mit Talin gezeigt werden. Da es sich bei Paxillin und Talin um Markerproteine der frühen fokalen Adhäsionen handelt, kann vermutet werden, dass sich Myosin1F bereits sehr früh zu den Spitzen der Filopodien bewegt und zur Stabilisierung von Matrix-Adhäsionspunkten in den Lamellipodien beiträgt. Es könnte dabei die bereits vermutete wichtige Funktion beim Transport von Proteinen spielen (Gupta *et al.* 2013). Die weniger stark ausgeprägte membranassoziierte Lokalisation der Mutante könnte dann durch den daraus resultierenden Funktionsverlust bedingt sein. Dies legt nahe, dass die Prozessierung von Myosin1F neben dem veränderten Adhäsions- ein verstärktes Migrationsverhalten bewirkt, was vor allem im Hinblick auf die Metastasierung von großer Bedeutung sein könnte. Hierzu sind jedoch Experimente zur (Tumor-) Zellmigration unabdingbar. Diese könnten zum Beispiel in Form weiterer *live cell*-Experimente erfolgen, bei denen das Migrationsverhalten der Zellen analysiert wird. Von besonderem Interesse wären weiterführend siRNA Experimente um den Einfluss eines Myosin1F-*Knockdown* auf das Migrationsverhalten zu untersuchen. Allerdings wäre auch die Durchführung von sogenannten Wundheilungsversuchen und *Scratch*-Versuchen von zentraler Bedeutung. Über eine direkte Verbindung ist Paxillin mit dem zytoplasmatischen Teil des Integrin- β assoziiert (Turner *et al.* 1990). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Kolokalisation des Myosin1F mit Integrin- α und - β gezeigt werden. Bei Färbung mit dem Integrin- α Antikörper fällt auf, dass die Kolokalisation mit Myosin1F besonders in den fingerförmigen Ausstülpungen der Zellen ausgeprägt ist. Die Interaktionsanalyse hinsichtlich endogener Proteine mittels IP war aufgrund von unspezifischen Bindungen der Integrine an die magnetischen Beads deutlich erschwert. Es zeigten sich zwar erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion, eine eindeutige Aussage ist aufgrund unspezifischer Bindungen jedoch nicht zweifelsfrei möglich gewesen. Zusammenfassend wird vermutet, dass Myosin1F in die Ausbildung fokaler Adhäsionen involviert ist und dort den Transport wichtiger Proteine katalysiert. Durch Polarisation der Aktin-Filamente können Motorproteine aktiv Cargoproteine, wie beispielsweise für Integrine, zu den Spitzen der Filopodien transportieren (Riveline, Zamir *et al.* 2001; (Zaidel-Bar *et al.* 2004). Bereits 2004 wurde vorgeschlagen, dass Integrine von unbekanntem Myosinen transportiert werden und damit den zellulären Umbau erleichtern (Vuori und Ruoslahti

1999). Aufgrund von *knockdown*-Experimenten und Mutationen des Myosin-X wurde gezeigt, dass Myosin-X Integrine bindet (Zhang *et al.* 2004). Daraufhin wurde postuliert, dass diese im Folgenden zur Stabilisierung und vermutlich zur Funktionalität der Ausstülpungen migrierender Zellen beitragen. Die zeitgleiche Arbeit von Gulpa *et al.* zeigte außerdem die Kolo-kalisation von Myosin1E mit CARMIL, FHOD1, Arp3 und β 3-Integrin in den frühen Adhäsionen am Leitsaum der Zelle (Gupta *et al.* 2013) und unterstützt damit die hier erzielten Daten.

Unter Berücksichtigung der zuvor diskutierten Ergebnisse könnte hier die Verbindung zu dem gezeigten Einfluss Integrin-stimulierender Substanzen auf die Adhäsion von Myosin1F-exprimierenden Zellen liegen. So ist es denkbar, dass Paxillin als Signalüberträger zwischen Myosin1F und den Integrinen fungiert und Signale die von außen die Integrine stimulieren (out-side-in-signaling) weiterleitet. Auf der anderen Seite wäre es denkbar, dass das Myosin1F als Transporter für das Paxillin, Talin, oder Integrine zu den Spitzen der frühen fokalen Adhäsionen dient.

Ein Einfluss Integrin-stimulierender Substanzen durch die Beschichtungen der Zellkulturschalen mit Fibronectin oder Kollagen auf den Phänotypen Myosin1F-exprimierender Zellen konnte nicht festgestellt werden. Allerdings sollten auch in diesem Fall Analysen auf molekularer Ebene folgen, um die Aussagen zu untermauern. Aus diesem Grund sind z.B. die Analyse der Proteinexpression, oder der zellulären Verteilung des Myosin1F nach Behandlung mit Integrin-stimulierenden Substanzen durch Erstellung fraktionierter Zellsate und Westernblot durchzuführen. Weiterführend wäre auch hier die Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Zelllinien von Interesse. Um den Einfluss der Umgebung zu untersuchen, wären außerdem Co-Kultivierungen, wie 2D- oder 3D Kultivierung durchzuführen. So gibt es bisher in der Literatur keine konkreten Angaben, inwiefern der Differenzierungsgrad der Zelle und/oder die unterschiedlichen Kulturbedingungen *in vitro* Einfluss auf z.B. Integrine nehmen. Für die spezifischen Untersuchungen des Einflusses der ECM auf Myosin1F wären folglich z. B. co-Kultivierungsexperimente durchzuführen.

Im Einklang mit der potenziellen Stabilisierung der frühen Fokalkontakte durch Myosin1F wurde gezeigt, dass die Integrin-vermittelte Adhäsion der Filopodien zur Rac1 abhängigen Bildung von Lamellipodien führt. Kleine GTP-asen der Rho-Familie, wie

Rac1, Cdc42 und RhoA konnten bereits als maßgeblich an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligte Faktoren beschrieben werden. Rac1 beansprucht dabei eine essenzielle Funktion bei der Ausbildung von Lamellipodien (Sasaki *et al.* 2004). CDC42 hat aktivierende Wirkung auf den Arp2/3-Komplex, wodurch es an der Ausbildung von Endosomen beteiligt ist (Stradal und Scita 2006). Sowohl für Rac1 als auch für Cdc42 und die konstitutiv aktiven Formen beider Enzyme konnte im Rahmen dieser Arbeit die Kollokalisierung in den fingerförmigen Strukturen an der Zellmembran beschrieben werden. Die durchgeführten biochemischen Interaktionsanalysen mit unterschiedlichen Rac-Expressionskonstrukten erlaubten keine Aussage hinsichtlich einer möglichen Wechselwirkung, da auch hier eine unspezifische Bindung der Konstrukte an die GFP-Beads vorlag. Der Nachweis von endogenem Rac1 gab erste Hinweise auf die Interaktion, war aufgrund unspezifischer Antikörperdetektion nicht zweifelsfrei möglich. Um die Interaktion nachzuweisen, müssen somit weitere biochemische Analysen, z.B. durch Ko-IP mit anders oder unmarkierten Konstrukten folgen, oder weitere Antikörper zur verbesserten Detektion der endogenen Proteine getestet werden. Über eine Ko-IP von Myosin1F und Cdc42 konnte die Interaktion von Myosin1F mit der konstitutiv aktiven Form des Cdc42, nicht jedoch mit der inaktiven Form nachgewiesen werden. Der damit nachgewiesene Interaktionsunterschied infolge des Aktivierungsgrad könnte ein wichtiger Schritt in der Signalübertragung auf das Myosin1F, oder von dem Myosin1F ausgehend sein. Da beide Proteine eine Funktion in der Ausbildung der Lamellipodien ausführen, ist es durchaus denkbar, dass die aktiven Formen auch im Fall des Myosin1F als Signalüberträger fungieren. Bezogen auf die mögliche Transporterfunktion des Myosin1F könnte dieses in Folge der Interaktion mit den aktiven Proteinen zum Transport wichtiger Proteine und damit zu der Stabilisierung der fokalen Adhäsionen beitragen.

In Folge entsprechender Stimulation polarisiert die Zelle und bildet eine definierte Front durch die Aktivierung von Rac1 und der PI3-Kinase am Leitsaum der Zelle (Sasaki *et al.* 2004). Letzterer ist durch die Anreicherung von PI3K-Produkten wie: PI 3,4,5-Triphosphat [PtdIns (3,4,5) P3] und PI 4,5-Biphosphat, PI (4,5) P2 charakterisiert (Franca-Koh *et al.* 2007).

Die genaue Funktion der Filopodien bei der Invasion von Krebszellen ist bis zum heutigen Tag nur unzureichend beschrieben. Besonderes Augenmerk liegt jedoch aktuell auf klinisch relevante Lipidkinasen und Phosphatasen wie z.B. PI3K und PTEN.

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinase, PI3K) sind Enzyme, deren zu deren vielfältiger Funktion auch Schlüsselfunktionen wie Migration und Zelladhäsion gehören. Der wichtigste Signalweg der PI3K, ist der PI3K/Akt Signalweg. Die PI3K/Akt-Kaskade ist als ein Ras-Effektor-Signalweg beschrieben, der parallel zu Raf/MEK/ERK verläuft. Zudem kann über PI3K-abhängige Signalwege die Apoptose unterdrückt werden (Fresno Vara *et al.* 2004, Carnero *et al.* 2008). Ein Gegenspieler der PI3K ist die Phosphatase PTEN, ein wichtiger Tumorsuppressor. Hinweise auf eine mögliche Funktion von Myosin1F in diesen Signalweg basieren auf Daten von Chen *et al.*, durch die gezeigt wurde, dass Myosin1F infolge chemotaktischer Stimulation über die Interaktion mit PtdIns(3,4,5)₃P an die Zellmembran von Neutrophilen transportiert wird (Chen und Iijima 2012). Des Weiteren ist bekannt, dass das *second messenger* Lipid-Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (PIP₃) an die TH1 Domäne von *Dictyostelium class I*-Myosinen (ID, IE, and IF) bindet und dies dadurch an die Zellmembran rekrutiert wird. Die PIP₃-regulierte Membranrekrutierung von Myosin I fördert Chemotaxis und induziert die lockstoff-stimulierte Aktin-Polymerisation. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion von Myosin1F mit Akt bestätigt werden. Für weitere Untersuchungen hinsichtlich dieses essenziellen Signalwegs wurde die PI3K durch die kommerziell erhältlichen chemischen Inhibitoren Wortmannin und LY29004 gehemmt. Wortmannin ist ein hochpotenter PI3K-Inhibitor, welcher in höheren Konzentrationen darüber hinaus in der Lage ist, mTOR, die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die Phosphatidylinositol-4-Kinase, die Myosin-leichte-Ketten-Kinase sowie die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) zu inhibieren. LY29004 inhibiert PI3K und damit die Aktivierung von AKT (Vlahos, Matter *et al.* 1994). Die Behandlung Myosin1F-exprimierender Zellen mit diesen Inhibitoren führte zu einer Relokalisierung von Myosin1F von der Zellmembran ins Zytoplasma, allerdings nicht zu einer Veränderung der Proteinmenge. Da auch für Myosin1E gezeigt wurde, dass es durch die PI3K-Inhibition mit Ly294002 zu der Blockierung der transienten Membranrekrutierung kommt (Sanchez-Margalet *et al.* 1994, Maira *et al.* 2009) kann hier von einem Einfluss der Inhibition auf die Langschwanz-Myosine im allgemeinen ausgegangen werden. Der detaillierte molekulare Zusammenhang zwischen PTEN und der Regulation der Filopodien ist allerdings noch unklar. Seit jedoch gezeigt werden konnte, dass die Aktivität von Myosin-X strikt über die Bindung an PI(3,4,5)P₃ reguliert wird und eine PI3K-Inhibition die Myosin-X-abhängige Ausbildung von Filopodien

unterbindet, wird spekuliert, dass die klinische Relevanz der Lipid-Phosphatasen und -Kinasen mit der Filopodienformation verknüpft werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten können diese Hypothese bekräftigen.

Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, dass Myosin1F in COS-7 Zellen durch EGF-Stimulation zur Zellmembran rekrutiert wird (Chen und Iijima 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Kollokalisierung von Myosin1F mit dem EGF-Rezeptor an der Spitze der Filopodien gezeigt werden. Weiterführend konnte die Interaktion von Myosin1F und EGFR biochemisch bestätigt werden. Dies könnte vermuten lassen, dass Myosin1F entweder zum Transport des EGF-Rezeptors an bestimmte Membranbereiche beiträgt, oder aber durch diesen zu den Spitzen der Filopodien rekrutiert wird. Die von Chen publizierten Daten konnten im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden. Die beschriebene EGF-induzierte Rekrutierung des Myosin1F an die Zellmembran wurde durch mikroskopische Untersuchungen lebender, Myosin1F-GFP exprimierender Zellen untersucht und zeigte, dass Myosin1F ohne den Einfluss von EGF deutlich stärker an der Membran lokalisiert als in den von Chen *et al.* publizierten Daten. Dennoch kann unter dem Einfluss von EGF eine verstärkte Membranfärbung beobachtet werden, was die durch Chen erzielten Ergebnisse untermauert. Die biochemische Verifikation der Daten mittels Westernblot zeigt, dass die Intensität der Myosin1F Bande in der Pelletfraktion der mit EGF-behandelten Zellen deutlich zunimmt. Auch hier kann die EGF-induzierte Rekrutierung von Myosin1F an die Membran somit bestätigt werden und den Einfluss von EGF auf die Funktion des Myosin1F unterlegen. Allerdings hatte eine 30-minütige Behandlung mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab kein eindeutiger Einfluss auf den vorab beschriebenen Myosin1F-Phänotyp. Um hierüber allerdings eine abschließende Aussage zu treffen, müssen weitere Analysen nachgeschaltet werden. Zu diesen sollten eine größere Anzahl von Behandlungszeiträumen, Vergleiche zu Positivkontrollen einer Behandlung sowie molekularbiologische Untersuchungen auf Proteinebenen wie z.B. mittels Westernblot gehören.

Dennoch können aus den Daten erste Hinweise auf eine therapeutische Relevanz des Myosin1F-Taspase1-Zusammenspiels gewonnen werden. Wie bereits zuvor diskutiert, scheint das Myosin1F-Taspase1-Zusammenspiel zur Filopodienausbildung beizutragen.

Die erhöhte Zahl von Filopodien ist bisweilen als bedeutend für die vermehrte Metastasierung und erhöhte Aggressivität von Tumoren beschrieben (Machesky 2008, Machesky und Li 2010). Aufgrund der bestehenden Daten ist zu vermuten, dass Myosin1F durch Involvierung in Integrin-abhängige Signalwege einen Beitrag zur Metastasierung leistet. Cetuximab hemmt durch seine Bindung an den EGFR, die Aktivierung des Rezeptors und das nachgeschaltete Signalleitungssystem. Dies hat zur Folge, dass die Invasion der Tumorzellen in gesundes Gewebe und die Metastasierung der Tumoren in neue Körperregionen vermindert werden. Ein Einfluss des Inhibitors auf Myosin1F wäre daher von therapeutischen Interesse.

Da es sich bei Cetuximab jedoch um eine bekannte Substanz handelt wären neue Ansätze, wie z. B. die Unterbindung der Myosin1F-Spaltung durch Taspase1 von großem Interesse. Infolge dessen wären die Auswirkungen der unterbundenen Myosin1F-Spaltung auf die Krebsprogression zu prüfen. Möglicherweise können infolge dessen neue therapeutische Ansätze gewonnen werden.

6 ANHANG

6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μl	Mikroliter
AMoL	akute monozytische Leukämie
AF <i>ALL1</i>	<i>fused gene on chromosome</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	„American type culture collection“
ATP	Adenosin-Triphosphat
AU	„arbitrary units“
BCL2	<i>B-cell lymphoma2</i>
BCR	Bruchpunkt-Cluster-Region
BFP	blau fluoreszierendes Protein
Bp	Basenpaare
bidest.	doppelt destilliert
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CC	<i>Colon Carcinoma</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
Ko-IP	Ko-Immünpräzipitation
CRC	<i>Colo-Rectal Carcinoma</i>
Crm1	<i>Chromosomal Region Maintenance1</i>
CS	<i>Cleavage Site</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
CTP	Cytosin-Triphosphat
Cy3	Carbocyanin 3
D	desoxy
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced chemiluminescence“
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	„Fetal calf serum“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

g	Beschleunigung
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	„Green fluorescent protein“
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
HCC	<i>Hepato-cellular Carcinoma</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HOX	Homeobox
HRP	„Horseradish peroxidase“
IC50	Inhibitorische Konzentration, bei der 50% inhibiert ist
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KM	Mass für die Affinität des Enzyms zum Substrat
LMB	LeptomycinB
m	milli
M	molar
mA	milli Ampère
MAP	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mCh	mCherry-monomeres rot fluoreszierendes Cherry-Protein
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MLL	„mixed lineage leukemia“
MOPS	4-Morpholinopropanesulfonic acid
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
Min	Minute
mut	mutiert
MW	Molekulargewicht
NES	„nuclear export signal“
NLS	„nuclear localisation signal“
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Polyethylenimin
PFA	Para-Formaldehyd
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raum Temperatur

s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Tasp/Taspase1	Threonine Aspartase1
TaspTV	Tasp mit Mutation des Threonin 234 nach Valin
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
TFIIA	Transkriptionsfaktor II A
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
USF2	Upstream stimulatorischer Faktor 2
U	<i>Unit</i>
üN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
WB	Western-BI
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

6.2 SYMBOLE FÜR AMINOSÄUREN

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

6.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1. Häufigste Todesursachen in Deutschland im Jahr 2011	3
Abb. 2. Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Krebsfälle in Deutschland im Jahr 2008	4
Abb. 3. Die „Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg.....	5
Abb. 4. Verteilung von verschiedenen Translokationspartnergenen des MLL bei Kindern und Erwachsenen mit ALL und AML.....	10
Abb. 5. Klassifizierung und Autoproteolyse der Taspase1.....	12
Abb. 6. Lokalisation der potenziellen Taspase1 Zielgene in der Zelle.	15
Abb.7. Domänenorganisation von Myosin1F.....	18
Abb. 8. Taspase1 in der Leukämieentstehung	19
Abb. 9. Zellmigration.....	21
Abb. 10. Integrin-basierte Zell-Matrix-Adhäsion.....	22
Abb. 11. Domänenorganisation von Myosinmolekülen.	25
Abb. 12. Verifizierung der Taspase-Schnitt-stelle im Myosin1F.....	64
Abb. 13. Analyse der Myosin1F-Sensor-Spaltung mittels Westernblot von Gesamtzelllysaten.	66
Abb. 14. Die mRNA Expression von Myosin1F ist in J774-Zellen deutlich höher als in anderen Zelllinien.	68
Abb. 15 Die Taspase-mRNA Expression ist deutlich höher als die Myosin1F mRNA- Transkript Menge	70
Abb. 16. IF-Färbung von Myosin1F-GFP in verschiedenen adhärenenten Zelllinien. Abgebildet ist die Immunfluoreszenzfärbung von endogenem Myosin1F verschiedener Tumor- (Hela-, SW480-Zellen) und nicht-Tumorzellen (293T-, Vero-Zellen) mit Myosin1F H-44 Antikörper. Maßstab: 25 µm.	71
Abb. 17. Analyse der endogenen Proteinmengen von Taspase1 und Myosin1F durch Immundetektion von verschiedenen Zelllysaten	73
Abb. 18 Analyse der endogenen Proteinmengen von Myosin1F und Taspase1 in J774- und Raw-Zellen.....	74
Abb. 19. Einfluss der Taspase1-Schnittstelle auf die Lokalisation des Myosin1F-GFP an der Zellmembran.....	77

Abb. 20. Untersuchung der Antikörperspezifität durch IF-Färbung von Myosin1F-GFP transfizierten Hela-Zellen.....	78
Abb. 21. Vergleich der endogenen Myosin1F-Färbung mit der Expression von Myosin1F-GFP in J774- und Raw-Zellen.....	79
Abb. 22 Detektion der Myosin1F-Spaltung durch Taspase1.....	80
Abb. 23. Erstellung des Myc-Myosin1F-Konstrukts zur Detektion des N-Terminus.....	82
Abb. 24. Myosin1F-Spaltung durch Taspase1.....	84
Abb. 25. MG132-Einfluss auf die Spaltung des Myosin1F durch Taspase1.....	85
Abb. 26. Myosin1F-Spaltung durch rekombinante Taspase1-Proteine.....	87
Abb. 27. Unterschiedliche Lokalisation der Spaltprodukte des Myosin1F in der Zelle ...	88
Abb. 28. Antikörpertest und Lokalisationsstudie von Myosin1F sowie den Spaltprodukten	90
Abb. 29. Einfluss endogener Taspase1-Menge auf die Lokalisation von Myosin1F1....	92
Abb. 30. Taspase1 beeinflusst die Ausbildung fingerförmiger Ausstülpungen durch Myosin1F-GFP an der Zellmembran.....	93
Abb. 31. Etablierung einer Taspase1-cleavage-IP.	95
Abb. 32 Akkumulation des N-terminalen Spaltprodukts im Zell-kern in Folge einer LMB-Behandlung.....	97
Abb. 33. Untersuchung der Myosin1F-Sequenz hinsichtlich potenzieller NES-Sequenzen.....	99
Abb. 34. Export des rekombinanten Myosin1F-NESII aus dem Zellkern	100
Abb. 35. Lokalisation der Myosin1F-Konstrukte während der Mitose.	101
Abb. 36. Lokalisation von Myosin1F während der Zellteilung.	102
Abb. 37. Myosin1F interagiert mit Aktin.	103
Abb. 38. Interaktion von Myosin1F mit Paxillin.	105
Abb. 39. Kolokalisation von Myosin1F mit Rac1.....	106
Abb. 40. Interaktion von Myosin1F mit Cdc42-QL.	108
Abb. 41. Involvierung von Myosin1F in Integrin-abhängige Signalwege.....	110
Abb. 42. Interaktion von Myosin1F mit dem EGF-Rezeptor.....	112
Abb. 43. Einfluss von EGF auf Myosin1F-GFP.....	113
Abb. 44. Involvierung von Myosin1F in den PI3K-Akt-Signalweg.	114
Abb. 45. Einfluss von Myosin1F auf die Zelladhäsion	116

6.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1. Untergliederung der Leukämien	8
Tab. 3. Verwendete Standardgeräte.....	27
Tab. 4. Kits, Verwendungszweck und Hersteller	28
Tab. 5. Zusammensetzung verwendeter Puffersysteme	29
Tab. 6. Verwendete Antibiotika sowie die verwendete Konzentration	29
Tab. 7. Primär-Antigene sowie Hersteller und die verwendeten Verdünnungen.....	29
Tab. 8. Sekundär-Antigene sowie Hersteller und die verwendeten Verdünnungen.....	30
Tab. 9. PCR-Primersequenzen.....	31
Tab. 10. Oligoannealing-Primersequenzen	31
Tab. 11. Primer zur Sequenzanalyse	31
Tab. 12. q-PCR Primer	32
Tab. 13. Eukaryotische Expressionsvektoren sowie die enthaltenen Merkmale.....	32
Tab. 14. Prokaryotische Expressionsvektoren sowie die enthaltenen Merkmale	34
Tab. 15. Charakterisierung der verwendeten Bakterienstämme	34
Tab. 16. Zelllinien	34
Tab. 17. Verwendete Computerprogramme	35
Tab. 18. Zusammensetzung TBjap-Puffer.....	40
Tab. 19. Zusammensetzung der Transformationsreagenzien	40
Tab. 20. DNA-Isolationskits	41
Tab. 21. Kultivierungsmedien und Zusätze zur Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	42
Tab. 22. Kulturgefäßbedingungen	43
Tab. 23. verwendete Inhibitoren	45
Tab. 24. Transfektionsreagenzien	46
Tab. 25. Pufferzusammensetzung.....	48
Tab. 26. cDNA-Synthese Reagenzien.....	52
Tab. 27. cDNA-Synthese Programm	52
Tab. 28. qPCR-Reagenzien.....	53
Tab. 29. qPCR-Programm	54
Tab. 30. Zusammensetzung der verwendeten RIPA-Puffer	55

Tab. 31. Zusammensetzung der SDS-Gele..... 56

Tab. 32. Zusammensetzung der zur SDS-Gelelektrophorese verwendeten Puffer und
Reagenzien 56

Tab. 33. Zusammensetzung der Coomassiefärbelösungen 57

Tab. 34. Zusammensetzung der Westen-Blot-Reagenzien 58

Tab. 35. Zusammensetzung des IP-Puffer 61

6.5 qPCR-DATEN-PRIMEREFFIZIENZ

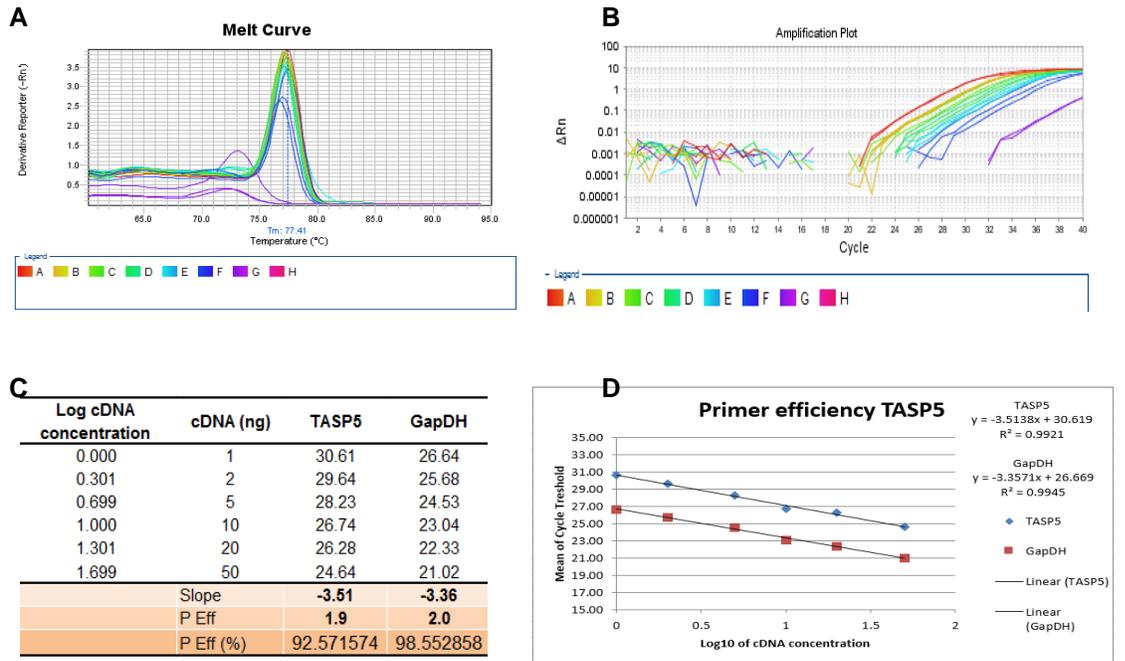


Abb. 47 qPCR-Primereffizienzbestimmung des Tasp5-Primer

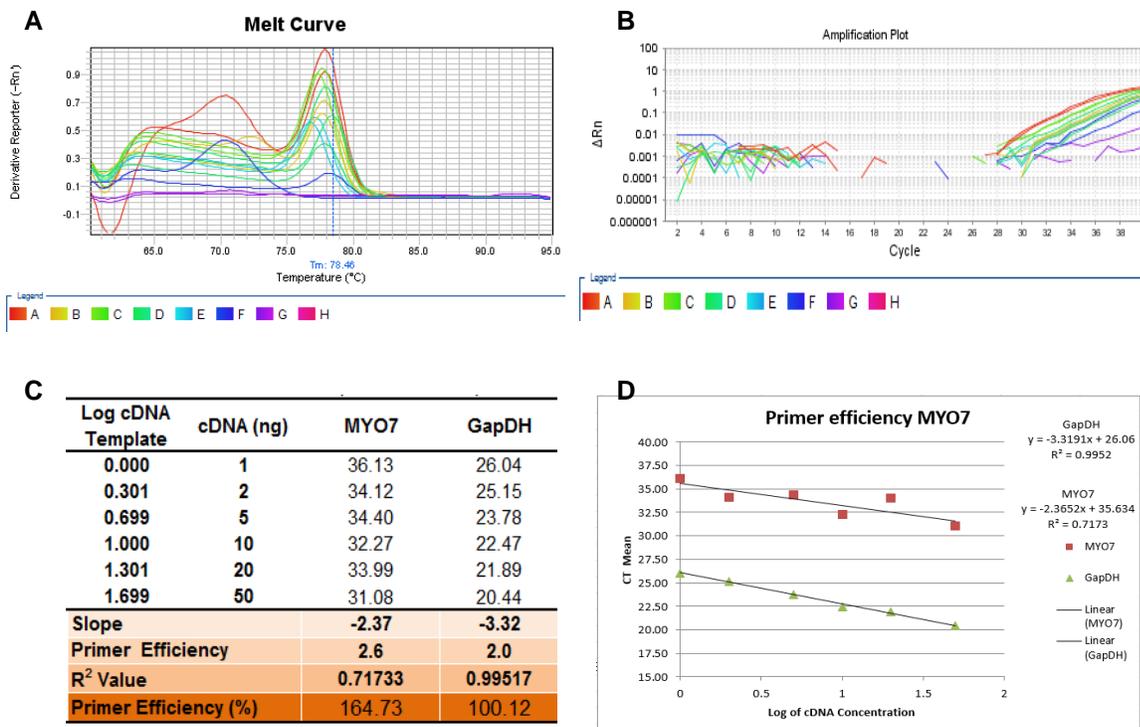


Abb. 48 qPCR-Primereffizienzbestimmung des Myosin1F-Primer von Qiagen

6.6 PLASMID-KARTEN

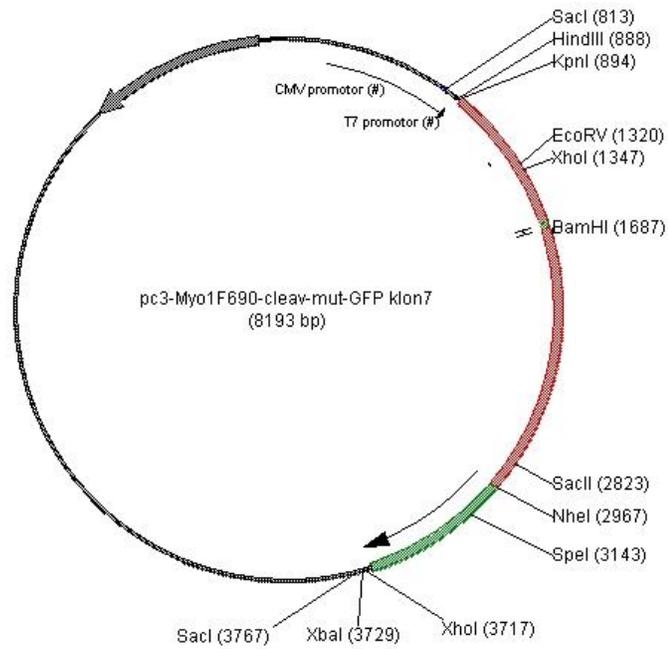


Abb. 49 Myc-Myosin1F 1-690-cs-mut-GFP Expressionsplasmid

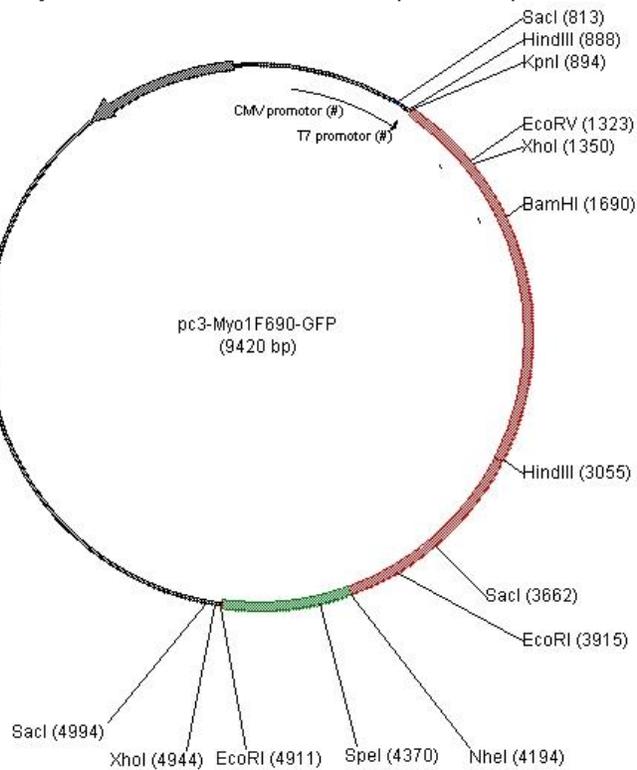


Abb. 50 Myc-Myosin1F 1-690 Expressionsplasmid

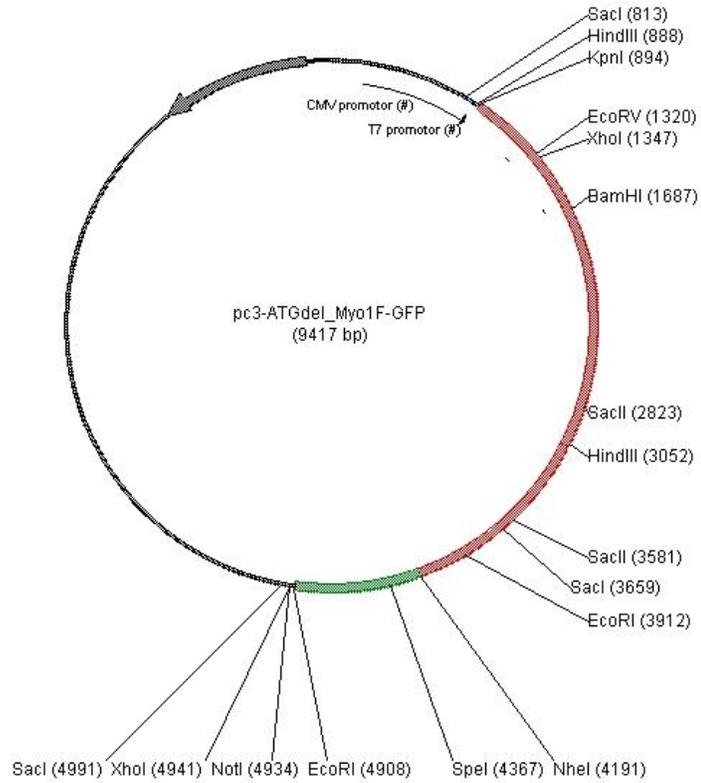


Abb. 51 pC3--Myosin1F 1-ATGdel-GFP Expressionsplasmid

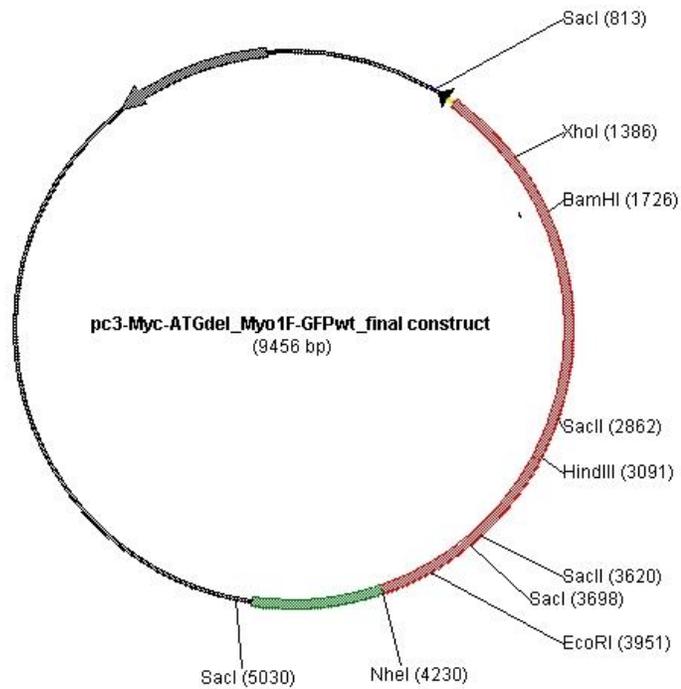


Abb. 52 Myc-Myosin1F-GFP Expressionsplasmid

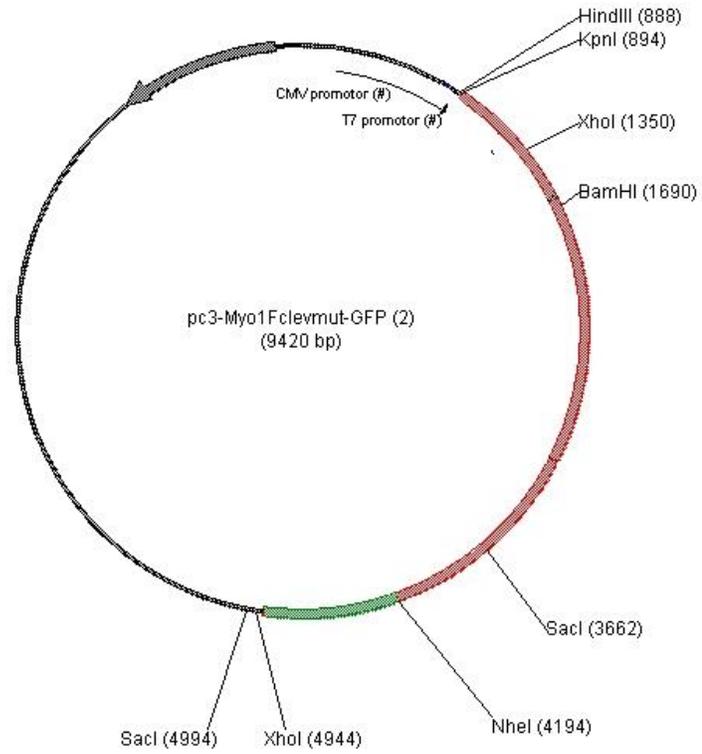


Abb. 53 Myosin1F-mut-GFP Expressionsplasmid

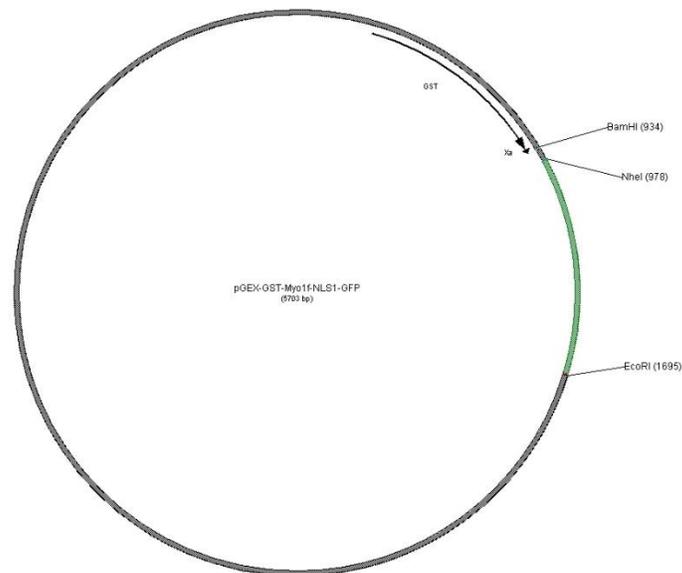


Abb. 54 pGEX- GST-Myosin1F-NESI-GFP Expressionsplasmid

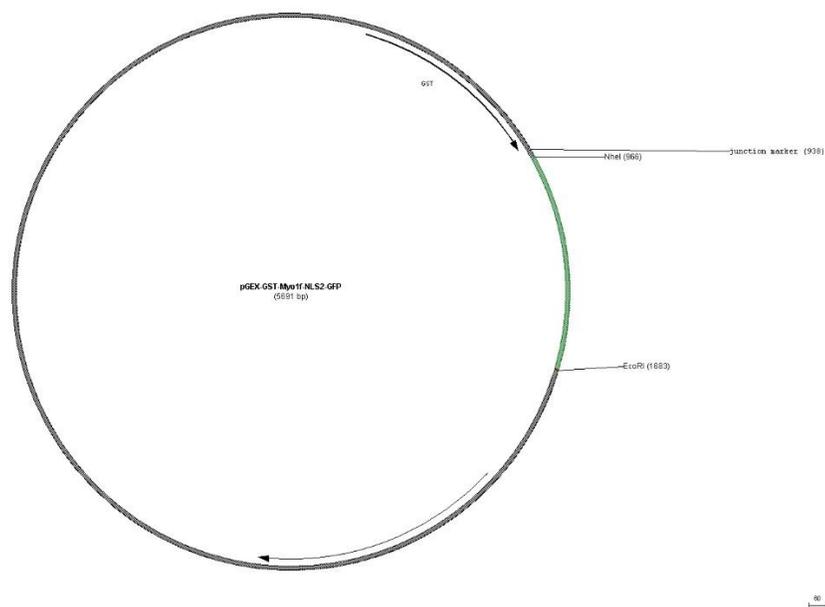


Abb. 55 pGEX- GST-Myosin1F-NESI-GFP Expressionsplasmid

6.7 NCBI GEN ACCESSION NUMBERS DER VERWENDETEN SEQUENZEN

Name	NCBI Accession Number
Taspase1	NM_017714
MLL	NM_005933
TFIIA	NM_015859
Myosin1F	NM_012335

6.8 POSTERPRÄSENTATIONEN

Assessing the role of the protease Taspase1 for the molecular function of Myosin1F **Lena Kunst¹, Carolin Bier², Roland Stauber² and Shirley Knauer¹**

ZMB, Molecular Biology II, University of Duisburg-Essen; ²University Medical Center, Mainz
 (IRUN-Symposium 2011)

6.9 VERÖFFENTLICHUNGEN

Chemico-genetic strategies to inhibit the leukemic potential of threonine aspartase-1

Wünsch D, Fetz V, Heider D, Tenzer S, Bier C, Kunst L, Knauer S, Stauber R.
Blood Cancer J. 2012 Jun;2(6):e77. doi: 10.1038/bcj.2012.22. Epub 2012 Jun 29.

Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization in vivo

Bier C, Knauer SK, Wünsch D, Kunst L, Scheiding S, Kaiser M, Ottmann C, Krämer OH, Stauber RH.
FASEB J. 2012 Aug;26(8):3421-9. doi: 10.1096/fj.11-202432. Epub 2012 May 23

Overexpression of the catalytically impaired Taspase1 T234V or Taspase1 D233A variants does not have a dominant negative effect in T(4;11) leukemia cells

Bier C, Hecht R, Kunst L, Scheiding S, Wünsch D, Goesswein D, Schneider G, Krämer OH, Knauer SK, Stauber RH

Bioassays to monitor Taspase1 function for the identification of pharmacogenetic inhibitors

Knauer SK, Fetz V, Rabenstein J, Friedl S, Hofmann B, Sabiani S, Schröder E, Kunst L, Proschak E, Thines E, Kindler T, Schneider G, Marschalek R, Stauber RH, Bier C.
PLoS One. 2011;6(5):e18253. doi: 10.1371/journal.pone.0018253. Epub 2011 May 25

6.10 VORTRÄGE

“Characterization of the Taspase1 target Myosin1F”

ZMB: Lunch-Seminar, Februar 2012

“Characterization of the Taspase1 target Myosin1F”

ZMB: Lunch-Seminar, April 2013

“Characterisation of the Protease Taspase1”

BIOME-Retreat, September 2012

“Characterisation of the Protease Taspase1”

BIOME-Seminarreihe, Juni 2011

“Characterization of the Taspase1 target Myosin1F”

BIOME-Seminarreihe, Januar 2012

6.11 DANKSAGUNG

„Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person“

Aus diesem Grund ist es an der Zeit mich bei allen Menschen zu bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet haben und mir meine Promotion ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Shirley Knauer für die Vergabe des interessanten Themas sowie die Möglichkeit meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich danke ihr, für die all umfassende Hilfsbereitschaft und die stete Gesprächsbereitschaft, da ohne ihren wertvollen Akademischen Rat diese Arbeit nicht entstanden wäre. Danke, für das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie nicht zuletzt auch für private Gespräche, durch die sie zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter wurde.

Frau Andrea Vortkamp möchte ich herzlich für ihre Unterstützung bei meinem Promotionsverfahren durch die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Von ganzem Herzen danke ich Shirley's Girlies und Rouven, die mir jederzeit als Ansprechpartner zu Seite standen und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik bereicherten. Des Weiteren möchte ich mich für das ausgesprochen nette Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft bedanken und dass sie mich auch in angespannter und gestresster Laune ertrugen.

Darüber hinaus danke ich meinen Kollegen und ehemaligen Mitarbeitern, insbesondere Karolin Jänen und Katherina Overlack das sie mir viele Aufgaben abnahmen sowie ihre hilfreiche Unterstützung im Labor.

Mein Dank gilt auch Johannes van den Boom für die rekombinanten Taspase-Proteine und Olga Müller für ihre unermüdliche Hilfe bei qPCR-Fragen.

Eine herausragende Stellung in jeglicher Hinsicht nehmen meine Freunde und meine Familie ein, da ohne Ihre liebevolle Unterstützung diese Arbeit nicht zu dem Werk geworden wäre, das sie heute ist.

So geht ein besonderer Dank an meine ehemaligen Kommilitonen und Freundinnen Astrid Hensel und Sabrina Beck, die mich mit bereichernden Tipps in meiner Arbeit unterstützt haben und stets zum Ausgleich beitrugen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben sowie für ihre finanzielle und moralische Unterstützung und den liebevollen Rückhalt.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Opa Alfred Kunst, der mich schon früh für die Biologie begeistern konnte. Ohne seine wundervolle Vorbildfunktion und die vielen frühen wundervollen Einblicke in die Vielfalt des Lebens und die Wunder der Natur wäre diese Arbeit nie entstanden.

6.12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Funktionelle Analyse der Protease Taspase1 und ihrem Zielprotein Myosin1F*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Lena Kunst* befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____
Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Unterschrift des/r Doktoranden/in

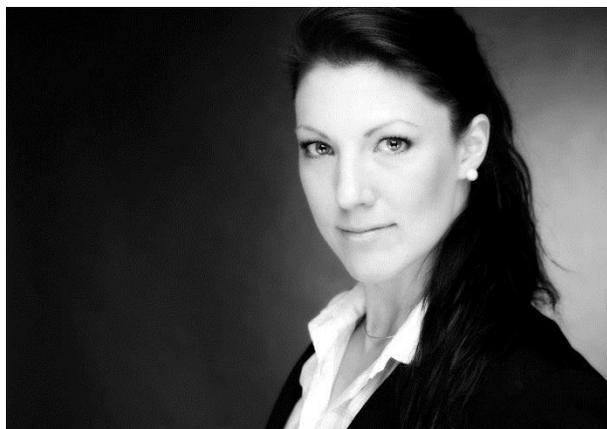
Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Unterschrift des Doktoranden

6.13 LEBENS LAUF

Dipl.-Biol. Lena Kunst (cand. rer. nat.)
Geboren am 01.04.1986 in Bremerhaven



■ Studium/ Weiterbildung

Seit 05/2010	Promotion am ZmB der Universität Duisburg-Essen
10/2011- 03/2012	Fernstudium Patentrecht an der Beuth-Hochschule für Technik in Berlin
05/2010- 06/2013	Teilnahme am BIOME-Graduierten College
10/2005- 05/2010	Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum (Diplom)
07/2002- 04/2005	Lloydgymnasium Bremerhaven& Alfred-Wegner-Institut (Abitur)

■ Praktische Erfahrungen/ Weiterbildung & Qualifikationen

05/2010- 06/2013	Promotionsbegleitend: Biome Graduierten College
10/2013- 10/2013	Praktikum in der Neurologischen Chirurgie an der UKE
05/2010- 06/2013	Weiterbildungsseminare: Projektmanagement, Kommunikative Kompetenz& Rede-/Gesprächstraining, Management von komplexen Forschungsprojekten
Seit 05/2009	Jobs im Bereich Messe und Promotion (Agenturvermittelt sowie auf Selbstständigen Basis)
10/2005- 05/2010	Nachhilfeunterricht im Bereich Naturwissenschaften
08/2002- 06/2003	Auslieferungskoordination und Medikamentenauslieferung für die Rosen-Apotheke Bremerhaven
04/2002- 08/2005	Aushilfstätigkeiten in der Arztpraxis Dr. med. M. Kunst (Vater)
10/2002- 06/2005	Naturwissenschaftlicher Unterricht am Alfred-Wegner-Institut 10/2002- 10/2002
	Praktikum an einer Grundschule in England
03/2001- 04/2001	Praktikum in einer Rechtsanwaltskanzlei in Kooperation mit dem Amtsgericht Bremerhaven
07/2000- 09/2000	Praktikum in der Pathologie Bremerhaven

- Sprachkenntnisse: fließendes Englisch (B2-/ Unicert-Zertifikat)
- EDV- Kenntnisse: MS Windows/Office (Word, Excel, Power Point, Outlook, Endnote, Access, Adobe) Bildbearbeitungsprogramme (Adobe Illustrator, FreeHand, Canvas,Photoshop) Wissenschaftliche Software (Odyssey Application Software, Licor-Software, Bioedit, Filemaker, GKC)

6.14 LITERATURVERZEICHNIS

- Abramowi.N, Schechte.I und A. Berger (1967). *On Size of Active Site in Proteases .2. Carboxypeptidase-A*. Biochemical and biophysical research communications **29**(6): 862-&.
- Adamek, N., L. M. Coluccio und M. A. Geeves (2008). *Calcium sensitivity of the cross-bridge cycle of Myo1c, the adaptation motor in the inner ear*. Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5710-5715.
- Adams, R. J. und T. D. Pollard (1989). *Membrane-bound myosin-I provides new mechanisms in cell motility*. Cell Motil Cytoskeleton **14**(2): 178-182.
- Alberts, B. (2012). Molecular Biology of the Cell. Molecular Biology of the Cell. **6. Auflage**.
- Arjonen, A., R. Kaukonen und J. Ivaska (2011). *Filopodia and adhesion in cancer cell motility*. Cell Adh Migr **5**(5): 421-430.
- Barylko, B., M. C. Wagner, O. Reizes und J. P. Albanesi (1992). *Purification and characterization of a mammalian myosin I*. Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 490-494.
- Bement, W. M., T. Hasson, J. A. Wirth, R. E. Cheney und M. S. Mooseker (1994). *Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(14): 6549-6553.
- Benedikt, A., S. Baltruschat, B. Scholz, A. Bursen, T. N. Arrey, B. Meyer, L. Varagnolo, A. M. Muller, M. Karas, T. Dingermann und R. Marschalek (2011). *The leukemogenic AF4-MLL fusion protein causes P-TEFb kinase activation and altered epigenetic signatures*. Leukemia **25**(1): 135-144.
- Bier, C. (2010). *Molekularbiologische Charakterisierung der Funktion und Regulation der Protease Taspase1*, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Bier, C., R. Hecht, L. Kunst, S. Scheiding, D. Wunsch, D. Goesswein, G. Schneider, O. H. Kramer, S. K. Knauer und R. H. Stauber (2012). *Overexpression of the Catalytically Impaired Taspase1(T234V) or Taspase1(D233A) Variants Does Not Have a Dominant Negative Effect in T(4;11) Leukemia Cells*. Plos One **7**(5).
- Bier, C., S. K. Knauer, D. Docter, G. Schneider, O. H. Kramer und R. H. Stauber (2011). *The Importin-Alpha/Nucleophosmin Switch Controls Taspase1 Protease Function*. Traffic **12**(6): 703-714.
- Bier, C., S. K. Knauer, D. Wunsch, L. Kunst, S. Scheiding, M. Kaiser, C. Ottmann, O. H. Kramer und R. H. Stauber (2012). *Allosteric inhibition of Taspase1's pathobiological activity by enforced dimerization in vivo*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **26**(8): 3421-3429.
- Blais, A. und B. D. Dynlacht (2004). *Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control*. Current Opinion in Genetics & Development **14**(5): 527-532.
- Block, J., T. E. Stradal, J. Hanisch, R. Geffers, S. A. Kostler, E. Urban, J. V. Small, K. Rottner und J. Faix (2008). *Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3*. J Microsc **231**(3): 506-517.
- Brannigan, J. A., G. Dodson, H. J. Duggleby, P. C. E. Moody, J. L. Smith, D. R. Tomchick und A. G. Murzin (1995). *A Protein Catalytic Framework with an N-Terminal Nucleophile Is Capable of Self-Activation (Vol 378, Pg 416, 1995)*. Nature **378**(6557): 644-644.

- Bursen, A., S. Moritz, A. Gaussmann, T. Dingermann und R. Marschalek (2004). *Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology?* *Oncogene* **23**(37): 6237-6249.
- Bursen, A., K. Schwabe, B. Ruster, R. Henschler, M. Ruthardt, T. Dingermann und R. Marschalek (2010). *The AF4.MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL.AF4.* *Blood* **115**(17): 3570-3579.
- Cameron, R. S., C. Liu, A. S. Mixon, J. P. Pihkala, R. J. Rahn und P. L. Cameron (2007). *Myosin16b: The COOH-tail region directs localization to the nucleus and overexpression delays S-phase progression.* *Cell motility and the cytoskeleton* **64**(1): 19-48.
- Cameron, R. S., C. Liu und J. P. Pihkala (2013). *Myosin 16 levels fluctuate during the cell cycle and are downregulated in response to DNA replication stress.* *Cytoskeleton* **70**(6): 328-348.
- Carnero, A., C. Blanco-Aparicio, O. Renner, W. Link und J. F. Leal (2008). *The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications.* *Curr Cancer Drug Targets* **8**(3): 187-198.
- Chang, M. J., H. Wu, N. J. Achille, M. R. Reisenauer, C. W. Chou, N. J. Zeleznik-Le, C. S. Hemenway und W. Zhang (2010). *Histone H3 lysine 79 methyltransferase Dot1 is required for immortalization by MLL oncogenes.* *Cancer Research* **70**(24): 10234-10242.
- Chen, A. H., D. A. Stephan, T. Hasson, K. Fukushima, C. M. Nelissen, A. F. Chen, A. I. Jun, A. Ramesh, G. Van Camp und R. J. H. Smith (2001). *MYO1F as a candidate gene for nonsyndromic deafness, DFNB15.* *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* **127**(8): 921-925.
- Chen, C. L. und M. Iijima (2012). *Myosin I: A new pip(3) effector in chemotaxis and phagocytosis.* *Communicative & integrative biology* **5**(3): 294-296.
- Chen, D. Y., H. Liu, S. Takeda, H. C. Tu, S. Sasagawa, B. A. Van Tine, D. Lu, E. H. Cheng und J. J. Hsieh (2010). *Taspase1 functions as a non-oncogene addiction protease that coordinates cancer cell proliferation and apoptosis.* *Cancer Res* **70**(13): 5358-5367.
- Chen, D. Y., H. Liu, S. Takeda, H. C. Tu, S. Sasagawa, B. A. Van Tine, D. S. Lu, E. H. Y. Cheng und J. J. D. Hsieh (2010). *Taspase1 Functions as a Non-Oncogene Addiction Protease that Coordinates Cancer Cell Proliferation and Apoptosis.* *Cancer Research* **70**(13): 5358-5367.
- Christoph Wagener, O. M. (2009). *Molekulare Onkologie. 3. Auflage.*
- Clausen, T., M. Kaiser, R. Huber und M. Ehrmann (2011). *HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control.* *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**(3): 152-162.
- Critchley, D. R. (2000). *Focal adhesions - the cytoskeletal connection.* *Curr Opin Cell Biol* **12**(1): 133-139.
- Crozet, F., A. el Amraoui, S. Blanchard, M. Lenoir, C. Ripoll, P. Vago, C. Hamel, C. Fizames, F. Levi-Acobas, D. Depetris, M. G. Mattei, D. Weil, R. Pujol und C. Petit (1997). *Cloning of the genes encoding two murine and human cochlear unconventional type I myosins.* *Genomics* **40**(2): 332-341.
- Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo und C. M. Croce (1982). *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(24): 7824-7827.

- Duhoux, F. P., G. Ameye, J. M. Libouton, K. Bahloula, S. Iossifidis, C. F. Chantrain, J. B. Demoulin und H. A. Poirel (2011). *The t(11;19)(q23;p13) fusing MLL with MYO1F is recurrent in infant acute myeloid leukemias*. *Leukemia Research* **35**(9): E171-E172.
- Dunn, S. D. (1986). *Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies*. *Anal Biochem* **157**(1): 144-153.
- Feil, R., J. Wagner, D. Metzger und P. Chambon (1997). *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains*. *Biochem Biophys Res Commun* **237**(3): 752-757.
- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers und D. M. Parkin (2010). *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127**(12): 2893-2917.
- Foth, B. J., M. C. Goedecke und D. Soldati (2006). *New insights into myosin evolution and classification*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3681-3686.
- Franca-Koh, J., Y. Kamimura und P. N. Devreotes (2007). *Leading-edge research: PtdIns(3,4,5)P3 and directed migration*. *Nat Cell Biol* **9**(1): 15-17.
- Fresno Vara, J. A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta und M. Gonzalez-Baron (2004). *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. *Cancer Treat Rev* **30**(2): 193-204.
- Friedl, P. und D. Gilmour (2009). *Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(7): 445-457.
- Friedl, P. und K. Wolf (2003). *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. *Nat Rev Cancer* **3**(5): 362-374.
- Fukui, Y., T. J. Lynch, H. Brzeska und E. D. Korn (1989). *Myosin-I Is Located at the Leading Edges of Locomoting Dictyostelium Amebas*. *Nature* **341**(6240): 328-331.
- Futreal, P. A., L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman und M. R. Stratton (2004). *A census of human cancer genes*. *Nature reviews. Cancer* **4**(3): 177-183.
- Geeves, M. A. und K. C. Holmes (2005). *The molecular mechanism of muscle contraction*. *Adv Protein Chem* **71**: 161-193.
- Giancotti, F. G. und E. Ruoslahti (1999). *Integrin signaling*. *Science* **285**(5430): 1028-1032.
- Gillespie, P. G., J. P. Albanesi, M. Bahler, W. M. Bement, J. S. Berg, D. R. Burgess, B. Burnside, R. E. Cheney, D. P. Corey, E. Coudrier, P. de Lanerolle, J. A. Hammer, T. Hasson, J. R. Holt, A. J. Hudspeth, M. Ikebe, J. Kendrick-Jones, E. D. Korn, R. Li, J. A. Mercer, R. A. Milligan, M. S. Mooseker, E. M. Ostap, C. Petit, T. D. Pollard, J. R. Sellers, T. Soldati und M. A. Titus (2001). *Myosin-I nomenclature*. *J Cell Biol* **155**(5): 703-704.
- Grimwade, D., H. Walker, F. Oliver, K. Wheatley, C. Harrison, G. Harrison, J. Rees, I. Hann, R. Stevens, A. Burnett und A. Goldstone (1998). *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. *Blood* **92**(7): 2322-2333.
- Grisendi, S., C. Mecucci, B. Falini und P. P. Pandolfi (2006). *Nucleophosmin and cancer*. *Nature reviews. Cancer* **6**(7): 493-505.

- Guenther, M. G., R. G. Jenner, B. Chevalier, T. Nakamura, C. M. Croce, E. Canaani und R. A. Young (2005). *Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8603-8608.
- Guillou, H., A. Depraz-Depland, E. Planus, B. Vianay, J. Chaussy, A. Grichine, C. Albiges-Rizo und M. R. Block (2008). *Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling*. Exp Cell Res **314**(3): 478-488.
- Gupta, P., N. C. Gauthier, Y. Cheng-Han, Y. Zuanning, B. Pontes, M. Ohmstede, R. Martin, H. J. Knolker, H. G. Dobereiner, M. Krendel und M. Sheetz (2013). *Myosin 1E localizes to actin polymerization sites in lamellipodia, affecting actin dynamics and adhesion formation*. Biol Open **2**(12): 1288-1299.
- Häcker, U. (2005). *Regulation des Zytoskeletts während der frühen Drosophila-Entwicklung*. BIoSpektrum **5/05**.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell **144**(5): 646-674.
- Hanisch, J., R. Kolm, M. Wozniczka, D. Bumann, K. Rottner und T. E. Stradal (2011). *Activation of a RhoA/myosin II-dependent but Arp2/3 complex-independent pathway facilitates Salmonella invasion*. Cell Host Microbe **9**(4): 273-285.
- Hasson, T. und R. E. Cheney (2001). *Mechanisms of motor protein reversal*. Curr Opin Cell Biol **13**(1): 29-35.
- Hsieh, J. J., E. H. Cheng und S. J. Korsmeyer (2003). *Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression*. Cell **115**(3): 293-303.
- Hsieh, J. J. D., P. Ernst, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst und S. Korsmeyer (2002). *Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization*. Blood **100**(11): 137a-137a.
- Hsieh, J. J. D., P. Ernst, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst und S. J. Korsmeyer (2003). *Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization*. Molecular and Cellular Biology **23**(1): 186-194.
- Huret, J. L., P. Dessen und A. Bernheim (2001). *An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners*. Leukemia **15**(6): 987-989.
- Hynes, R. O. (2002). *A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis*. Nat Med **8**(9): 918-921.
- Keselowsky, B. G., D. M. Collard und A. J. Garcia (2003). *Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion*. J Biomed Mater Res A **66**(2): 247-259.
- Khan, J. A., B. M. Dunn und L. Tong (2005). *Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL*. Structure **13**(10): 1443-1452.
- Khan, J. A., B. M. Dunn und L. Tong (2005). *Crystal structure of human Taspase1, a crucial protease regulating the function of MLL*. Structure **13**(10): 1443-1452.
- Kim, S. V. und R. A. Flavell (2008). *Myosin I: from yeast to human*. Cell Mol Life Sci **65**(14): 2128-2137.

- Kim, S. V., W. Z. Mehal, X. Dong, V. Heinrich, M. Pypaert, I. Mellman, M. Dembo, M. S. Mooseker, D. Wu und R. A. Flavell (2006). *Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f*. *Science* **314**(5796): 136-139.
- Kim, S. V., W. Z. Mehal, X. M. Dong, V. Heinrich, M. Pypaert, I. Mellman, M. Dembo, M. S. Mooseker, D. Q. Wu und R. A. Flavell (2006). *Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f*. *Science* **314**(5796): 136-139.
- Knauer, S. K., V. Fetz, J. Rabenstein, S. Friedl, B. Hofmann, S. Sabiani, E. Schroder, L. Kunst, E. Proschak, E. Thines, T. Kindler, G. Schneider, R. Marschalek, R. H. Stauber und C. Bier (2011). *Bioassays to Monitor Taspase1 Function for the Identification of Pharmacogenetic Inhibitors*. *Plos One* **6**(5).
- Krendel, M. und M. S. Mooseker (2005). *Myosins: tails (and heads) of functional diversity*. *Physiology (Bethesda)* **20**: 239-251.
- Laemmli, U. K., E. Molbert, M. Showe und E. Kellenberger (1970). *Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4*. *J Mol Biol* **49**(1): 99-113.
- Latchman, D., Ed. (2005). *Gene Regulation*.
- Lee, J. W. und R. Juliano (2004). *Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways*. *Mol Cells* **17**(2): 188-202.
- Lloyd, M. D. (1996). *Fast staining and destaining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels*. *Anal Biochem* **241**(1): 139-140.
- Lopez-Otin, C. und J. S. Bond (2008). *Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease*. *Journal of Biological Chemistry* **283**(45): 30433-30437.
- Lopez-Otin, C. und L. M. Matrisian (2007). *Tumour micro environment - Opinion - Emerging roles of proteases in tumour suppression*. *Nature Reviews Cancer* **7**(10): 800-808.
- Lopez-Otin, C. und C. M. Overall (2002). *Protease degradomics: a new challenge for proteomics*. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**(7): 509-519.
- Luster, A. D., R. Alon und U. H. von Andrian (2005). *Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets*. *Nature Immunology* **6**(12): 1182-1190.
- Machesky, L. M. (2008). *Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion*. *FEBS Lett* **582**(14): 2102-2111.
- Machesky, L. M. und A. Li (2010). *Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis*. *Commun Integr Biol* **3**(3): 263-270.
- Madri, J. A. und D. Graesser (2000). *Cell migration in the immune system: the evolving inter-related roles of adhesion molecules and proteinases*. *Dev Immunol* **7**(2-4): 103-116.
- Maira, S. M., F. Stauffer, C. Schnell und C. Garcia-Echeverria (2009). *PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand?* *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 265-272.
- Mantovani, A. und M. A. Pierotti (2008). *Cancer and inflammation: a complex relationship*. *Cancer letters* **267**(2): 180-181.
- Maravillas-Montero, J. L. und L. Santos-Argumedo (2012). *The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells*. *J Leukoc Biol* **91**(1): 35-46.
- Mattila, P. K. und P. Lappalainen (2008). *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(6): 446-454.
- Metzger, D. und P. Chambon (2001). *Site- and time-specific gene targeting in the mouse*. *Methods* **24**(1): 71-80.

- Meyer, C., B. Schneider, M. Reichel, S. Angermueller, S. Strehl, S. Schnittger, C. Schoch, M. W. Jansen, J. J. van Dongen, R. Pieters, O. A. Haas, T. Dingermann, T. Klingebiel und R. Marschalek (2005). *Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(2): 449-454.
- Mitchison, T. J. und L. P. Cramer (1996). *Actin-based cell motility and cell locomotion*. Cell **84**(3): 371-379.
- Nakamura, T., T. Mori, S. Tada, W. Krajewski, T. Rozovskaia, R. Wassell, G. Dubois, A. Mazo, C. M. Croce und E. Canaani (2002). *ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation*. Molecular Cell **10**(5): 1119-1128.
- Nishioka, M., T. Kohno, M. Tani, N. Yanaihara, Y. Tomizawa, A. Otsuka, S. Sasaki, K. Kobayashi, T. Niki, A. Maeshima, Y. Sekido, J. D. Minna, S. Sone und J. Yokota (2002). *MYO18B, a candidate tumor suppressor gene at chromosome 22q12.1, deleted, mutated, and methylated in human lung cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(19): 12269-12274.
- Nowak, G., L. Pestic-Dragovich, P. Hozak, A. Philimonenko, C. Simerly, G. Schatten und P. de Lanerolle (1997). *Evidence for the presence of myosin I in the nucleus*. The Journal of biological chemistry **272**(27): 17176-17181.
- Odrionitz, F. und M. Kollmar (2007). *Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species*. Genome Biol **8**(9): R196.
- Oinonen, C. und J. Rouvinen (2000). *Structural comparison of Ntn-hydrolases*. Protein Science **9**(12): 2329-2337.
- Overall, C. M. und C. Lopez-Otin (2002). *Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era*. Nature reviews. Cancer **2**(9): 657-672.
- Pedersen-Bjergaard, J. und J. D. Rowley (1994). *The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation*. Blood **83**(10): 2780-2786.
- Pestic-Dragovich, L., L. Stojiljkovic, A. A. Philimonenko, G. Nowak, Y. Ke, R. E. Settlage, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, P. Hozak und P. de Lanerolle (2000). *A myosin I isoform in the nucleus*. Science **290**(5490): 337-341.
- Pless, B., C. Oehm, S. Knauer, R. H. Stauber, T. Dingermann und R. Marschalek (2011). *The heterodimerization domains of MLL-FYRN and FYRC--are potential target structures in t(4;11) leukemia*. Leukemia **25**(4): 663-670.
- Puente, X. S., L. M. Sanchez, C. M. Overall und C. Lopez-Otin (2003). *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. Nature reviews. Genetics **4**(7): 544-558.
- Rabbitts, T. H. (1999). *Perspective: Chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation - Why are these functions targeted?* Journal of Pathology **187**(1): 39-42.
- Rabenstein, J. (2008). *Inhibierung des pathomolekularen Mechanismus einer t(4;11)-assoziierten Leukämie*, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Raffini, L. J., D. J. Slater, E. F. Rappaport, L. Lo Nigro, N. K. Cheung, J. A. Biegel, P. C. Nowell, B. J. Lange und C. A. Felix (2002). *Panhandle and reverse-panhandle PCR*

- enable cloning of der(11) and der(other) genomic breakpoint junctions of MLL translocations and identify complex translocation of MLL, AF-4, and CDK6.* Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4568-4573.
- Reichel, M., E. Gillert, S. Angermuller, J. P. Hensel, F. Heidel, M. Lode, T. Leis, A. Biondi, O. A. Haas, S. Strehl, E. R. Panzer-Grumayer, F. Griesinger, J. D. Beck, J. Greil, G. H. Fey, F. M. Uckun und R. Marschalek (2001). *Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL.* Oncogene **20**(23): 2900-2907.
- Richards, T. A. und T. Cavalier-Smith (2005). *Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes.* Nature **436**(7054): 1113-1118.
- Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger und A. D. Bershadsky (2001). *Focal contacts as mechanosensors: Externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism.* Journal of Cell Biology **153**(6): 1175-1185.
- Riveline, D., E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger und A. D. Bershadsky (2001). *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism.* J Cell Biol **153**(6): 1175-1186.
- Rosorius, O., P. Heger, G. Stelz, N. Hirschmann, J. Hauber und R. H. Stauber (1999). *Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells.* Biotechniques **27**(2): 350-355.
- Rottner, K. und T. E. Stradal (2011). *Actin dynamics and turnover in cell motility.* Curr Opin Cell Biol **23**(5): 569-578.
- Sanchez-Garcia, I. und T. H. Rabbitts (1993). *LIM domain proteins in leukaemia and development.* Seminars in Cancer Biology **4**(6): 349-358.
- Sanchez-Margalet, V., I. D. Goldfine, C. J. Vlahos und C. K. Sung (1994). *Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002.* Biochem Biophys Res Commun **204**(2): 446-452.
- Sasaki, A. T., C. Chun, K. Takeda und R. A. Firtel (2004). *Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement.* J Cell Biol **167**(3): 505-518.
- Schafer, C., B. Borm, S. Born, C. Mohl, E. M. Eibl und B. Hoffmann (2009). *One step ahead: Role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes.* Experimental Cell Research **315**(7): 1212-1224.
- Schildkraut, C. (1965). *Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration.* Biopolymers **3**(2): 195-208.
- Schmitz, S. (2009). *Zellkultur. 2. Auflage.*
- Shein, H. M. und J. F. Enders (1962). *Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics.* Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1164-1172.
- Steketee, M., K. Balazovich und K. W. Tosney (2001). *Filopodial initiation and a novel filament-organizing center, the focal ring.* Mol Biol Cell **12**(8): 2378-2395.
- Stradal, T. E. und G. Scita (2006). *Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly.* Curr Opin Cell Biol **18**(1): 4-10.
- Stryer, L. (2013). Replikation und Expression der Gene. **Biochemie. 7. Auflage:** S. 825 ff.

- Sweeney, H. L. und A. Houdusse (2010). *Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism*. Annual Review of Biophysics, Vol 39 **39**: 539-557.
- Takeda, S., D. Y. Chen, T. D. Westergard, J. K. Fisher, J. A. Rubens, S. Sasagawa, J. T. Kan, S. J. Korsmeyer, E. H. Y. Cheng und J. J. D. Hsieh (2006). *Proteolysis of MLL family proteins is essential for Taspase1-orchestrated cell cycle progression*. Genes & Development **20**(17): 2397-2409.
- Taki, T., M. Akiyama, S. Saito, R. Ono, M. Taniwaki, Y. Kato, Y. Yuza, Y. Eto und Y. Hayashi (2005). *The MYO1F, unconventional myosin type 1F, gene is fused to MLL in infant acute monocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 7, 11, 19 and 22*. Oncogene **24**(33): 5191-5197.
- Taki, T., M. Akiyama, S. Saito, R. Ono, M. Taniwaki, Y. Kato, Y. Yuza, Y. Eto und Y. Hayashi (2005). *The MYO1F, unconventional myosin type 1F, gene is fused to MLL in infant acute monocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 7, 11, 19 and 22*. Oncogene **24**(33): 5191-5197.
- Taub, R., I. Kirsch, C. Morton, G. Lenoir, D. Swan, S. Tronick, S. Aaronson und P. Leder (1982). *Translocation of the C-Myc Gene into the Immunoglobulin Heavy-Chain Locus in Human Burkitt-Lymphoma and Murine Plasmacytoma Cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences **79**(24): 7837-7841.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Turk, B. (2006). *Targeting proteases: successes, failures and future prospects*. Nature Reviews Drug Discovery **5**(9): 785-799.
- Turner, C. E., J. R. Glenney, Jr. und K. Burridge (1990). *Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions*. J Cell Biol **111**(3): 1059-1068.
- Vale, R. D. (2003). *Myosin V motor proteins: marching stepwise towards a mechanism*. J Cell Biol **163**(3): 445-450.
- Verkhovskiy, A. B., T. M. Svitkina und G. G. Borisy (1999). *Network contraction model for cell translocation and retrograde flow*. Biochem Soc Symp **65**: 207-222.
- Verkhovskiy, A. B., T. M. Svitkina und G. G. Borisy (1999). *Self-polarization and directional motility of cytoplasm*. Curr Biol **9**(1): 11-20.
- Vogelstein, B. und K. W. Kinzler (2004). *Cancer genes and the pathways they control*. Nature Medicine **10**(8): 789-799.
- Vuori, K. und E. Ruoslahti (1999). *Connections count in cell migration*. Nat Cell Biol **1**(4): E85-87.
- Wagner, M. C., B. Barylko und J. P. Albanesi (1992). *Tissue distribution and subcellular localization of mammalian myosin I*. J Cell Biol **119**(1): 163-170.
- Wang, Y., E. L. Botvinick, Y. Zhao, M. W. Berns, S. Usami, R. Y. Tsien und S. Chien (2005). *Visualizing the mechanical activation of Src*. Nature **434**(7036): 1040-1045.
- Wolf, K., R. Muller, S. Borgmann, E. B. Brocker und P. Friedl (2003). *Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases*. Blood **102**(9): 3262-3269.
- Yokoyama, A., I. Kitabayashi, P. M. Ayton, M. L. Cleary und M. Ohki (2002). *Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into two fragments with opposite transcriptional properties*. Blood **100**(11): 137a-137a.

-
- Yumura, S. und T. Q. Uyeda (2003). *Myosins and cell dynamics in cellular slime molds*. Int Rev Cytol **224**: 173-225.
- Zadro, C., M. S. Alemanno, E. Bellacchio, R. Ficarella, F. Donaudy, S. Melchionda, L. Zelante, R. Rabionet, N. Hilgert, X. Estivill, G. Van Camp, P. Gasparini und M. Carella (2009). *Are MYO1C and MYO1F associated with hearing loss?* Biochim Biophys Acta **1792**(1): 27-32.
- Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi und B. Geiger (2004). *Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes*. Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 416-420.
- Zamir, E. und B. Geiger (2001). *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. Journal of Cell Science **114**(20): 3583-3590.
- Zamir, E. und B. Geiger (2001). *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci **114**(Pt 20): 3583-3590.
- Zhang, H., J. S. Berg, Z. Li, Y. Wang, P. Lang, A. D. Sousa, A. Bhaskar, R. E. Cheney und S. Stromblad (2004). *Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton*. Nature Cell Biology **6**(6): 523-531.
- Zhang, H. Q., J. S. Berg, Z. L. Li, Y. L. Wang, P. Lang, A. D. Sousa, A. Bhaskar, R. E. Cheney und S. Stromblad (2004). *Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton*. Nature Cell Biology **6**(6): 523-531.
- Zhou, H., S. Spicuglia, J. J. Hsieh, D. J. Mitsiou, T. Hoiby, G. J. Veenstra, S. J. Korsmeyer und H. G. Stunnenberg (2006). *Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription*. Mol Cell Biol **26**(7): 2728-2735.
- Zur Hausen, H. (1967). *Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells*. J Virol **1**(6): 1174-1185.