

**Funktionale Charakterisierung der
Glycerophosphodiesterase EDI3 sowie
Untersuchung ihrer Metastasen-fördernden
Eigenschaften in humanen Tumorzelllinien**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät für Chemie und
Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Michaela Silvia Lesjak

aus Mülheim an der Ruhr

Dortmund, März 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Jan G. Hengstler
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank Wehner

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Enzymfamilie der Glycerophosphodiesterasen	2
1.1.1 GDE1	3
1.1.2 GDE2 (GDPD5)	3
1.1.3 GDE3	4
1.1.4 EDI3 (GDE5)	5
1.2 Cholin-Metabolismus	6
1.2.1 Cholin-Metabolite als Biomarker bei Tumorerkrankungen	7
1.2.2 Enzyme des Cholin-Metabolismus als therapeutische Ziele	8
1.3 Metastasierung von Tumorzellen	9
1.3.1 Zelladhäsion	10
1.3.1.1 Integrine als bidirektionale Signalmoleküle	10
1.3.1.2 Fokale Adhäsionen	12
1.3.2 <i>Spreading</i>	13
1.3.2.1 Ausbildung organisierter Membranstrukturen	13
1.3.2.2 Ausbildung von Stressfasern	14
1.3.2.3 Rho-GTPasen als zentrale Regulatoren	15
1.3.3 Migration	16
1.3.3.1 Regulation der Aktinreorganisation	16
1.3.3.2 Arten der zellulären Migration	17
1.3.3.3 Die Rolle von PKC bei der zellulären Migration	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Puffer und Lösungen	23
2.1.4.1 Kommerzielle Puffer und Lösungen	23
2.1.4.2 Hergestellte Puffer und Lösungen	24
2.1.5 Zelllinien	25

2.1.6 Medien _____	26
2.1.7 Kommerzielle Kits _____	27
2.1.8 Antikörper _____	27
2.1.8.1 Primärantikörper _____	27
2.1.8.2 Sekundärantikörper _____	28
2.1.9 Fluoreszenzfarbstoffe _____	28
2.1.10 Größenstandards für SDS-PAGE/Immunoblots _____	28
2.2 Methoden _____	29
2.2.1 Zellkultur _____	29
2.2.2 RNA-Analyse _____	29
2.2.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA _____	29
2.2.2.2 RNA-Quantifizierung _____	30
2.2.2.3 Reverse Transkription _____	30
2.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR _____	30
2.2.3 Proteinanalyse _____	31
2.2.3.1 Proteinextraktion _____	31
2.2.3.1.1 Herstellung von Gesamt-Zelllysaten _____	31
2.2.3.1.2 Herstellung subfraktionierter Zelllysate _____	31
2.2.3.2 Proteinquantifizierung _____	32
2.2.3.3 Aufkonzentrierung von Proteinproben _____	32
2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese _____	33
2.2.3.4.1 Vorbereitung der Gele _____	33
2.2.3.4.2 Elektrophorese _____	34
2.2.3.5 Immunoblot _____	34
2.2.3.5.1 Membrantransfer _____	34
2.2.3.5.2 Antikörperinkubation _____	35
2.2.3.6 EDI3-Aktivitätsassay _____	36
2.2.4 RNA-Interferenz zur transienten Reduktion der Genexpression	37
2.2.5 Migrations-Assays _____	38
2.2.5.1 <i>Scratch</i> -Assay _____	38
2.2.5.2 Migrations-Assay in einer modifizierten Boyden- Kammer _____	38
2.2.6 Replattierungs-Experimente _____	39
2.2.6.1 Adhäsions-Assay _____	39

2.2.6.2 <i>Spreading</i> -Assay _____	40
2.2.6.3 Phalloidinfärbung _____	40
2.2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung _____	41
2.2.6.5 GTPase-Aktivitätsassay _____	41
2.2.7 NMR-Messungen _____	43
2.2.7.1 Untersuchung der GPC-Hydrolyse mittels ^{31}P -NMR __	43
2.2.7.2 Bestimmung intrazellulärer Cholin-Metabolit- Konzentrationen _____	43
2.2.7.2.1 Konzentrationsbestimmung von GPC und PC mittels ^1H -NMR _____	43
2.2.7.2.2 Bestimmung intrazellulärer Cholin-Metabolite Mittels ^1H -NMR/ ^{31}P -NMR _____	44
2.2.8 Statistische Datenanalyse _____	44
3. Ergebnisse _____	45
3.1 EDI3 ist eine GPC-hydrolysierende Glycerophosphodiesterase _____	45
3.1.1 Nachweis der EDI3-vermittelten G3P-Produktion durch ^{31}P -NMR _____	45
3.1.2 Nachweis der Cholin-Produktion im Rahmen der EDI3- vermittelten GPC-Hydrolyse mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten spektrophotometrischen Assays _____	47
3.2 Modulation der EDI3-Expression in Tumorzellen _____	49
3.2.1 Transiente Reduktion der EDI3-Expression mittels RNA- Interferenz _____	49
3.2.2 Stabile Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen _____	53
3.2.3 Die Modulation von EDI3 hat keinen Einfluss auf die GDE2- Expression _____	54
3.3 EDI3 beeinflusst das intrazelluläre GPC/PC-Verhältnis in Tumorzellen _	55
3.3.1 Der Knockdown von EDI3 führt zu einem erhöhten GPC/PC- Verhältnis _____	55
3.3.2 EDI3 beeinflusst <i>in vivo</i> in erster Linie die Konzentration von GPC _____	57
3.4 EDI3 beeinflusst die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen _____	59

3.4.1 Der Knockdown von EDI3 verschlechtert die PKC α -abhängige Migration von MCF7-Zellen _____	59
3.4.2 Die Überexpression von EDI3 verbessert die PKC α -abhängige Migration von MCF7-Zellen _____	63
3.4.3 Der Einfluss von EDI3 auf die PKC α -vermittelte Migration ist abhängig vom untersuchten Zelltyp _____	66
3.5 EDI3 beeinflusst die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen _____	69
3.5.1 Etablierung eines Standardverfahrens zur Analyse der Zelladhäsion _____	69
3.5.2 Eine Reduktion der EDI3-Expression verlangsamt die Zelladhäsion _____	73
3.5.3 Die Überexpression von EDI3 beschleunigt die Zelladhäsion __	75
3.5.4 Eine Modulation der EDI3-Expression führt zu Veränderungen der Integrin-Expression _____	76
3.6 EDI3 beeinflusst das Ausbreitungsverhalten von Tumorzellen auf FN __	79
3.6.1 EDI3 beeinflusst die <i>Spreading</i> -Geschwindigkeit von Tumorzellen _____	79
3.6.2 Der Knockdown von EDI3 beeinträchtigt das <i>Spreading</i> von Tumorzellen _____	83
3.6.3 Die Überexpression von EDI3 verbessert das <i>Spreading</i> von Tumorzellen _____	90
3.6.4 EDI3 hat keinen Einfluss auf die Aktivität von Rac1 oder RhoA	92
3.6.5 EDI3 beeinflusst die Ausbildung Fokaler Adhäsionen unabhängig von der FAK-Src-Kaskade _____	95
4. Diskussion _____	100
4.1 EDI3 als wichtiges Enzym des zellulären Cholin-Metabolismus _____	100
4.2 EDI3 als positiver Regulator der Metastasierung von Tumorzellen _____	102
4.2.1 EDI3 spielt eine Rolle bei der PKC α -vermittelten Migration ____	102
4.2.2 EDI3 ist von Bedeutung für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion	105
4.2.3 EDI3 hat Einfluss auf das <i>Spreading</i> von Tumorzellen _____	107
4.3 Ausblick _____	111

5. Zusammenfassung	114
6. <i>Abstract</i>	116
7. Literaturverzeichnis	117
8. Anhang	139
8.1 Abkürzungsverzeichnis	139
8.2 Abbildungsverzeichnis	141
8.3 Lebenslauf	144
8.4 Danksagung	147
9. Erklärung	148

1. Einleitung

Krebserkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Die Karzinogenese (Tumorentwicklung) ist ein mehrstufiger Prozess; die einzelnen Schritte entsprechen genetischen Veränderungen, welche die progressive Transformation von normalen Zellen zu malignen (bösartigen) Krebszellen verursachen. Verschiedene Krebstypen teilen sich dabei eine überschaubare Anzahl gemeinsamer molekularer, biochemischer und zellulärer Eigenschaften, so dass die vielfältigen genotypischen Veränderungen auf wenige essentielle Fähigkeiten, die von Tumorzellen erworben werden müssen, reduziert werden können (Abb. 1.1). Maligne Transformation ist gekennzeichnet durch die Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, die Insensitivität gegenüber Wachstumssuppressoren, die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose), ein unbegrenztes Potential zur Replikation, die Bildung neuer Gefäße (Angiogenese) und die Aktivierung von Invasion und Metastasierung [Hanahan & Weinberg, 2000].

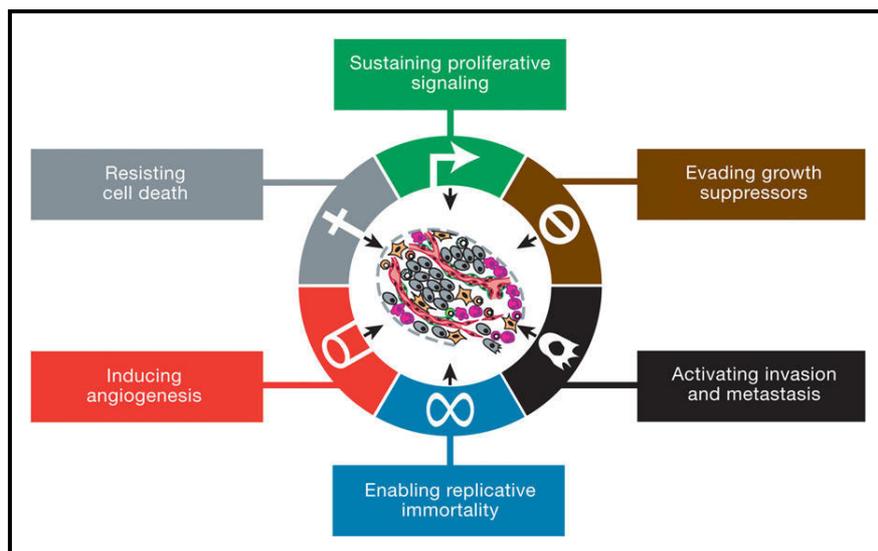


Abbildung 1.1: Typische Fähigkeiten von Tumorzellen [Hanahan & Weinberg, 2011].

In den letzten Jahren wurde diese Liste typischer Eigenschaften um die Umprogrammierung des zellulären Energiestoffwechsels und das Ausweichen der Zerstörung durch Immunzellen erweitert [Hanahan & Weinberg, 2011]. Dies verdeutlicht, dass noch längst nicht alle Merkmale restlos aufgeklärt worden sind, sondern ständig neue Faktoren entdeckt werden, die im Rahmen der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen können.

1.1 Die Enzymfamilie der Glycerophosphodiesterasen

Glycerophosphodiesterasen (GDEs) wurden ursprünglich in Prokaryoten als periplasmatische oder zytosolische Proteine charakterisiert, die deacylierte Phospholipide hydrolysieren und dadurch Glycerin-3-phosphat und die entsprechenden Alkohole produzieren [Larson *et al.*, 1983]. Glycerin-3-phosphat ist eine wichtige Kohlenstoff- und Phosphatquelle und die gebildeten Alkohole wie z. B. Cholin dienen in Bakterien als essentielle Wachstumsfaktoren [Tommassen *et al.*, 1991]. Deshalb steht die physiologische Funktion dieser Enzyme in Verbindung mit der Energieproduktion und -umwandlung.

In Säugetieren wurden bisher mit Hilfe bioinformatischer Methoden sieben GDEs identifiziert (Abb. 1.2), die alle eine konservierte Region von 56 Aminosäureresten, designiert als die katalytische GDE-Domäne, gemeinsam haben [Yanaka, 2007 a].

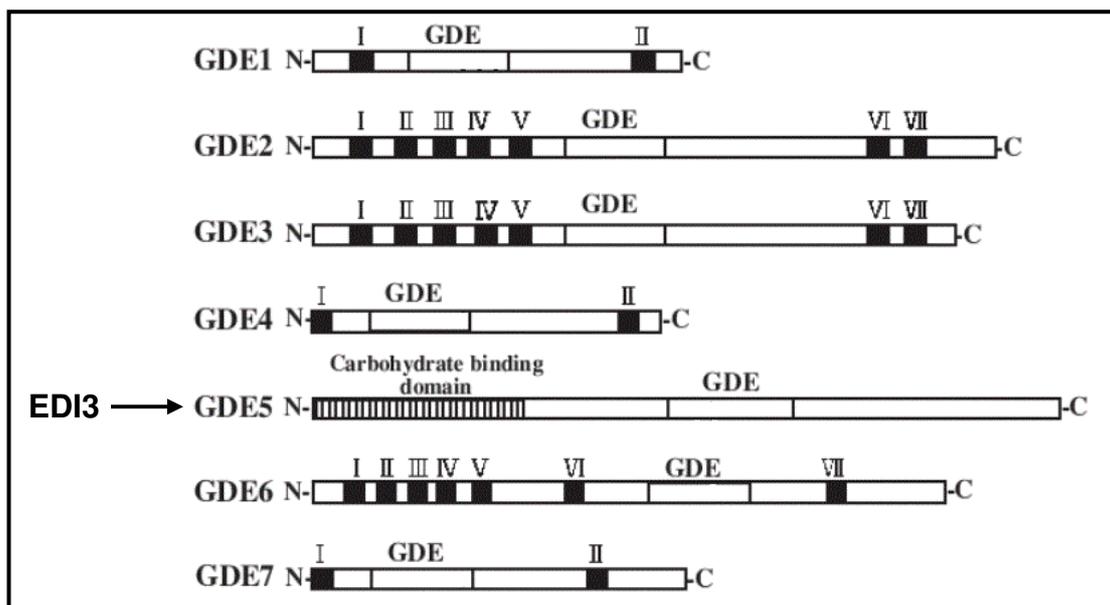


Abbildung 1.2: Domänenstruktur der GDE-Familie [Yanaka, 2007 a]. Putative Transmembran-Domänen werden vom N-Terminus ausgehend durchnummeriert; GDE bezeichnet die katalytische Domäne.

Die Diversität innerhalb dieser Enzymfamilie legt nahe, dass sich die verschiedenen GDEs in ihrer subzellulären Lokalisation sowie ihrer Substratspezifität voneinander unterscheiden und somit unterschiedlichste zelluläre Prozesse regulieren können. EDI3 (GDE5) nimmt innerhalb der GDE-Familie aufgrund seiner abweichenden Domänenstruktur eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zu den anderen GDEs besitzt EDI3 keine Transmembran-Domänen, dafür aber eine für diese Enzymfamilie einzigartige N-terminale Kohlenhydrat-Bindedomäne [Yanaka, 2007 a]. Diese

strukturellen Besonderheiten führen zu der Annahme, dass EDI3 als einziges zytosolisches Mitglied der GDE-Familie insbesondere an der Regulation intrazellulärer Prozesse beteiligt sein könnte. Von den sieben identifizierten GDEs in Säugern wurden bisher nur GDE1, GDE2 und GDE3 näher charakterisiert.

1.1.1 GDE1

GDE1 wurde ursprünglich im Rahmen eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screenings als Interaktionspartner von RGS16 identifiziert [Zheng *et al.*, 2000], einem Regulator der G-Protein-vermittelten Signalgebung, der eine GTPase-aktivierende Wirkung auf die G_α-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine ausübt [De Vries & Farquhar, 1999]. Es handelt sich hierbei um ein integrales Membranprotein, das präferenziell Glycerophosphoinositol hydrolysiert und dessen katalytische Domäne extrazellulär liegt [Zheng *et al.*, 2003]. Die Enzymaktivität von GDE1 kann durch Signale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) beeinflusst werden. So führen Agonisten β -adrenerger Rezeptoren zu erhöhter GDE1-Aktivität, während Agonisten α -adrenerger Rezeptoren die GDE1-Aktivität senken [Zheng *et al.*, 2003]. Untersuchungen der Gehirn-Metabolite von GDE1-Knockout-Mäusen konnten zeigen, dass neben Glycerophosphoinositol auch Glycerophosphoserin akkumuliert und somit als direktes Substrat für GDE1 dient, während Glycerophosphocholin und Glycerophosphoethanolamin nicht durch GDE1 hydrolysiert werden [Kopp *et al.*, 2010].

1.1.2 GDE2 (GDPD5)

GDE2 ist das bisher am intensivsten untersuchte Mitglied der GDE-Familie. Dabei handelt es sich um ein Transmembran-Protein, dessen katalytische GDE-Domäne extrazellulär lokalisiert ist [Rao & Sockanathan, 2005]. *In vivo* induziert GDE2 die Differenzierung von Motorneuronen durch eine Inhibierung von Notch-Signalen [Sabharwal *et al.*, 2011]. Die Überexpression von GDE2 in Neuroblastom-Zellen führt zu vermehrter Ausbildung von Neuriten, während eine transiente Reduktion der GDE2-Expression das Neuritwachstum inhibiert [Yanaka *et al.*, 2007 b]. Anhand von GDE2-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym den zeitlichen Ablauf der Neurogenese beeinflussen kann. Ohne GDE2 kommt es zu verstärkter Notch-Signalaktivität, so dass die Cortex-Vorläuferzellen den Austritt aus dem Zellzyklus verfehlen und weiterhin proliferieren statt in postmitotische Neurone auszudifferenzieren [Rodriguez *et al.*, 2012]. Normalerweise kann GDE2 dagegen

durch das Abspalten des Glykosylphosphatidylankers von RECK (Reversion-induzierendes cysteinreiches Protein mit Kazal-Motiv), einem Notch-Aktivator, das Abschalten von Notch-Signalen induzieren und somit die Neurogenese initiieren [Park *et al.*, 2013]. Die katalytische Aktivität von GDE2 gegenüber Glycerophosphocholin wird durch hohe Konzentrationen an NaCl oder Harnstoff inhibiert [Gallazzini *et al.*, 2008], so dass es zu einer Akkumulation dieses organischen Osmolyten kommt. Grund hierfür sind inhibitorische posttranslationale Modifikationen an GDE2; die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen Cys25 und Cys571 sowie die Dephosphorylierung von Thr587 [Topanurak *et al.*, 2013].

Neuere Untersuchungen konnten erstmals einen Zusammenhang zwischen der Expression von GDE2 und der malignen Progression von Brustkrebs aufzeigen. Verglichen mit Östrogenrezeptor-positiven (ER⁺), schwach metastasierenden MCF7-Brustkrebszellen ist die GDE2-Expression in den aggressiveren Östrogenrezeptor-negativen (ER⁻) MDAMB231-Zellen deutlich erhöht; dieselbe Korrelation zwischen GDE2-Expression und Östrogenrezeptor-Status kann auch in humanen Tumorproben von Mammakarzinomen bestätigt werden [Cao *et al.*, 2012].

1.1.3 GDE3

GDE3 beschleunigt die Differenzierung von Osteoblasten und wird insbesondere in der Phase der Matrixreifung verstärkt exprimiert. Dieses Enzym akkumuliert in der Zellperipherie und kann die Zellmorphologie beeinflussen. Transfizierte Zellen, die GDE3 überexprimieren, verändern ihre Morphologie von einer ausgebreiteten zu einer rundlicheren Form, was mit dem Verlust ausgeprägter Aktinstrukturen einhergeht [Yanaka *et al.*, 2003]. Wie GDE1 hydrolysiert auch GDE3 bevorzugt Glycerophosphoinositole, allerdings unter Bildung anderer Reaktionsprodukte. GDE3 spaltet Glycerophosphoinositol zu Glycerin und Inositol-1-phosphat und zeigt somit eine Phospholipase C-ähnliche Aktivität [Corda *et al.*, 2009 a], während GDE1 ähnlich zu Phospholipase D die Produkte Glycerin-3-phosphat und Inositol generiert (Abb. 1.3).

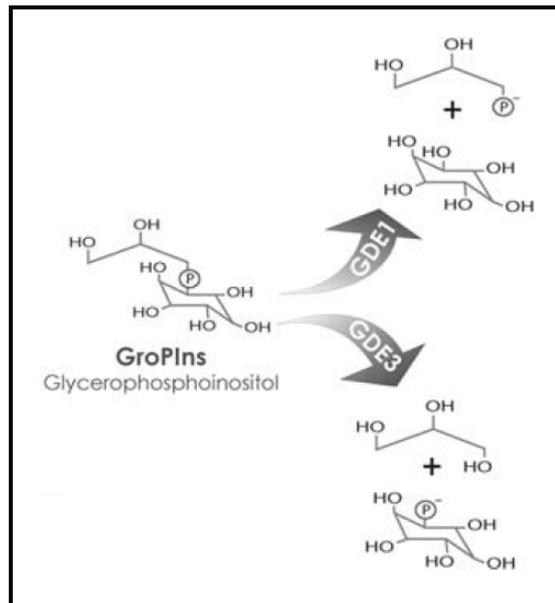


Abbildung 1.3: Abbau von Glycerophosphoinositol durch GDE1 und GDE3 [Corda *et al.*, 2009 b].

1.1.4 EDI3 (GDE5)

Zu Beginn dieses Projektes war abgesehen von der Existenz einer zytosolischen Glycerophosphodiesterase [Yanaka, 2007 a] nichts über das später von uns als EDI3 (GDE5, GPCPD1, GDPD6) benannte Enzym bekannt. EDI3 steht für Endometriumkarzinom Differenziell-3 und wurde ursprünglich im Rahmen einer *Differential-Display-Analyse* identifiziert. Auf der Suche nach potenziellen prognostischen Markern wurde das Genexpressionsprofil von nicht-metastasierenden und metastasierenden Endometriumkarzinomen (Gebärmutterkörperkrebs) verglichen [Stauder, 2008]. Hierzu wurden zunächst drei Paare von Primärtumoren ausgewählt, die zwar in ihren histopathologischen Eigenschaften identisch waren und aufgrund dieser Kriterien eigentlich eine ähnliche Risikoeinschätzung haben sollten, sich aber in ihrem tatsächlichen Metastasierungsverhalten deutlich unterschieden. Die Identifizierung von *EDI3* als Gen, das präferenziell in metastasierenden Tumoren exprimiert wurde, konnte in einer Gesamtzahl von 67 analysierten Endometriumkarzinomen verifiziert werden. Die mittlere Genexpression von *EDI3* war in metastasierenden Tumoren um den Faktor 6,4 höher als in nicht-metastasierenden Tumoren und eine Kaplan-Meier-Analyse ergab eine Korrelation zwischen hoher *EDI3*-Genexpression und früherer Ausbildung von Metastasen (Abb. 1.4). Eine Assoziation zwischen hoher *EDI3*-Genexpression und schlechter Prognose konnte auch in einer Kohorte von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen (Eierstockkrebs) festgestellt werden [Stewart *et al.*, 2012].

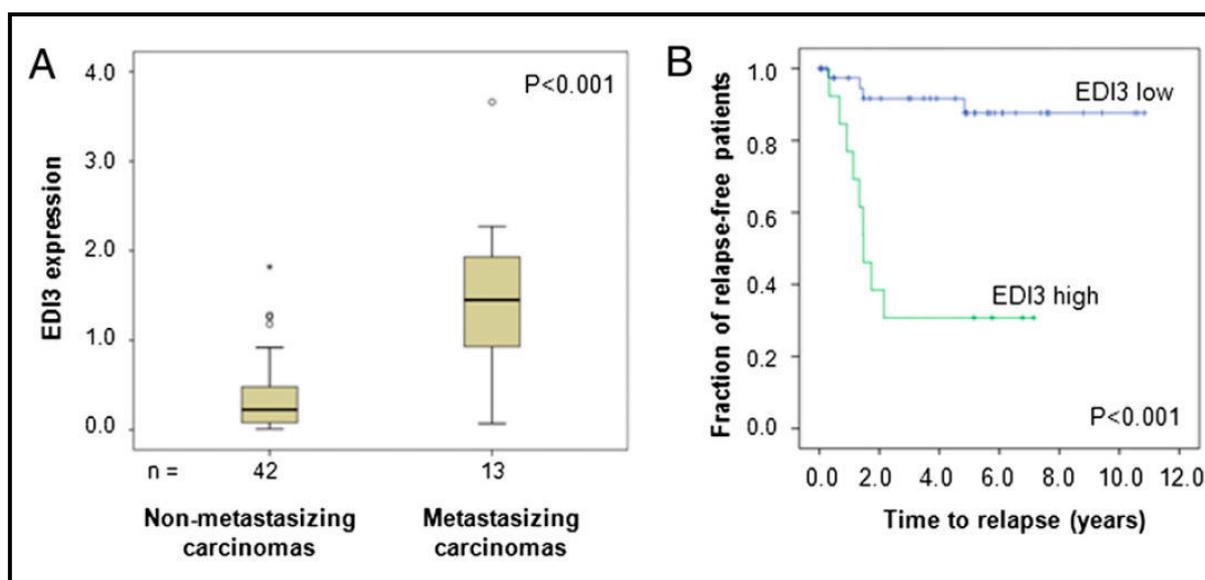


Abbildung 1.4: EDI3 als potenzieller prognostischer Faktor für die Metastasierung von Endometriumkarzinomen [Stewart *et al.*, 2012]. **A)** In metastasierenden Endometriumkarzinomen ist die *EDI3*-Genexpression signifikant erhöht verglichen mit nicht-metastasierenden Primärtumoren. **B)** Eine Kaplan-Meier-Analyse ergibt eine Korrelation zwischen hoher *EDI3*-Genexpression und früherer Metastasierung.

Abgesehen von unseren eigenen Arbeiten wurde bis heute keine Bedeutung von EDI3 im Zusammenhang mit Krebserkrankungen beschrieben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Maus-EDI3 einen hemmenden Einfluss auf die Differenzierung von Myoblasten und somit auf die Entwicklung der Skelettmuskulatur hat, und zwar unabhängig von der GDE-Enzymaktivität [Okazaki *et al.*, 2010]. Insgesamt bleibt also festzuhalten, dass die physiologische Funktion von EDI3 als einziger zytosolischer Glycerophosphodiesterase weitgehend unbekannt ist.

1.2 Cholin-Metabolismus

Ein Umstellen des zellulären Metabolismus wird zunehmend als typisches Merkmal von Tumorzellen angesehen [Hanahan & Weinberg, 2011]. Dazu gehören auch Veränderungen der Cholin-Metabolite im Zuge der Transformation [Glunde *et al.*, 2011]. Cholin-Metabolite wie freies Cholin (Cho), Glycerophosphocholin (GPC) und Phosphocholin (PC) sind wichtige wasserlösliche Intermediate bei der Synthese von Phosphatidylcholin (PtdCho), dem häufigsten Phospholipid in Biomembranen. Enzyme, die diese Metabolite ineinander umwandeln können, gewinnen deshalb an Bedeutung als Ziele klinischer Anwendungen. Aufgrund ihrer GPC-hydrolysierenden Aktivität könnten zukünftig also auch Glycerophosphodiesterasen wie EDI3 in den Fokus anwendungsorientierter Forschung rücken.

1.2.1 Cholin-Metabolite als Biomarker bei Tumorerkrankungen

Typischerweise kann bei Krebserkrankungen ein aberrantes Profil der Cholin-Metabolite mit erhöhten PC- sowie Totalcholin-Werten nachgewiesen werden [Glunde *et al.*, 2006]. Die Gesamtzunahme der Cholin-Metabolite wird deshalb als Biomarker für die Diagnose und die Beurteilung von Behandlungserfolgen angesehen [Katz-Brull *et al.*, 2002; Glunde *et al.*, 2006]. Dabei ist die ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (MRS) zur nicht-invasiven Quantifizierung der Cholin-Metabolite *in vitro* bei der Arbeit mit Zellen oder Gewebeproben und auch *in vivo* an Kleintieren oder direkt am Patienten zu einer besonders wichtigen Technik geworden [Glunde *et al.*, 2010 & 2011 a; Podo *et al.*, 2011]. Die maligne Transformation von Brustepithelzellen geht mit deutlichen Veränderungen im Cholin-Metabolismus einher. Mit Progression von normalen über immortalisierte über Onkogen-transformierte bis hin zu Tumor-abgeleiteten Zelllinien nimmt die Gesamtmenge an Cholin-Metaboliten immer weiter zu. Während in normalen Zellen GPC der häufigste Cholin-Metabolit ist, erfolgt schon sehr früh in der Karzinogenese der sogenannte „GPC to PC switch“ (Abb. 1.5), der hauptsächlich durch einen Anstieg der PC-Level verursacht wird und insgesamt in einem erniedrigten GPC/PC-Verhältnis resultiert [Aboagye & Bhujwalla, 1999; Eliyahu *et al.*, 2007].

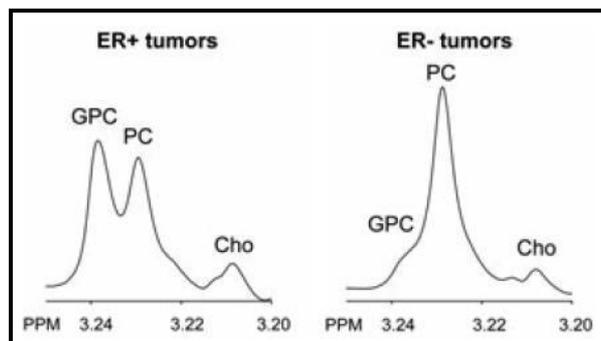


Abbildung 1.5: Typische ^1H -MRS-Spektren der Cholin-Metabolite [Cao *et al.*, 2012]. Weniger maligne ER⁺ Mammakarzinome weisen größere Mengen an GPC und somit ein hohes GPC/PC-Verhältnis auf; aggressivere ER⁻ Mammakarzinome zeigen den typischen „GPC to PC switch“.

In Ovarialkarzinomen tritt ebenfalls solch ein „GPC to PC switch“ auf [Iorio *et al.*, 2005]. Höhere Gesamtcholin-Werte sind z. B. auch in Prostatakrebs-Zelllinien zu verzeichnen; allerdings kommt es hier nicht zu einem Umschalten von GPC auf PC, sondern vielmehr zu einer Zunahme aller Cholin-Metabolite [Ackerstaff *et al.*, 2001]. Dies deutet darauf hin, dass die zugrunde liegenden Mechanismen für die Veränderungen des Cholin-Metabolismus abhängig vom Zelltyp variieren können.

1.2.2 Enzyme des Cholin-Metabolismus als therapeutische Ziele

In Tumorgewebe kann eine Überexpression bzw. verstärkte Aktivität von Enzymen demonstriert werden, die am Cholin-Metabolismus beteiligt sind (Abb. 1.6). Deshalb stellt die Hemmung dieser Enzyme, allen voran von Cholin kinase α (ChoK α) und Phospholipase D (PLD), einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Krebserkrankungen dar.

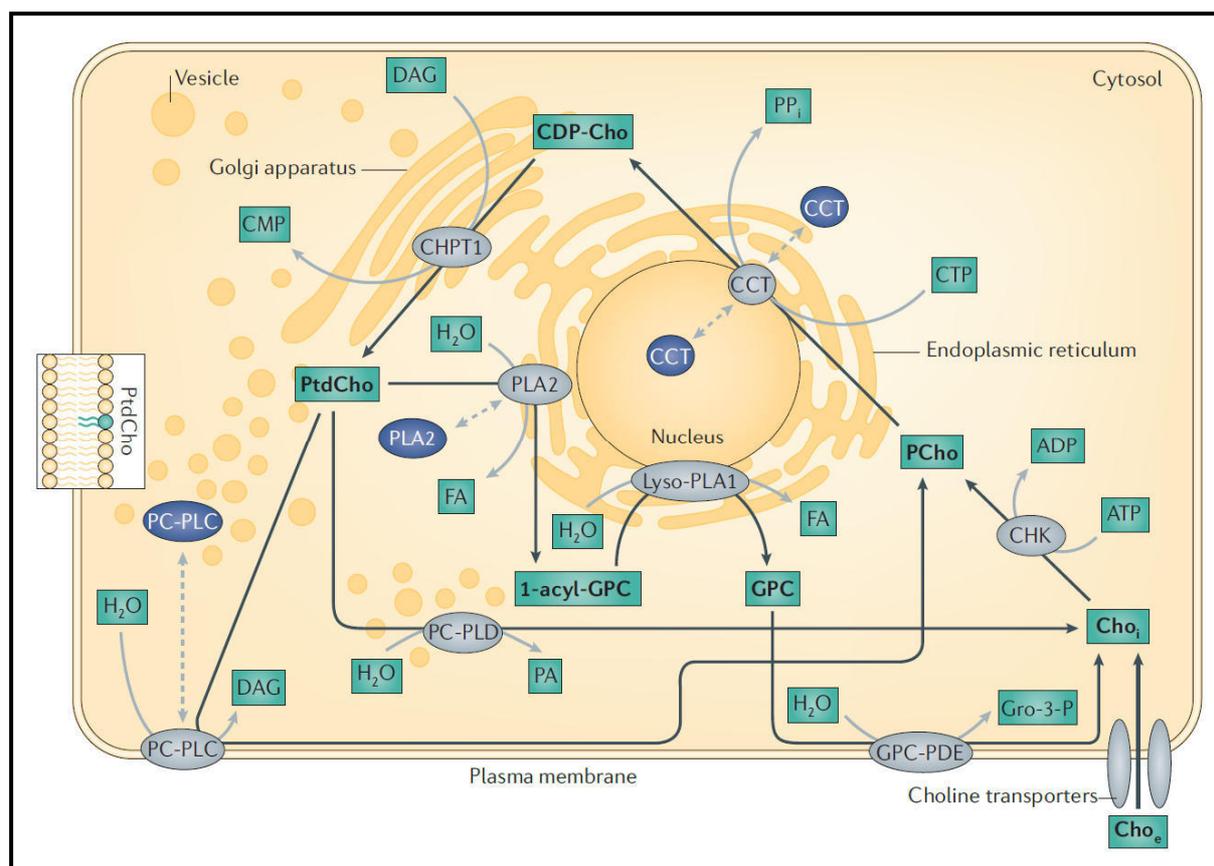


Abbildung 1.6: Die wichtigsten Enzyme des Cholin-Metabolismus [Glunde *et al.*, 2011 b]. Aktive Enzyme des Cholin-Metabolismus sind in grau dargestellt und an dem Organell lokalisiert, an dem sie aktiv sind. Durch Translokation deaktivierte Enzyme sind in dunkelblau dargestellt. Schwarze Pfeile repräsentieren die Reaktionswege des Cholin-Metabolismus; beteiligte Metabolite sind fett gedruckt. (Abkürzungen: Cho_{e/i}: Cholin extrazellulär/intrazellulär; CHK: Cholin kinase; PCho: Phosphocholin; CTP: Cytidintriphosphat; CCT: CTP-Phosphocholin-Cytidyltransferase; CDP-Cho: Cytidindiphosphat-Cholin; DAG: Diacylglycerin; CHPT1: DAG-Cholinphosphotransferase; CMP: Cytidinmonophosphat; PtdCho: Phosphatidylcholin; FA: Fettsäure, PA: Phosphatidsäure; GPC-PDE: GDE)

ChoK α phosphoryliert Cho zu PC, was der erste Schritt des sogenannten „Kennedy-Weges“ der *de novo* PtdCho-Biosynthese ist [Kennedy, 1957]. Dieses Enzym ist u. a. in Mamma- und Ovarialkarzinomen überexprimiert [Ramirez de Molina *et al.*, 2002 a & 2004; Iorio *et al.*, 2005 & 2010]. Eine Hemmung von ChoK α mit kompetitiven Inhibitoren zeigt anti-proliferative Effekte *in vitro* und anti-tumorigene Wirkung *in vivo* [Hernandez-Alcoceba *et al.*, 1997 & 1999; Clem *et al.*, 2011].

PLD hydrolysiert PtdCho und generiert so Cho und das wichtige Lipidsignalmolekül Phosphatidsäure (PA), das z. B. als Membrananker für Signalproteine dienen kann [Chae *et al.*, 2008]. Auch dieses Enzym ist u. a. in Mamma- und Ovarialkarzinomen überexprimiert [Uchida *et al.*, 1997; Noh *et al.*, 2000; Iorio *et al.*, 2005 & 2010]. Erste Untersuchungen mit selektiven PLD-Inhibitoren zeigen, dass das Invasionspotenzial von Mammakarzinom-Zelllinien herabgesetzt werden kann [Scott *et al.*, 2009] und die Fähigkeit zur Aktinreorganisation der Zellen gestört wird [Su *et al.*, 2009].

Auch die GPC-hydrolysierende Glycerophosphodiesterase GDE2 wird in aggressiveren Mammakarzinomen bzw. davon abgeleiteten Zelllinien verstärkt exprimiert und trägt so zu der Verschiebung des Metabolit-Profiles von GPC zu PC bei [Cao *et al.*, 2012]. Bisher in Fragen der klinischen Relevanz noch vernachlässigt, könnten neuere Erkenntnisse Aufschluss darüber geben, ob auch die GDE-Familie als therapeutische Zielstruktur in Betracht gezogen werden sollte.

1.3 Metastasierung von Tumorzellen

Im Zuge einer fortschreitenden Krebserkrankung verlassen Tumorzellen häufig den Primärtumor, um in benachbartes Gewebe einzudringen und sich zu weiter entfernten Stellen im Körper zu bewegen, wo sie, zumindest anfänglich, nicht durch einen Mangel an Nährstoffen oder Platz eingeschränkt sind und somit neue Kolonien, sogenannte Metastasen, bilden können. Diese Metastasierung stellt das größte Problem für die Tumorthherapie dar und ist die häufigste Todesursache von Krebspatienten. Der klassische Ablauf der Metastasierung umfasst mehrere Schritte: die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), das Durchbrechen der Basalmembran, die Dissoziation der Tumorzellen vom Primärtumor, die lokale Invasion benachbarter Gewebe, die Intravasation in Blut- oder Lymphgefäße, den Transport durch diese Gefäße, die Extravasation aus den Gefäßen, das Ansiedeln gestreuter Tumorzellen am Zielort sowie das Wachstum zu Mikrometastasen und schließlich makroskopischen Sekundärtumoren [Geiger & Peeper, 2009].

Jeder Schritt entspricht dabei einer Barriere, die auf dem Weg zur erfolgreichen Metastasierung von den Tumorzellen durch Anpassung und den Erwerb neuer Fähigkeiten überwunden werden muss. Eine besonders wichtige Fähigkeit, die schon ab einem frühen Punkt in dieser Kaskade und danach immer wieder benötigt wird, ist die gerichtete Migration von Tumorzellen, für die neben der eigentlichen Motilität auch die Adhäsion sowie das sogenannte *Spreading* von Bedeutung sind.

1.3.1 Zelladhäsion

Unter Zelladhäsion versteht man die Ausbildung von Kontakten zwischen Zellen bzw. zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM), die für den Erhalt von Gewebestrukturen in vielzelligen Organismen unentbehrlich sind.

1.3.1.1 Integrine als bidirektionale Signalmoleküle

Die für die Zell-Matrix-Adhäsion hauptverantwortlichen Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, die bidirektional Signale über die Plasmamembran vermitteln [Hynes, 2002]. Die sogenannte „inside-out“-Signalgebung dient der Aktivierung der Integrine durch intrazelluläre Stimuli, während bei der „outside-in“-Variante Signale der ECM in Form von Bindung entsprechender Liganden an das Zytoskelett und intrazelluläre Effektoren weitergeleitet werden.

In Säugern gibt es insgesamt 18 α - und 8 β -Integrin-Untereinheiten, die sich zu 24 verschiedenen Heterodimeren zusammenlagern können (Abb. 1.7) und dadurch die Ligandenspezifität festlegen [Hynes, 2002]. Die beiden Untereinheiten sind über nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander assoziiert und bestehen jeweils aus einem globulären extrazellulären Kopf, der die Liganden-Bindestelle bildet, einer Transmembran-Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Ende, das über Adapterproteine mit dem Zytoskelett verbunden ist [Hynes, 1992].

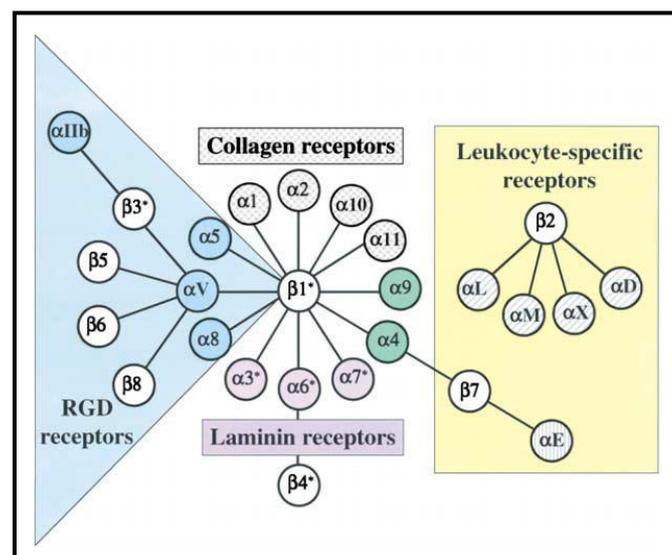


Abbildung 1.7: Die Familie der Integrin-Rezeptoren [Hynes, 2002].

Die Aktivität der Integrine und ihre Ligandenaffinität wird in erster Linie durch Konformationsänderungen reguliert [Xiong *et al.*, 2001 & 2002].

Dabei ist zwischen drei Zuständen zu unterscheiden (Abb. 1.8): einem inaktiven, bei dem die Integrine aufgrund ihrer starken Krümmung nicht an Liganden binden können, einem aktiven Zustand, bei dem die Integrine bereits in ihrer Konformation verlängert und somit bereit zur Ligandenbindung sind und schließlich einem Liganden-besetzten Zustand. Im inaktiven Zustand sorgen Interaktionen der zytosolischen Enden sowie der Transmembran-Domänen der α - und β -Untereinheiten dafür, dass die Extrazellulär-Domänen in einer geschlossenen Konformation vorliegen. Bei der Initiation der Integrin-Aktivierung kommt der Bindung von Talin an den zytosolischen Teil der β -Integrine eine Schlüsselrolle zu [Calderwood *et al.*, 1999; Tadokoro *et al.*, 2003]. Diese Assoziation resultiert in der Separation der zytosolischen Enden sowie der Transmembran-Domänen der beiden Integrin-Untereinheiten und ermöglicht so die Streckung der Extrazellulär-Domänen, was letztlich die Bindung von Liganden ermöglicht. Talin enthält mehrere Bindestellen für Aktin und Vinculin [Hemmings *et al.*, 1996] und bildet somit eine mechanische Verbindung zwischen Integrinen und dem Zytoskelett.

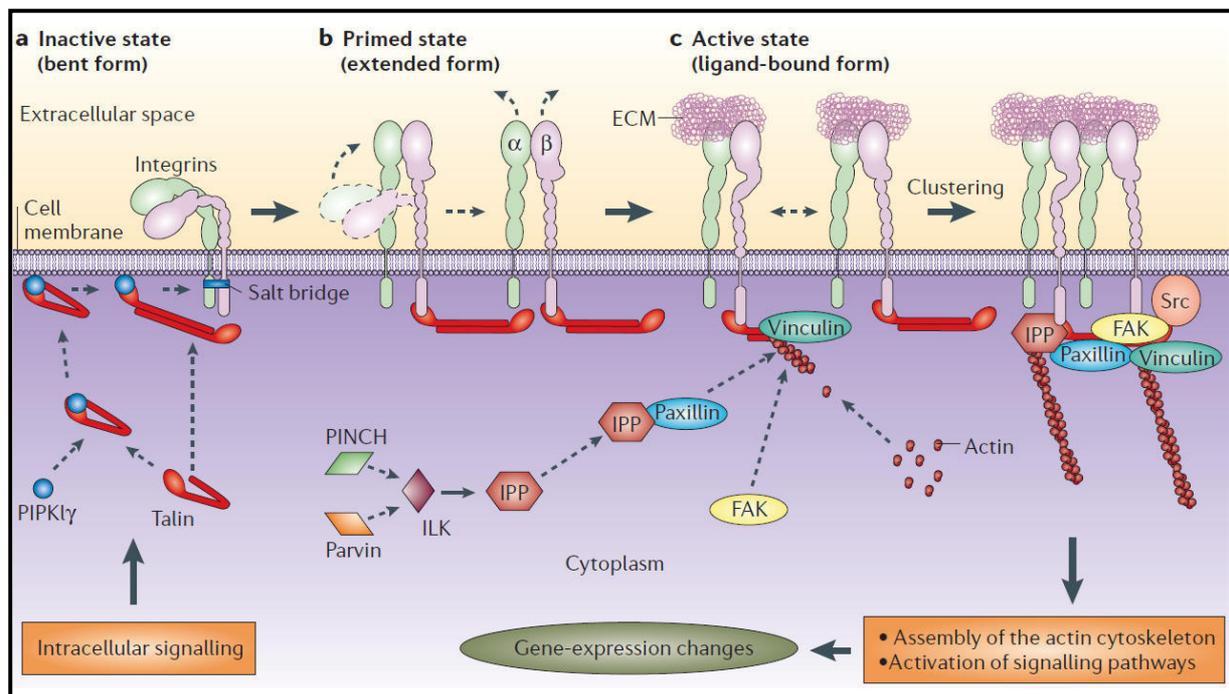


Abbildung 1.8: Biogenese Fokaler Adhäsionen [Legate *et al.*, 2006]. **a)** Integrine, die nicht an einen Liganden gebunden sind, liegen an der Zelloberfläche in einer inaktiven Konformation mit gekrümmter extrazellulärer Domäne vor. **b)** Wenn Talin in Assoziation mit der Phosphatidylinositolphosphat-Kinase zur Plasmamembran rekrutiert wird und an die zytosolischen Enden der β -Integrine bindet, werden die beiden Integrin-Untereinheiten voneinander separiert, was zu einer gestreckten Konformation führt. **c)** Die Streckung der extrazellulären Domänen der Integrine erlaubt die Bindung von ECM-Liganden. Talin dient als Plattform zur Rekrutierung verschiedener Adapterproteine und legt so den Grundstein zur Ausbildung von Fokalen Adhäsionen.

Neben der kurzzeitigen Regulation der Integrin-Aktivität auf posttranslationaler Ebene durch die bereits angesprochenen Konformationsänderungen kann die Expression der Integrine auch längerfristig durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. SP-1 und AP-1 moduliert werden [Birkenmeier *et al.*, 1991; Cervella *et al.*, 1993; Kim & Yamada, 1997].

Für die Expression einiger Integrin-Untereinheiten wie z. B. den Fibronectin-Rezeptor Integrin $\alpha 5 \beta 1$ wurde bereits ein Zusammenhang mit der Tumorprogression hergestellt [Mierke *et al.*, 2010], insbesondere im Hinblick auf Mammakarzinome. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Integrin $\beta 1$ notwendig für die Entstehung und das Wachstum von Brusttumoren ist [White *et al.*, 2004]. Insgesamt ist die Expression von Integrin $\beta 1$ in Mammakarzinomen mit schlechter Prognose assoziiert [Yao *et al.*, 2007]. Eine transiente Reduktion der Integrin $\alpha 5$ – Expression in MCF7-Brustkrebszellen beeinträchtigt deren Adhäsion und *Spreading* [Fang *et al.*, 2009]. Integrin $\alpha 5 \beta 1$ scheint auch eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur zu sein; in ersten Untersuchungen konnte sowohl ein monoklonaler Antikörper (Volociximab) als auch der Peptidinhibitor ATN-161 das Wachstum und die Metastasierung von Brustkrebszellen unterdrücken [Ricard *et al.*, 2008; Khalili *et al.*, 2006].

1.3.1.2 Fokale Adhäsionen

Da die Integrine selbst keine Enzymaktivität besitzen, hängt die einwärts gerichtete Signalweiterleitung von organisierten adhäsiven Strukturen, den Fokalen Adhäsionen (FAs), ab, die über ein Cluster von Integrinen und verschiedene Adapterproteine eine Verbindung zwischen der ECM und dem Aktin-Zytoskelett herstellen (Abb. 1.8). Eine zentrale Rolle bei der Regulation dieser Strukturen und ihrer Dynamik kommt dabei der an FAs lokalisierten Kinase FAK zu [Schaller *et al.*, 1992]. FAK ist eine intrazelluläre Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die in verschiedenen metastasierenden Tumoren wie z. B. invasiven Mammakarzinomen überexprimiert wird [Owens *et al.*, 1995; Cance *et al.*, 2000; Lark *et al.* 2005; Luo & Guan, 2010]. Ihren Einfluss auf die Tumorentwicklung nimmt FAK durch die Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse wie Adhäsion [Maung *et al.*, 1999], *Spreading* [Owen *et al.*, 1999], Invasion [Schlaepfer *et al.*, 2004], Migration [Cary *et al.*, 1996; Sieg *et al.*, 1999], Proliferation [Zhao *et al.*, 1998] und Angiogenese [Peng *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005].

Im Zuge der Integrin-Aktivierung kommt es zur Autophosphorylierung von FAK an Tyr397, wodurch eine Bindestelle für die SH2-Domäne der Src-Kinase entsteht

[Schaller *et al.*, 1994]. Die durch die Assoziation von Src und FAK induzierten Konformationsänderungen führen zur Aktivierung von Src und Autophosphorylierung an Tyr416. Src phosphoryliert daraufhin weitere Tyrosinreste in der Kinase-Domäne von FAK (Tyr407, Tyr576/577), die wichtig für deren vollständige Aktivierung sind [Calalb *et al.*, 1995]. FAK wiederum phosphoryliert und aktiviert Adapterproteine wie Paxillin [Bellis *et al.*, 1995], die aufgrund ihrer Protein-Protein-Interaktionsdomänen als Plattform zur Rekrutierung zahlreicher regulatorischer sowie struktureller Proteine dienen, dadurch die Zusammenlagerung von Multiproteinkomplexen koordinieren und Signalnetzwerke organisieren können [Schaller, 2001].

1.3.2 Spreading

Unter *Spreading* versteht man das Ausbreitungsverhalten von Zellen auf einem zweidimensionalen Substrat unter Deformierung der Plasmamembran [McGrath, 2007], also das Ausbilden Aktin-reicher Membranausläufer zur Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Zelle und Substrat.

1.3.2.1 Ausbildung organisierter Membranstrukturen

Man unterscheidet hauptsächlich zwei Typen von Membranausläufern, die sich in der Anordnung ihrer Aktinfilamente unterscheiden. Die großflächigen Lamellipodien bestehen aus einem verzweigten Netzwerk von Aktinfilamenten, während es sich bei Filopodien um fingerförmige Membranfortsätze handelt, die mit parallelen Bündeln von Aktinfilamenten gefüllt sind (Abb. 1.9).

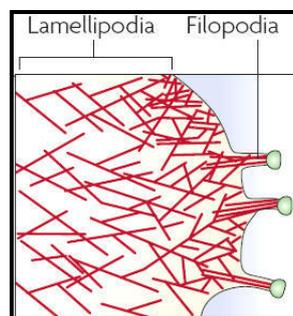


Abbildung 1.9: Organisation von Aktinfilamenten in Lamellipodien und Filopodien
[Mattila & Lappalainen, 2008].

Die Aktin-Polymerisation in Lamellipodien wird durch den Arp2/3-Komplex vermittelt, der an die Seiten bereits bestehender Aktinfilamente bindet und dort die Bildung abzweigender Tochterfilamente initiiert [Machesky *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2012]. Der

Arp2/3-Komplex wird durch WASP/WAVE (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein bzw. WASP-Familien Verprolin-homologes Protein) reguliert, die wiederum durch Cdc42 und Rac1 aktiviert werden [Cory & Ridley, 2002]. Fascin dient der Bündelung von Aktinfilamenten und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Bildung von Filopodien [DeRosier & Edds, 1980].

Die dendritische Organisation der Lamellipodien verleiht ihnen genug Festigkeit, so dass eine breite Fläche an Plasmamembran vorgeschoben werden kann; ihre typischen Ausmaße liegen bei etwa 0,1 μm Dicke und bis zu 5 μm Breite [Small *et al.*, 2002]. Im Gegensatz dazu sind Filopodien aufgrund ihrer Form prädestiniert dafür als zelluläre Sensoren zu fungieren, die die lokale Umgebung erkunden [Davenport *et al.*, 2003].

1.3.2.2 Ausbildung von Stressfasern

Stressfasern sind durch α -Aktinin quervernetzte Aktomyosin-Bündel, die für die Kontraktilität von Nicht-Muskelzellen verantwortlich sind. Sie durchziehen den Zellkörper und haben ihre Ansatzpunkte an Fokalen Adhäsionen. Dabei können sich die Aktin- und Myosinfilamente so gegeneinander verschieben, dass es zu einer Verkürzung (Kontraktion) kommt. Basierend auf ihrer subzellulären Lokalisation können Stressfasern in drei Klassen eingeteilt werden (Abb. 1.10): ventrale Stressfasern, die entlang der Zellbasis liegen und an beiden Enden an FAs befestigt sind; dorsale Stressfasern, die an einem Ende an einer FA mit der Zellbasis verbunden sind und von dort quer durch den Zellkörper ragen sowie transverse Bögen, die sich direkt unterhalb der dorsalen Zelloberfläche bilden und häufig den Übergang zwischen Zellkörper und Lamellipodium abzeichnen [Pellegrin & Mellor, 2007].

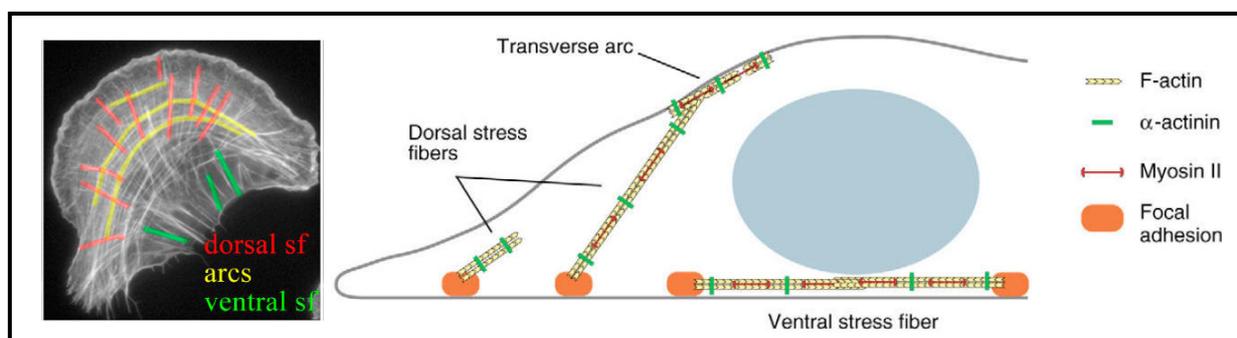


Abbildung 1.10: Struktur von Aktin-Stressfasern. F-Aktin-Färbung einer Zelle, die alle drei Arten von Stressfasern zeigt [Hotulainen & Lappalainen, 2006] sowie vereinfachtes Modell, das die subzelluläre Lokalisation der Stressfasern veranschaulicht [Pellegrin & Mellor, 2007].

1.3.2.3 Rho-GTPasen als zentrale Regulatoren

Die Ras-Superfamilie der kleinen G-Proteine umfasst über 150 Mitglieder, die in fünf Familien unterteilt werden: die Ras-, Rab-, Ran-, Arf- und Rho-GTPasen [Wennerberg *et al.*, 2005]. Während die Vertreter der Ras-Familie verschiedenste Signalwege regulieren und somit die Transkription, Differenzierung und Proliferation beeinflussen, spielen die Rab- [Zerial & McBride, 2001] und die Arf-Familie [Memon, 2004] eine Rolle beim vesikulären Transport und die einzige Ran-GTPase ist wichtig für den nukleären Transport [Weis, 2003]. Die zelluläre Migration und alle morphologischen Veränderungen, die mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts einhergehen, werden maßgeblich durch die Aktivität der Rho-GTPasen kontrolliert.

Monomere G-Proteine sind molekulare Schalter, die entweder im GTP-gebundenen aktiven Zustand oder im GDP-gebundenen inaktiven Zustand in der Zelle vorliegen [Etienne-Manneville & Hall, 2002]. Der Übergang zwischen diesen beiden Konformationen wird durch drei Klassen von Enzymen reguliert: Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), die den Austausch von GDP durch GTP beschleunigen und somit die GTPasen aktivieren [Schmidt & Hall, 2002], GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die die intrinsische Aktivität zur GTP-Hydrolyse stimulieren und somit das Abschalten der GTPasen begünstigen [Bos *et al.*, 2007] und Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs), die den Lipidanker der GTPasen umgeben und sie somit in ihrer inaktiven GDP-gebundenen Form im Zytosol zurückhalten [Olofsson, 1999; DerMardirossian & Bokoch, 2005]. Bei diesem Lipidanker handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation am C-terminalen CAAX-Motiv (C: Cysteinrest, A: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure) in Form einer Farnesylierung bzw. Geranylgeranylierung, die die Membranassoziation der GTPase erleichtert [Roberts *et al.*, 2008].

Innerhalb der Familie der Rho-GTPasen sind Rac1, RhoA und Cdc42 die wohl am besten charakterisierten Vertreter. Rac1 ist verantwortlich für die Bildung von Lamellipodien, Cdc42 für die Bildung von Filopodien und RhoA fördert neben der Bildung von Aktin-Stressfasern und Fokalen Adhäsionen auch die Aktomyosin-Kontraktilität [Ridley *et al.*, 1992 a&b; Kozma *et al.*, 1995; Nobes & Hall; 1995]. Eine effiziente Kontrolle der zellulären Migration erfordert ein räumlich und zeitlich koordiniertes Zusammenspiel der verschiedenen Rho-GTPasen, so dass es auch zu wechselseitigen Einflüssen einer Rho-GTPase auf die GEFs/GAPs einer anderen kommt, damit das notwendige Aktivitäts-Gleichgewicht aufrechterhalten werden kann

[Guilluy *et al.*, 2011]. Dieses Gleichgewicht kann bei verschiedenen Tumorerkrankungen aufgrund erhöhter Aktivitäten der Rho-GTPasen gestört werden. Die Aktivität von Rac1 ist z. B. in Mammakarzinomen erhöht [Schnelzer *et al.*, 2000] und RhoA ist u. a. in Mamma- und Ovarialkarzinomen überexprimiert [Fritz *et al.*, 1999; Horiuchi *et al.*, 2003].

In den letzten Jahren wurde auch die Bedeutung von Rap1 als Regulator der Metastasierung von Tumorzellen erkannt, nicht zuletzt wegen seiner gut untersuchten Rolle bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion [Bos *et al.*, 2003]. In Prostatakrebs-Zelllinien ist ein hohes Metastasierungspotenzial mit gesteigerter Rap1-Aktivität assoziiert [Bailey *et al.*, 2009] und in Mammakarzinom-Zelllinien beeinflusst sowohl eine Hyperaktivierung als auch eine Hemmung von Rap1 die Migration [Ahmed *et al.*, 2010]. Außerdem kann Rap1 das *Spreading* sowie die Bildung Fokaler Adhäsionen unabhängig von der FAK-Src-Kaskade induzieren [Ross *et al.*, 2012].

1.3.3 Migration

Die zelluläre Migration ist von zentraler Bedeutung für eine Vielzahl biologischer Prozesse wie z. B. die embryonale Entwicklung, die Wundheilung, die Immunantwort, aber auch die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Die Triebkraft für diesen Prozess wird durch die Polymerisierung von Aktin-Monomeren zu polarisierten Aktinfilamenten erzielt [Pollard & Borisy, 2003; Olson & Sahai, 2009].

1.3.3.1 Regulation der Aktinreorganisation

Gerichtete Migration erfolgt in Zyklen durch das Ausbilden von Membranausstülpungen an der Vorderseite der Zelle, Adhäsion auf dem Substrat bzw. der extrazellulären Matrix, Translokation des Zellkörpers und Nachfolgen des hinteren Zellteils mittels Aktomyosin-Kontraktion und dem Lösen bestehender adhäsiver Kontakte [Lauffenburger & Horwitz, 1996]. Die Koordination dieser dynamischen Prozesse wird durch verschiedene Aktin-Bindeproteine reguliert. Ena/VASP (Vasodilatator-stimulierte Phosphoproteine) beschleunigen die Polymerisierung von Aktinfilamenten [Krause *et al.*, 2003]. Cofilin kann durch Trennung bestehender Aktinfilamente die Zahl der freien Enden erhöhen [Bamburg *et al.*, 1999]. Profilin bindet an Aktin-Monomere und verhindert deren unkoordinierte Zusammenlagerung [Sun *et al.*, 1995]. Quervernetzende Proteine wie Filamin A stabilisieren Aktinfila-

mente [Kim & McCulloch, 2011]. Sogenannte *Capping*-Proteine können die Elongation von Aktinfilamenten beenden, indem sie an den freien Enden als sterisches Hindernis das Anhängen weiterer Monomere blockieren [Glenney *et al.*, 1981].

Auch Rho-GTPasen zählen, wie bereits beschrieben, zu den wichtigsten Regulatoren der Dynamik des Zytoskeletts. Der Haupteffektor von Rac1, die p21-aktivierte Kinase (PAK), kann durch Phosphorylierung die LIM-Domänen-Kinase (LIMK) aktivieren [Edwards *et al.*, 1999]. LIMK phosphoryliert und inaktiviert wiederum das Aktin-depolymerisierende Cofilin [Yang *et al.*, 1998] und trägt damit insgesamt zur Stabilisierung und Polymerisierung von Aktinfilamenten bei, was die Ausbildung von Membranausläufern begünstigt. Der Haupteffektor von RhoA, die Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK), aktiviert dagegen Myosin in zweierlei Hinsicht. ROCK phosphoryliert direkt die regulatorische leichte Kette von Myosin (MLC) [Amano *et al.*, 1996] und inhibiert zusätzlich durch Phosphorylierung die MLC-Phosphatase [Kimura *et al.*, 1996], was die Aktomyosin-Kontraktilität fördert.

1.3.3.2 Arten der zellulären Migration

Tumorzellen haben zwei Arten der Migration. Epithelzellen erhalten zunächst ihre Zell-Zell-Kontakte und wandern kollektiv in flächigen Strukturen. Mit zunehmender Dedifferenzierung und dem EMT-bedingten Verlust von E-Cadherin kommt es zur Migration einzelner Zellen [Iliina & Friedl, 2009]. In dreidimensionalen Matrices unterscheidet man zwischen mesenchymaler und amöboider Migration. Bei der mesenchymalen Migration haben die Zellen eine elongierte Fibroblasten-ähnliche Form. Durch die Sekretion von Matrixmetalloproteasen sind sie in der Lage, lokal die ECM zu degradieren und können sich so ihren Weg „bahnen“, weshalb die Migrationsgeschwindigkeit mit maximal 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ eher langsam ist. Zellen mit runder Morphologie bewegen sich dagegen amöboid vorwärts. Bei dieser schnelleren Art der Migration kommt es nicht zur ECM-Degradation; die Zellen „finden“ vielmehr ihren Weg, indem sie sich durch Lücken in der ECM drängen [Friedl & Wolf, 2003].

1.3.3.3 Die Rolle von PKC bei der zellulären Migration

Proteinkinase C (PKC) ist eine Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die in Säugern 10 Mitglieder umfasst. Die Isozyme können anhand ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften in drei Klassen eingeteilt werden: die durch Diacylglycerin (DAG) und Ca^{2+} regulierten konventionellen Isozyme (cPKCs; α , β 1,

β_2 , γ), die Ca^{2+} -unabhängigen neuen Isozyme (nPKCs; δ , ϵ , η , θ) und die weder DAG- noch Ca^{2+} -sensitiven atypischen Isozyme (aPKCs; ξ , λ) [Newton, 2003]. Die verschiedenen Isozyme können abhängig vom jeweiligen Zelltyp Funktionen in der Migration [Larsson, 2006], Proliferation, Apoptose [Dempsey *et al.*, 2000] oder Angiogenese [Sledge & Gokmen-Polar, 2006] erfüllen.

Die Aktivierung von PKC wird durch mehrere spezifische Phosphorylierungen sowie die Translokation an die Plasmamembran reguliert (Abb. 1.11). Die erste Phosphorylierung erfolgt in der Aktivierungsschleife an Thr500 durch die Phosphoinositol-abhängige Kinase PDK-1 [Le Good *et al.*, 1998] und leitet zwei weitere Autophosphorylierungen in der C-terminalen regulatorischen Domäne von PKC ein; an Thr641 im sogenannten Wende-Motiv sowie an Ser660 im hydrophoben Motiv [Newton, 2003].

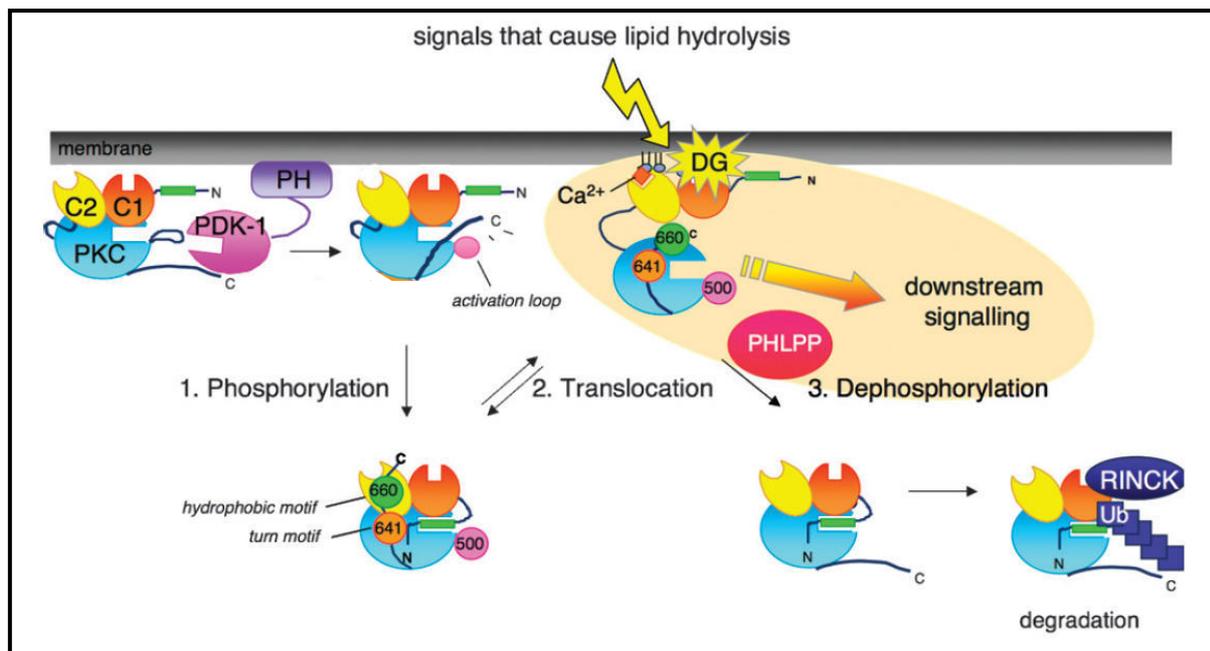


Abbildung 1.11: Die Aktivierung konventioneller PKCs [modifiziert nach Newton, 2009]. Nach einer vorbereitenden Phosphorylierung an der Aktivierungsschleife durch PDK-1 und zwei Autophosphorylierungen am Wende-Motiv sowie dem hydrophoben Motiv ist PKC in einer geschlossenen Konformation im Zytosol lokalisiert, bei der ein Pseudosubstrat (grünes Rechteck) die Substrat-Bindestelle blockiert. Signale, die zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat führen, induzieren die Translokation von PKC an die Plasmamembran, wo PKC mit seiner C2-Domäne an Ca^{2+} und mit seiner C1-Domäne an Diacylglycerin (DG) bindet. Aufgrund dieser Interaktionen werden Konformationsänderungen eingeleitet, durch die das Pseudosubstrat freigesetzt und die Signalweiterleitung ermöglicht wird. Diese aktive Konformation ist Phosphatase-sensitiv; die Dephosphorylierung von PKC durch PHLPP führt zu ihrer Degradation.

Trotz der Reifung durch diese drei Phosphorylierungen liegt PKC noch in einer inaktiven Konformation vor, bei der ein autoinhibitorisches Pseudosubstrat das aktive Zentrum blockiert. Die vollständige Aktivierung von PKC wird erst durch ihre Translokation und DAG-vermittelte Assoziation mit der Plasmamembran erreicht, durch die das Pseudosubstrat freigesetzt wird [Orr *et al.*, 1992]. Diese aktive Konformation ist sehr anfällig für die Dephosphorylierung durch Phosphatasen wie PHLPP (PH-Domänen und Leucin-reiche Wiederholungen enthaltende Protein-Phosphatase), was zur Degradation von PKC führt [Gao *et al.*, 2008].

Neben ihrer Rolle bei der Einleitung typischer Signalkaskaden wie Raf-MEK-Erk [Kolch *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 1997] kann PKC auch direkt durch mit dem Zytoskelett verbundene Effektoren wie MARCKS (Myristoyliertes Alanin-reiches C-Kinasen-Substrat) zelluläre Prozesse beeinflussen. Im nicht-phosphorylierten Zustand ist MARCKS in der Plasmamembran verankert und kann dort mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren. Die Phosphorylierung durch PKC bewirkt die Freisetzung und Translokation von MARCKS ins Zytoplasma [Thelen *et al.*, 1991], was die Aktinreorganisation und somit Prozesse wie Adhäsion, *Spreading* und Migration fördert [Disatnik *et al.*, 2002 & 2004; Chen & Rotenberg, 2010].

PKC-Isoformen sind bei Krebserkrankungen häufig dereguliert. PKC α wird in verschiedenen Tumoren überexprimiert, so auch in Mammakarzinomen [O'Brian *et al.*, 1989; Lønne *et al.*, 2010], und ist vermutlich am besten bekannt für ihren Einfluss auf *Spreading* und Migration [Ng *et al.*, 1999; Sun & Rotenberg, 1999]. Auch die Überexpression von PKC ϵ korreliert aufgrund ihres positiven Einflusses auf Adhäsion, Migration und Invasion mit dem Metastasierungspotenzial von Tumorzellen [Tachado *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2005; Gorin & Pan, 2009]. Die *in vitro*-Stimulierung von PKC mit Hilfe von Phorbolestern [Castagna *et al.*, 1982], häufig eingesetzten DAG-Analoga, kann ebenfalls die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen verstärken [Platet *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Stensman & Larsson, 2008]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird das therapeutische Potenzial von PKC-Inhibitoren vermehrt in klinischen Studien untersucht [Ali *et al.*, 2009].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

EDI3 wurde ursprünglich als differentiell exprimiertes Gen in metastasierenden Endometriumkarzinomen identifiziert. Verglichen mit nicht-metastasierenden Primärtumoren war die Genexpression von *EDI3* signifikant erhöht und eine Kaplan-Meier-Analyse ergab eine Korrelation zwischen der Expression von *EDI3* und der Ausbildung von Metastasen. Diese Assoziation zwischen hoher *EDI3*-Genexpression und schlechter Prognose konnte auch in einer Kohorte von Ovarialkarzinomen bestätigt werden. Aufgrund von Sequenzhomologien war anzunehmen, dass *EDI3* zu der Familie der Glycerophosphodiesterasen gehört. Abgesehen davon war die physiologische Funktion dieses Proteins und insbesondere seine Bedeutung für die Metastasierung von Tumorzellen noch nicht untersucht worden, zumal zu Beginn dieses Projektes auch noch keine andere Glycerophosphodiesterase mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht worden war.

Deshalb war es Ziel dieses Projektes die biologische Funktion von *EDI3* in humanen Tumorzelllinien zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang sollte zunächst die Enzymaktivität der potenziellen Glycerophosphodiesterase *EDI3* demonstriert werden. Des Weiteren sollte der Einfluss von *EDI3* auf verschiedene zelluläre Eigenschaften, die typischerweise in Tumorzellen verändert sind, untersucht werden; wobei das Hauptaugenmerk auf den Metastasen-fördernden Eigenschaften liegen sollte. Hierzu sollten zunächst phänotypische Unterschiede zwischen unveränderten humanen Tumorzellen und solchen, deren *EDI3*-Expression künstlich moduliert worden war, identifiziert werden. Als Untersuchungsmodell sollten dazu aufgrund ihrer Ableitung von einem weiteren gynäkologischen Tumor und ihrer breiten Charakterisierung sowie Verwendung in der Literatur humane MCF7-Brustkrebszellen dienen, deren *EDI3*-Expression entweder durch Einsatz von RNA-Interferenz erniedrigt oder durch stabile Transfektion erhöht worden war. Um die anhand dieses Modells beschriebenen Funktionen von *EDI3* generalisieren zu können bzw. die zugrunde liegenden Signalmechanismen näher aufzuklären, sollten die Ergebnisse jeweils in einer weiteren, vor dem klinischen Hintergrund von *EDI3* relevanten, Tumorzelllinie (abgeleitet von Endometrium- / Ovarialkarzinomen) überprüft werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen ein grundlegendes Verständnis über die Relevanz von *EDI3* im Rahmen der Metastasierung von Tumorzellen vermitteln und einen Einblick in mögliche Signalkaskaden liefern, in denen *EDI3* involviert sein könnte.

2. Material und Methoden**2.1 Material****2.1.1 Geräte**

Blot-Imager Vilber Fusion Fx7	Vilber Lourmat
Blotkammer Fastblot B44	Biometra
Brutschrank / CO ₂ -Inkubator	Binder
Echtzeit-PCR-System ABI 7500	Applied Biosystems
Elektrophorese-System Mini-PROTEAN Tetra	Bio-Rad
Thermoschüttler	Eppendorf
Konfokales Laserscan-Mikroskop FV1000	Olympus
MacsMix Rotator	Miltenyi Biotec
Magnetheizrührer IKAMAG RCT	IKA
Nanodrop ND-1000	ThermoScientific
Netzteil P25	Biometra
Neubauer-Zählkammer	Laboroptik
NMR-Spektrometer Avance II (500 MHz)	Bruker
NMR-Spektrometer Avance III (600 MHz)	Bruker
Phasenkontrast-Mikroskop NIKON eclipse T5100	Nikon
pH-Meter	Schott
Pipetten (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml)	Eppendorf
Plattenlesegerät SpectraFluor Plus	TECAN
Schüttler KS 260 basic	IKA
Spektrophotometer V-530	Jasco
Sterilbank HERAsafe	Heraeus
Thermozykler T3000	Biometra
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Megafuge 10R	ThermoScientific
Zentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser rund, 14 mm Durchmesser	Menzel
Einmal-Küvetten	Brand
Gradienten-Polyacrylamidgele 4-20%	Bio-Rad
Membran- <i>Inserts</i> (Porengröße 8 µm)	BD Biosciences
MicroAMP optische Platten (96-Well-Format)	Applied Biosystems
Mikrotiterplatten schwarz (96-Well-Format)	GreinerBio
Objektträger SuperFrost-Plus	ThermoScientific
Pipettenspitzen mit/ohne Filter	Sarstedt
PVDF-Membranen	Perkin-Elmer
Reaktionsgefäße (200 µl, 500 µl, 1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Sterilfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt
Whatman-Papier 3MM	Schleicher & Schuell
Zellkultur-Flaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	GreinerBio
Zellkultur-Platten (6-/24-/96-Well-Format)	Sarstedt
Zellkultur-Schalen (10/20 cm Durchmesser)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid (30% (v/v))	Carl Roth
Ammoniumchlorid	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
β-Mercaptoethanol	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth
Bromphenolblau	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Entellan	Merck
Ethanol, absolut	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Fibronektin, human	BD Biosciences

Fötales Kälberserum (FCS) Sera Plus	Pan-Biotech
Geneticin (G418)	Sigma
Glycerin	Carl Roth
Glycerophosphocholin (GPC)	Sigma
Glycin	Carl Roth
Gö6976 (PKC-Inhibitor)	Calbiochem
Isopropanol, absolut	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kristallviolett	Sigma
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Methanol, HPLC-Grad	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumfluorid	Carl Roth
Natriumorthovanadat	Carl Roth
Nonidet P-40	Sigma
Paraformaldehyd 4% (PFA)	Carl Roth
Ponceau S	Carl Roth
Salzsäure, konzentriert	Carl Roth
12- <i>O</i> -Tetradecanoyl-Phorbol-13-acetat (TPA)	Sigma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Trichloressigsäure	Carl Roth
Tris	Carl Roth
Triton X-100	Sigma
Trypsin-Inhibitor (Typ II)	Sigma
Tween 20	Sigma
Zinkchlorid	Carl Roth

2.1.4 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Kommerzielle Puffer und Lösungen

Anoden-/Kathoden-Pufferkonzentrate A&K	Carl Roth
Diethylpyrocarbonat-behandeltes (DEPC) Wasser	Sigma

Lipofektamin RNAiMax		Invitrogen
Lane Marker Reduzierender Probenpuffer (5x)		Thermo Scientific
Luminol		Perkin Elmer
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail		Invitrogen
Protease-Inhibitor-Cocktail		Invitrogen
QIAzol Lyse-Reagenz		Qiagen
QuantiTect Primer Assays		Qiagen
	β -Aktin	QT01680476
	EDI3	QT00066598
	GDE2	QT00079716
	PKC α	QT00095746
	Integrin α 5	QT00080871
	Integrin β 1	QT00068124
Trypsin/EDTA (0,05/0,02% (w/v))		PAN Biotech

2.1.4.2 Hergestellte Puffer und Lösungen

Anodenpuffer:	10% (v/v) Konzentrat A und 20% (v/v) Methanol in <i>aqua dest.</i>
Blockier-Lösung:	Immunoblots: 5% (w/v) Magermilchpulver bzw. BSA in 1x TBS-T Immunfärbungen: 3% (w/v) BSA und 0,1% Tween 20 in 1x PBS
Kathodenpuffer:	10% (v/v) Konzentrat K und 20% (v/v) Methanol in <i>aqua dest.</i>
Kristallviolett:	0,1% (w/v) Kristallviolett und 10% (v/v) Ethanol in <i>aqua dest.</i>
2x Ladepuffer:	125 mM Tris/HCl pH 6.8, 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau in <i>aqua dest.</i>
10x Laufpuffer:	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS in <i>aqua dest.</i>
10x PBS (pH 7,4):	27 mM KCl, 18 mM KH ₂ PO ₄ , 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,37 M NaCl in <i>aqua dest.</i>
Ponceau-Lösung:	0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure

RIPA-Puffer: 1% (v/v) Tergitol, 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na₃VO₄, 10% (v/v) Glycerin in *aqua dest.*
(Protease-/Phosphatase-Inhibitor-Cocktail jeweils 1:100 dazu)

Sammelgel-Puffer: 0,47 M Tris in *aqua dest.*; mit Salzsäure auf pH 6,7 bringen

10x TBS (pH 7,4): 1,5 M NaCl und 500 mM Tris in *aqua dest.*

1x TBS-T: 10% (v/v) 10x TBS, 0,1% (v/v) Tween 20 in *aqua dest.*

Trenngel-Puffer: 3 M Tris in *aqua dest.*; mit Salzsäure auf pH 8,8 bringen

Stripping-Puffer: 0,2 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Tween 20 in *aqua dest.*; mit Salzsäure auf pH 2,2 bringen

2.1.5 Zelllinien

MCF7: Die schwach metastasierende MCF7-Zelllinie ist abgeleitet von einem humanen Mammakarzinom, das 1970 aus einer pleuralen Effusion einer 69-jährigen kaukasischen Patientin isoliert wurde [Soule *et al.*, 1973].

MCF7-EDI3: MCF7-Zelllinie, die durch Transfektion mit dem Vektor pCMV6-GFP-EDI3 so verändert wurde, dass sie humanes EDI3 stabil überexprimiert (Origene, AMS Bio, kundenspezifisch).

OVCAR3: Die OVCAR3-Zelllinie ist abgeleitet von einem humanen Ovariakarzinom und wurde 1982 aus dem malignen Aszites einer 60-jährigen kaukasischen Patientin mit progressivem Adenokarzinom etabliert [Hamilton *et al.*, 1983].

AN3CA: Die undifferenzierte AN3CA-Zelllinie ist abgeleitet von einer Lymphknoten-Metastase einer 55-jährigen kaukasischen Patientin mit Endometriumkarzinom [Dawe *et al.*, 1964].

NIH3T3-GFP/EDI3: Immortalisierte NIH3T3-Zelllinie aus embryonalen Mausfibroblasten, die durch stabile Transfektion mit dem Expressionsplasmid pBABE so verändert wurde, dass sie entweder GFP oder humanes EDI3 kovalent gebunden an einen V5-Tag überexprimiert. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *EDI3* in dieser Zelllinie im Vergleich zu normalen MCF7-Zellen 3000-fach erhöht ist [Lesjak, 2010].

2.1.6 Medien

für MCF7-Zellen:	500 ml Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	
	(+ 4,5 g/l Glukose)	Pan-Biotech
	5 ml Natriumpyruvat	Sigma
	5 ml Penicillin/Streptomycin	Gibco
	50 ml FCS (hitze-inaktiviert)	Pan-Biotech
	500 µl 100x mem NEAA	Gibco
	500 µl Gentamycin	Gibco
	500 µl Insulin	Sigma
für MCF7-EDI3-Zellen:	500 ml Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	
	(+ 4,5 g/l Glukose)	Pan-Biotech
	50 ml FCS	Pan-Biotech
	500 µl Insulin	Sigma
	5 ml Geneticin (G418)	Sigma
für OVCAR3-Zellen:	500 ml RPMI-1640-Medium	Pan-Biotech
	100 ml FCS	Pan-Biotech
	500 µl Insulin	Sigma
für AN3CA-Zellen:	500 ml Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	
	(+ 4,5 g/l Glukose)	Pan-Biotech
	5 ml Natriumpyruvat	Sigma
	5 ml Penicillin/Streptomycin	Gibco
	50 ml FCS (hitze-inaktiviert)	Pan-Biotech
	500 µl 100x mem NEAA	Gibco

für NIH3T3-Zellen: 500 ml Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM)
(+ 4,5 g/l Glukose) Pan-Biotech
5 ml Penicillin/Streptomycin Gibco
50 ml FCS Pan-Biotech

für RNAi-Experimente: Normales Medium ohne Antibiotika („Antibiotikafrei“)
Opti-MEM Gibco

für Replattierungs-Experimente: Normales Medium ohne Antibiotika und mit reduzi-
ziertem FCS-Gehalt von nur 1% (v/v)
(„Serumfreies Suspensionsmedium“)

2.1.7 Kommerzielle Kits

Amplex Red Phospholipase D Assay Kit	Invitrogen
BCA Proteinassay-Kit	ThermoScientific
cDNA Reverse Transkriptions-Kit	Applied Biosystems
GTPase-Aktivitätsassay Combo-Kit	Cytoskeleton
Qproteome Zellkompartimentierungs-Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green Echtzeit-PCR Kit	Qiagen
Stealth siRNA Transfektions-Kit	Invitrogen
Kontrolle	#12935-200 / #12935-300
EDI3 #1	HSS125510
EDI3 #2	HSS183474
PKC α	HSS108491

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primärantikörper

anti- α -Tubulin, aus Kaninchen	Cell Signaling	#2144
anti- β -Aktin, aus Maus	Sigma	#A2228
anti-Calnexin, aus Kaninchen	Cell Signaling	#2433
anti-phospho-FAK (Tyr397), aus Kaninchen	Cell Signaling	#3283
anti-FAK, aus Kaninchen	Cell Signaling	#3285
anti-GPCPD1 (EDI3), aus Maus	AMS Bio (kundenspezifisch)	

anti-Integrin α 5, aus Kaninchen	Cell Signaling	#4705
anti-Integrin β 1, aus Kaninchen	Cell Signaling	#4706
anti-phospho-MLC (Ser19), aus Maus	Cell Signaling	#3675
anti-MLC, aus Kaninchen	Cell Signaling	#3672
anti-phospho-Paxillin (Tyr118), aus Kaninchen	Cell Signaling	#2541
anti-Paxillin, aus Maus	BD Biosciences	#610052
anti-PCNA, aus Maus	Cell Signaling	#2586
anti-phospho-PKC α / β II (Thr641), aus Kaninchen	Cell Signaling	#9375
anti-PKC α , aus Kaninchen	Santa Cruz	#sc-208
anti-Rac1, aus Maus	BD Biosciences	#610651
anti-RhoA, aus Kaninchen	Cell Signaling	#2117
anti-phospho-Src (Tyr416), aus Kaninchen	Cell Signaling	#2101
anti-Src, aus Kaninchen	Cell Signaling	#2108

2.1.8.2 Sekundärantikörper

anti-Maus Alexa Fluor 647, aus Affe	Invitrogen
anti-Maus HRP-konjugiert, aus Pferd	Cell Signaling
anti-Kaninchen HRP-konjugiert, aus Ziege	Cell Signaling

2.1.9 Fluoreszenzfarbstoffe

Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen
4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen
Rhodamin Phalloidin	Invitrogen

2.1.10 Größenstandards für SDS-PAGE/Immunoblots

MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen
Precision Plus Protein Standard Dual Color	Bio-Rad

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in serumhaltigen Vollmedien kultiviert. Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank und unter ausschließlicher Verwendung steriler Materialien durchgeführt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen in der Regel im Abstand von 3-4 Tagen passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsin/EDTA von den Zellkultur-Flaschen abgelöst, in Vollmedium resuspendiert und je nach Zelldichte in einer Verdünnung von etwa 1/3 replattiert. Vor jedem Experiment wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die genaue Zellzahl pro ml der verwendeten Zellsuspension ermittelt.

2.2.2 RNA-Analyse

2.2.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurden die Zellen in QIAzol (Qiagen) lysiert. Dabei handelt es sich um eine Lösung aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol, die Zellmembranen aufbrechen und gleichzeitig RNasen inhibieren kann, so dass die RNA-Integrität während der Homogenisierung beibehalten bleibt [Chomczynski & Sacchi, 1987]. Zur RNA-Gewinnung wurden die Zellen in Kulturplatten im 6-Well-Format einmal mit 1x PBS gewaschen und durch Lyse in 1 ml QIAzol geerntet. Bis zur RNA-Isolierung können QIAzol-Proben mehrere Wochen unter Gewährleistung der RNA-Stabilität bei -20°C gelagert werden.

Für die Isolierung der RNA wurde das Homogenat nach Zugabe von 200 µl Chloroform intensiv gemischt. Nach einer Inkubation für 3 min bei RT wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, um die obere RNA-enthaltende wässrige Phase von der unteren organischen Phase zu trennen. Die RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol zur wässrigen Phase präzipitiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden die Proben erneut für 10 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 80% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 7.500 x g wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet bei RT an der

Luft getrocknet. Die RNA wurde in 25 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und bei –20°C gelagert.

2.2.2.2 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) anhand der Absorptionswerte bei 260 nm. Neben der RNA-Konzentration in ng/µl wurden auch die Absorptionsverhältnisse 260nm/280nm (Proteinkontamination) sowie 260nm/230nm (Phenolreste) zur Abschätzung des Reinheitsgrades der RNA bestimmt.

2.2.2.3 Reverse Transkription

cDNA wurde mit Hilfe eines Kits zur Reversen Transkription (Applied Biosystems) synthetisiert. Jeder Reaktionsansatz enthielt 10x Reversen Transkriptionspuffer, 25x dNTP-Mix (100 mM), 10x Random Primer, MultiScribe Reverse Transkriptase (50 Einheiten), 2 µg RNA und DEPC-behandeltes Wasser in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktion der Reversen Transkription wurde für 10 min bei 25°C, dann für 2 h bei 37°C und schließlich noch für 5 s bei 85°C durchgeführt. Alle cDNA-Proben wurden mit DEPC-behandeltem Wasser auf eine Endkonzentration von 10 ng/µl verdünnt und bei –20°C gelagert.

2.2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (RT-qPCR) wurde unter Verwendung des QuantiTect SYBR Green RT-qPCR-Kits (Qiagen) am PCR-System ABI 7500 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Messung der PCR-Produkte in Echtzeit, also während sie akkumulieren, erlaubt die Quantifizierung innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion [Higuchi *et al.*, 1993]. Da es sich bei SYBR Green um einen Farbstoff handelt, der in die doppelsträngige DNA (dsDNA) interkalieren kann und dessen Fluoreszenz auch nur in diesem dsDNA-gebundenen Zustand detektiert werden kann, nimmt die Intensität des Fluoreszenzsignals im Reaktionsverlauf abhängig von der Quantität der dsDNA im Reaktionsgemisch zu [Morrison *et al.*, 1998]. Die Aufnahme einer charakteristischen Schmelzkurve bei der Schmelztemperatur des Amplikons indiziert die Reinheit des PCR-Produktes.

Die RT-qPCR wurde in microAMP optischen Platten im 96-Well-Format (Applied Biosystems) durchgeführt. Für jeden verwendeten Primer wurde auch eine Kontrolle

ohne Templat vermessen, in der die cDNA durch DEPC-behandeltes Wasser ersetzt wurde. Jede Reaktion enthielt 2x SYBR Green-Mix, 10x Primer-Assay, 50 ng cDNA und DEPC-behandeltes Wasser in einem Gesamtvolumen von 25 μ l. Die Standardbedingungen zur Amplifikation waren 2 min bei 50°C, 15 min bei 95°C zur Initiierung der DNA-Polymerase gefolgt von 40 Zyklen von 94°C für 15 min (Denaturierung der dsDNA), 55°C für 30 s (Primerbindung) und 72°C für 35 s (Elongation). Nach der Amplifikation wurden die Proben zur Aufnahme einer Schmelzkurve zweimal langsam bis auf 95°C erhitzt und auf 60°C abgekühlt.

Die relative Quantifizierung wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – Methode kalkuliert [Livak & Schmittgen, 2001]. Dabei wird das Expressionslevel einer Zielstruktur relativ zu einer Referenzprobe, dem sogenannten Kalibrator (z. B. unbehandelte Probe/ Vektorkontrolle/Zeitpunkt 0), repräsentiert. Die Menge der Ziel-mRNA in der Probe, normalisiert gegenüber einem endogenen *Housekeeping*-Gen wie in diesem Fall Aktin sowie relativ zum normalisierten Kalibrator, wird dann als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben, wobei gilt, dass $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Probe}) - \Delta Ct(\text{Kalibrator})$ und $\Delta Ct = Ct(\text{Housekeeping-Gen}) - Ct(\text{Zielgen})$ ist. Der Ct-Wert gibt dabei den Zyklus an, bei dem die Fluoreszenzintensität erstmals einen bestimmten Schwellenwert überschreitet.

2.2.3 Proteinanalyse

2.2.3.1 Proteinextraktion

2.2.3.1.1 Herstellung von Gesamt-Zelllysaten

Zur Gewinnung von Gesamt-Zelllysaten wurden die Zellen in Kulturplatten im 6-Well-Format einmal mit 1 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen und dann auf Eis in 100 μ l RIPA-Puffer abgeschabt. Zur vollständigen Lyse wurden die Proben für 20 min bei 4°C rotiert und danach für 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Die das Gesamtprotein enthaltenden Überstände wurden bei –80°C gelagert.

2.2.3.1.2 Herstellung subfraktionierter Zelllysate

Die Gewinnung subfraktionierter Zelllysate erfolgte mit Hilfe des Qproteome Zellkompartimentierungs-Kits (Qiagen). Hierzu wurden die Zellen in Kulturschalen mit 10 cm Durchmesser einmal mit 5 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen und dann auf Eis in 500 μ l 1x PBS abgeschabt. Nachdem die Zellen für 15 min bei 4°C und 500 x g

pelletiert worden waren, wurden sie in 200 µl Extraktionspuffer CE1 resuspendiert und für 10 min bei 4°C rotiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 1.000 x g konnte der zytosolische Überstand abgenommen werden. Das Pellet wurde in 100 µl Extraktionspuffer CE2 resuspendiert und zur vollständigen Lyse für 45 min bei 4°C rotiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 6.000 x g konnte der Überstand abgenommen werden, der die Membranfraktion enthielt. Die Proteinfractionen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe des BCA-Proteinassay-Kits (Thermo Scientific). Diese Methode beruht darauf, dass die Peptidbindungen in Proteinen mit Cu^{2+} -Ionen in einer Biuret-Reaktion einen Komplex bilden und diese in alkalischer Lösung quantitativ zu Cu^+ -Ionen reduzieren. Diese Cu^+ -Ionen bilden mit jeweils zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen violettfarbenen Chelat-Komplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch ausgewertet werden kann [Smith *et al.*, 1985].

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 5 µl einer Proteinlösung zu 795 µl destilliertem Wasser gegeben. Zu dieser verdünnten Proteinprobe wurden jeweils 196 µl Reagenz A (alkalische BCA-Lösung) und 4 µl Reagenz B (Kupfersulfatlösung) gegeben. Die Proben wurden in einem Thermoschüttler für 30 min auf 60°C erhitzt und danach für 10 min bei RT abgekühlt. Anschließend wurde mit einem Spektrophotometer (Jasco) die Absorption bei 562 nm gemessen und anhand einer vorbereiteten Standardkurve mit bekannten Konzentrationen an Serumalbumin die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

2.2.3.3 Aufkonzentrierung von Proteinproben

Die geringe Proteinkonzentration subfraktionierter Zelllysate machte eine Aufkonzentrierung der Proben notwendig [Wessel & Flügge, 1984]. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das entsprechende Volumen für 50 µg Zytosol- bzw. Membran-Proteinlösung mit 1x PBS auf ein Gesamtvolumen von 300 µl gebracht. Durch die Zugabe von 600 µl Methanol, 200 µl Chloroform und 200 µl destilliertem Wasser kam es nach intensivem Mischen der Proben sowie einer Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g und RT zu einer Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig bis zur Interphase abgenommen und verworfen. Zu

der unteren organischen Phase wurde erneut 1 ml Methanol hinzugegeben und intensiv gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 7 min bei 12.000 x g und RT wurde das Methanol abgenommen, ohne dabei das Proteinpellet zu berühren. Nachdem das Proteinpellet durch Erwärmen auf 60°C für etwa 15 min vollständig getrocknet worden war, wurde es in 25 µl Ladepuffer aufgenommen.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine zentrale Technik zur Analyse von Proteinen [Laemmli, 1970]. Hierbei werden Proteingemische in einem diskontinuierlichen Gel auf Polyacrylamidbasis aufgrund ihres Molekulargewichtes getrennt. Durch Zusatz von SDS, einem anionischen Detergenz, werden die Proteine linearisiert und deren Eigenladung überdeckt, so dass die Wanderung im elektrischen Feld nur noch vom Molekulargewicht abhängt.

2.2.3.4.1 Vorbereitung der Gele

Polyacrylamidgele wurden in der Regel mit Hilfe des Mini-PROTEAN Tetra Elektrophorese-Systems (Bio-Rad) nach Herstellerangaben vorbereitet. Für ein 1,5 mm dickes 8%iges Trenngel wurden 5,0 ml destilliertes Wasser, 3,0 ml Acrylamid, 2,8 ml Trenngelpuffer, 120 µl 10% (w/v) SDS, 4,8 µl TEMED und 120 µl APS gemischt und zwischen zwei Glasplatten gefüllt, die in einen entsprechenden Rahmen eingespannt waren. Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit 1 ml Isopropanol überdeckt, um eine mögliche Verdunstung zu verhindern. Das 5%ige Sammelgel setzte sich aus 2,4 ml destilliertem Wasser, 0,5 ml Acrylamid, 0,4 ml Sammelgelpuffer, 2,5 µl TEMED und 50 µl APS zusammen. Vor dem Auspolymerisieren wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt, der die Anzahl und Größe der späteren Geltaschen vorgab. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Glasplatten mit den Gelen in feuchte Papiertücher gewickelt und bis zum Gebrauch für maximal zwei Wochen bei 4°C gelagert. Zur Analyse besonders kleiner Proteine wie z. B. von GTPasen mit einem Molekulargewicht von 20 kDa wurden stattdessen vorgefertigte Gradienten-Polyacrylamidgele (4-20%, Bio-Rad) verwendet.

2.2.3.4.2 Elektrophorese

Gleiche Proteinmengen für alle Proben eines Gels wurden mit dem entsprechenden Volumen an 2x bzw. 5x Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die vorbereiteten Gele wurden in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, die Kämme entfernt und die innere sowie äußere Kammer mit 1x Laufpuffer befüllt. Um den Verlauf der Elektrophorese verfolgen zu können, wurden zwei verschiedene Protein-Standards verwendet; 5 µl des mit dem bloßen Auge sichtbaren Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad) und 3 µl des später im Immunoblot detektierbaren MagicMark (Invitrogen). Die Elektrophorese wurde zu Beginn bei 25 mA durchgeführt, bis die Lauffront das Sammelgel verlassen hatte; danach wurde die Stromstärke auf 45 mA erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus den Glasplatten herausgelöst und bis zum Membrantransfer in Kathodenpuffer gelegt.

2.2.3.5 Immunoblot

2.2.3.5.1 Membrantransfer

Um die aufgetrennten Proteine zu immobilisieren, wurden sie unmittelbar nach der Gelelektrophorese mit Hilfe einer FastBlot-Blotkammer (Biometra) im sogenannten *Semi-Dry-Verfahren* auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurden 16 Whatman-Papiere sowie die PVDF-Membran auf Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und dann in Anodenpuffer äquilibriert. Die vorbereiteten Komponenten wurden folgendermaßen von unten nach oben zu einem Stapel zusammengesetzt: 12 Lagen Whatman-Papier getränkt in Anodenpuffer, PVDF-Membran, Gel, 4 Lagen Whatman-Papier getränkt in Kathodenpuffer. Um einen effizienten Transfer zu gewährleisten, wurden mögliche Luftblasen zwischen den Schichten durch Herauswalzen entfernt. Der Transfer wurde bei 234 mA pro Gel (5 mA/cm²) durchgeführt; die Dauer richtete sich dabei nach dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine (30 min für Proteine um 20 kDa, 40 min für Proteine zwischen 40 und 80 kDa, 50 min für Proteine von mehr als 100 kDa). Um das Gelingen des Transfers zu überprüfen, wurde die Membran 5 min in destilliertem Wasser gewaschen, kurz in einer Ponceau S-Lösung angefärbt und nochmals in destilliertem Wasser gewaschen, um die Proteine zu visualisieren. Durch Waschen in TBS-T konnte die Ponceau S-Färbung vollständig entfernt werden.

2.2.3.5.2 Antikörperinkubation

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran entweder in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver oder 5% (w/v) BSA, abhängig vom zu verwendenden Antikörper, für 2 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Bei Bedarf wurde die Membran an dieser Stelle zur gleichzeitigen Analyse verschieden großer Proteine quer durchgeschnitten. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem gewünschten Primärantikörper, der zuvor in 5-10 ml der entsprechenden Blockier-Lösung verdünnt worden war (Tab. 1), unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran 3x 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend für 2 h (20 min bei anti- α -Aktin als Primärantikörper) bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert, der ebenfalls zuvor entsprechend den Angaben in Tabelle 1 in 5-10 ml Blockier-Lösung verdünnt worden war.

Tabelle 1: Inkubationsbedingungen der Antikörper für Immunoblots

Erstantikörper	Zweitantikörper	Konzentrationen	Blockier-Lösung
anti- α -Tubulin	anti-Kaninchen	1:1000/1:3000	BSA
anti- β -Aktin	anti-Maus	1:3000/1:5000	Milch
anti-Calnexin	anti-Kaninchen	1:1000/1:3000	BSA
anti-p-FAK	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-FAK	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-EDI3	anti-Maus	1:1000/1:1000	Milch
anti-Integrin α 5	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	Milch
anti-Integrin β 1	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	Milch
anti-p-MLC	anti-Maus	1:1000/1:1000	BSA
anti-MLC	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-p-Paxillin	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-Paxillin	anti-Maus	1:1000/1:1000	BSA
anti-PCNA	anti-Maus	1:1000/1:1000	Milch
anti-p-PKC $\alpha\beta$	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-PKC α	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-Rac1	anti-Maus	1:1000/1:1000	BSA
anti-RhoA	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-p-Src	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA
anti-Src	anti-Kaninchen	1:1000/1:1000	BSA

Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran nochmals 3x 10 min in TBS-T gewaschen. Zur Detektion der spezifischen Proteinbanden wurde die Membran mit Luminol (Perkin Elmer) inkubiert; die Visualisierung erfolgte durch Aufnahmen am Blot-Imager Vilber Fusion Fx7 (Vilber Lourmat). Densitometrische

Analysen der Proteinbanden wurden unter Benutzung der Software ImageJ durchgeführt (NIH).

Nach der Detektion wurden die gebundenen Antikörper durch Verwendung eines *Stripping*-Puffers für etwa 45 min bei RT von der Membran entfernt. Sollten auf derselben Membran weitere Proteine analysiert werden, wurden die beschriebenen Schritte vom Blocken an wiederholt. Andernfalls wurde die Membran kurzfristig bei 4°C in TBS-T oder langfristig getrocknet bei –20°C gelagert.

2.2.3.6 EDI3-Aktivitätsassay

Die Enzymaktivität von EDI3 wurde *in vitro* mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten spektrophotometrischen Assays bestimmt, bei dem es sich um eine Modifikation des Amplex Red Phospholipase D Assay-Kits von Invitrogen handelt. Hierzu wurden entweder rekombinantes Protein oder 100 µg Gesamt-Zelllysate mit Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,14 M NaCl and 2 mM MgCl₂) auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht und in einer schwarzen Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu diesen verdünnten Proteinproben wurden nun zügig 100 µl eines Reaktions-Mixes gegeben, so dass finale Konzentrationen von 2 Einheiten/ml Meerrettich-Peroxidase (HRP), 0,2 Einheiten/ml Cholinoxidase, 100 µM Amplex Red und 0,5 mM Glycerophosphocholin (GPC) erreicht wurden. Durch Inkubation bei 37°C wurde die EDI3-katalysierte Hydrolyse von GPC zu Cholin gestartet. Im nächsten Schritt wurde das gebildete Cholin durch die vorhandene Cholinoxidase zu Betain und H₂O₂ oxidiert, welches im letzten Schritt in Anwesenheit von HRP zur Oxidation von Amplex Red und somit zur Bildung des roten Fluoreszenzfarbstoffes Resorufin führte. Die Cholin-Produktion wurde also durch zeitabhängige Messungen der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (TECAN SpectraFluor Plus) quantifiziert. Um eine Korrektur der Hintergrundfluoreszenz, die durch bereits vorhandenes Cholin in den Zelllysaten bedingt wird, zu ermöglichen, wurde jede Probe zusätzlich mit einem Reaktions-Mix ohne GPC inkubiert, so dass die EDI3-katalysierte Reaktion und somit die Neuproduktion von Cholin ausblieb. Der Fluoreszenzwert einer Probe, der ohne GPC-Zugabe ermittelt wurde, wurde jeweils von dem dazugehörigen Wert bei Zugabe von GPC subtrahiert.

2.2.4 RNA-Interferenz zur transienten Reduktion der Genexpression

Kurze interferierende RNAs (siRNAs) wurden benutzt um mittels eines sequenzspezifischen Prozesses, der sogenannten RNA-Interferenz [Fire *et al.*, 1998], die Genexpression von *EDI3* abzuschalten. Diese siRNA-vermittelte transiente Reduktion der *EDI3*-Genexpression erfolgte in den verwendeten Zelllinien jeweils mit zwei verschiedenen siRNA Duplex-Oligoribonukleotiden (Invitrogen), die spezifisch gegen unterschiedliche Exons von *EDI3* gerichtet waren, sowie mit einem nicht-zielgerichteten Kontroll-siRNA-Duplex.

Alle Experimente, bei denen siRNAs zum Einsatz kamen, wurden in Kulturplatten im 6-Well-Format durchgeführt. Dazu wurden 20 nM siRNA in 500 µl Opti-MEM-Medium (Gibco) vorgelegt. Anschließend wurden 5 µl Lipofektamin RNAiMax (Invitrogen) hinzugegeben, intensiv gemischt und der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Lipofektamin ist ein weitläufig eingesetztes Transfektionsreagenz, das sogenannte Liposome bildet. Hierbei handelt es sich um Vesikel, die leicht mit der Zellmembran fusionieren können und dadurch den Eintritt von Nukleinsäuren in das Zytosol ermöglichen [Felgner *et al.*, 1987]. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsinisiert, in antibiotikafreiem Medium resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Zugabe von 500.000 Zellen in 2,5 ml antibiotikafreiem Medium zu jedem Ansatz wurde die Kulturplatte kräftig geschwenkt und anschließend für 72 h in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um eine Herunterregulation von *EDI3* um 60-90% (abhängig von der Zelllinie) auf RNA- sowie Protein-Ebene zu erzielen. Nach dieser Inkubationsphase, die im Folgenden nur noch als siRNA-Knockdown bezeichnet wird, konnten die Zellen mit herabgesetzter *EDI3*-Expression für verschiedene Experimente verwendet werden, die nachfolgend genauer beschrieben werden. Der siRNA-Knockdown in stabil transfizierten *EDI3*-überexprimierenden MCF7-Zellen wurde analog hierzu unter Verwendung einer siRNA, die spezifisch gegen PKCα gerichtet war, durchgeführt. Nach jeder Transfektion wurden Proben zur Isolierung der Gesamt-RNA gesammelt, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR analysiert, um den erfolgreichen Knockdown von *EDI3* bzw. PKCα sicherzustellen.

2.2.5 Migrations-Assays

2.2.5.1 Scratch-Assay

Nachdem in MCF7- bzw. AN3CA-Zellen die EDI3-Expression im Rahmen des bereits beschriebenen siRNA-Knockdowns herabgesetzt worden war, wurde ein Teil der konfluenten Zell-Monoschicht so mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze entfernt, dass sich eine „Kratzer-förmige Wunde“ ergab. Mit stabil transfizierten MCF7-Zellen, die 24 h vor Beginn des *Scratch*-Assays in 6-Well-Kulturplatten ausgesät worden waren, wurde analog verfahren. Um die abgeschabten Zellreste zu entfernen, wurde das Medium abgesaugt und durch Vollmedium ersetzt, welches im weiteren Verlauf des Experimentes alle 24 h gewechselt wurde. Zum Zeitpunkt 0 sowie danach alle 24 h bis zum vollständigen Wundschluss wurden mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskopes (Nikon) unter Verwendung eines 10x-Objektives Bilder eines markierten Bereiches aufgenommen, die die spätere Quantifizierung ermöglichen sollten. Hierzu wurde die Breite der sich schließenden Lücke über die Zeit gemessen (ImageJ, NIH) und der prozentuale Wundschluss relativ zur Ausgangsgröße kalkuliert, was als Maß für die Migrationsfähigkeit der Zellen diente.

Ein *Scratch*-Assay unter Verwendung von PKC-Modulatoren wurde analog dazu durchgeführt. Allerdings wurden die Zellen nach EDI3-Knockdown zunächst für 24 h in serumfreiem Medium inkubiert, bevor der *Scratch* ausgeführt wurde. Dem verwendeten Medium wurden entsprechend 100 nM TPA (Sigma) bzw. 3 µM Gö6976 (Calbiochem) zugesetzt.

2.2.5.2 Migrations-Assay in einer modifizierten Boyden-Kammer

Nachdem in OVCAR3-Zellen die EDI3-Expression im Rahmen des bereits beschriebenen siRNA-Knockdowns herabgesetzt worden war, wurde ihre Migrationsfähigkeit mit Hilfe einer modifizierten Boyden-Kammer untersucht. Dazu wurden 200.000 Zellen in 250 µl serumfreiem Medium in die obere Kammer eines Membran-*Inserts* im 24-Well-Format ausgesät. 750 µl serumhaltiges Vollmedium wurde als Chemoattraktant in die untere Kammer gefüllt. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, so dass sie dem Serum-Gradienten folgend durch 8 µm große Poren in der Membran wandern konnten. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Zellen, die in der oberen Kammer des *Inserts* verblieben waren, vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt; die migrierten Zellen auf der

Unterseite des Inserts wurden mit einer Kristallviolett-Lösung für 20 min bei RT fixiert und gefärbt. Mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskopes (Nikon) wurden unter Verwendung eines 10x-Objektives jeweils fünf Bilder der gefärbten Zellen aufgenommen und die Anzahl migrierter Zellen quantifiziert (ImageJ, NIH).

2.2.6 Replattierungs-Experimente

Sämtliche Replattierungs-Experimente wurden auf einer Fibronectin-Matrix (FN) durchgeführt. Dazu wurden alle Materialien, auf denen Zellen ausgesät werden sollten (Kulturschalen, Kulturplatten, Deckgläser), über Nacht bei 4°C mit einer wässrigen Lösung beschichtet, die 20 µg/ml humanes Fibronectin (BD Biosciences) enthielt. Die beschichteten Zellkultur-Materialien wurden unmittelbar vor ihrer Benutzung für 1 h bei RT mit 1% (w/v) BSA in 1x PBS blockiert und anschließend einmal mit 1x PBS gewaschen.

Als Standardbehandlung bei allen Experimenten, die auf einer FN-Matrix durchgeführt wurden, wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in Suspensionsmedium (antibiotikafreies Medium mit nur 1% (v/v) FCS) resuspendiert und für 10 min mit 0,5 mg/ml Trypsin-Inhibitor bei RT inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 500 x g und RT pelletiert, in frischem Suspensionsmedium aufgenommen und für 1 h im Brutschrank bei 37°C rotiert. Nach der Rotation wurden die Zellen je nach weiterem Versuchsverlauf auf den entsprechenden FN-beschichteten Materialien replattiert. Sowohl die Verwendung des Mediums mit geringer Serum-Konzentration als auch die „Regenerationsphase“ bei 37°C waren essentiell für eine adäquate Adhäsion der Zellen auf der FN-Matrix.

2.2.6.1 Adhäsions-Assay

Für Adhäsions-Experimente wurden jeweils 50.000 Zellen in 100 µl Suspensionsmedium in 5 Wells einer FN-beschichteten 96-Well-Platte ausgesät. Als Negativkontrolle wurden auch Zellen in 3 BSA-beschichtete Wells ausgesät. Nach 5 bis 60 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die nicht-adhären Zellen mit 1x PBS gewaschen und die adhären Zellen mit einer Kristallviolett-Lösung für 20 min bei RT fixiert und gefärbt. Nach der Färbung wurden Bilder der Zellen mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskopes (Nikon) unter Verwendung eines 10x-Objektives aufgenommen. Die Quantifizierung der Zelladhäsion erfolgte anhand des freigesetzten Kristallvioletts nach Entfärbung mit 0,2% Triton X-100 durch

Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (TECAN).

2.2.6.2 Spreading-Assay

Zur Analyse der Zellausbreitung auf einem Substrat wurden jeweils 150.000 Zellen in 400 µl Suspensionsmedium im Triplikat in einer FN-beschichteten 24-Well-Platte ausgesät. Nach 30 bzw. 60 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die nicht-adhärenenten Zellen mit 1x PBS gewaschen und die adhärenenten Zellen mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung für 20 min bei RT fixiert. Zur Quantifizierung des *Spreadings* wurden mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskopes (Nikon) unter Verwendung eines 20x-Objektives pro Well drei Bilder der fixierten und ungefärbten Zellen aufgenommen. Pro Bedingung und Experiment wurde anhand dieser Bilder manuell die Größe von je 100 zufällig ausgewählten Zellen mit Hilfe der Software ImageJ (NIH) bestimmt. Die mittlere Zellgröße wurde aus vier unabhängigen Experimenten, also insgesamt durch die Messung von 400 Zellen, kalkuliert.

2.2.6.3 Phalloidinfärbung

Um das Aktin-Zytoskelett während des *Spreadings* zu visualisieren, wurden die Zellen nach Replattierung auf FN-beschichteten Deckgläsern im 24-Well-Format (vgl. 2.2.6.2) mit Phalloidin gefärbt. Phalloidin gehört zu den Phallotoxinen, einer Familie bizyklischer Heptapeptide aus Knollenblätterpilzen, und bildet Komplexe mit F-Aktin aus [Wulf *et al.*, 1979]. Bei dieser Art der Färbung wurden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten bei 37°C die nicht-adhärenenten Zellen mit 1x PBS gewaschen sowie die adhärenenten Zellen für 20 min in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und danach dreimal mit 1x PBS gewaschen. Bis zum Beginn der Färbung konnten die fixierten Zellen für bis zu 10 Tage in 1x PBS bei 4°C gelagert werden. Nachdem die Zellen 10 min mit einer 50 mM Ammoniumchlorid-Lösung gequenchet und 10 min in 0,5% (v/v) Triton X-100 permeabilisiert worden waren, wurde zur Visualisierung der Zellkerne für 15 min bei RT eine DAPI-Färbung (1:10.000 in 1x PBS; Invitrogen) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 45 min bei RT mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin (1:250 in 1x PBS; Invitrogen) gefärbt (MCF7- und OVCAR3-Zellen nach EDI3-Knockdown mit Phalloidin-Alexa488 und EDI3-überexprimierende MCF7-Zellen mit Rhodamin-Phalloidin). Nach Dehydrierung mit Hilfe eines Ethanol-Gradienten wurden die Deckgläser unter

Verwendung von Entellan als Eindeck-Medium auf Objektträger übertragen und die Zellfärbung unter einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (Olympus) ausgewertet. Zur Aufnahme von Übersichtsbildern wurde ein 20x-Objektiv verwendet, Einzelzell-Bilder wurden mit einem 60x-Objektiv aufgenommen. Zur genaueren Dokumentation der dreidimensionalen Struktur des Aktin-Zytoskeletts wurden zusätzlich sogenannte *z-Stacks* durchgeführt; d. h. die abzubildende Zelle wurde entlang der z-Achse in 15 bis 20 übereinanderliegende Schichten mit einem Abstand von jeweils 0,5 µm zerlegt, so dass die Aufnahmen dieser einzelnen Ebenen zusammengesetzt eine dreidimensionale Rekonstruktion der Zelle wiedergaben.

2.2.6.4 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Ausbildung Fokaler Adhäsionen während des *Spreadings* zu visualisieren, wurde nach Replattierung auf FN-beschichteten Deckgläsern im 24-Well-Format (vgl. 2.2.6.2) mittels Immunfluoreszenzfärbung die Lokalisation von Paxillin untersucht. Hierzu wurden die adhärenenten Zellen analog zur Phalloidinfärbung (vgl. 2.2.6.3) nach einer Inkubationszeit von 30 bzw. 60 min bei 37°C fixiert und permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen zu Beginn der Färbung für 90 min mit 3% (w/v) BSA und 1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1x PBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-Paxillin (aus Maus, BD Biosciences, Verdünnung 1:100) in 0,3% (w/v) BSA und 0,1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS für 2 h bei RT. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1x PBS erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper (anti-Maus aus Affe, gekoppelt an Alexa Fluor 647, Invitrogen, Verdünnung 1:200) in 0,3% (w/v) BSA und 0,1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS für 45 min bei RT. Zur Visualisierung der Zellkerne sowie des Aktin-Zytoskeletts wurden die bereits beschriebenen Schritte der DAPI- und Phalloidin-Färbung (vgl. 2.2.6.3) ergänzt. Nach entsprechender Dehydrierung wurden die Deckgläser auf Objektträger übertragen und mit Hilfe eines konfokalen Laserscan-Mikroskopes (Olympus) und einem 60x-Objektiv Einzelzell-Bilder aufgenommen.

2.2.6.5 GTPase-Aktivitätsassay

Die Aktivität der beiden Rho-GTPasen Rac1 und RhoA im Rahmen des *Spreadings* wurde mit Hilfe eines *Pulldown*-Assays (GTPase-Aktivitätsassay Combo-Kit, Cytoskeleton) untersucht, bei dem man die hohe Affinität zwischen aktiver GTP-

beladener Rho-GTPase und an *Beads* immobilisierten Effektor-Bindedomänen ausnutzt. Hierzu wurden jeweils 4 Mio. Zellen in 7,5 ml Suspensionsmedium in mehreren FN-beschichteten Kulturschalen (10 cm Durchmesser) ausgesät. Nach 30 bzw. 60 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die nicht-adhärenen Zellen mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und die adhärenen Zellen in jeweils 500 µl eiskaltem Lysepuffer abgeschabt. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurden die Homogenisate durch Zentrifugation für 2 min bei 13.000 x g und RT geklärt. Der Überstand wurde, nachdem ein Aliquot für die spätere Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen worden war, sofort in Flüssigstickstoff weggefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Diese Schritte zur Gewinnung der Gesamt-Zelllysate mussten zügig erfolgen, da GTP sehr Hydrolyseanfällig ist.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels BCA-Assay (vgl. 2.2.3.2) wurden die Proben in einem Wasserbad bei RT aufgetaut und so mit eiskaltem Lysepuffer verdünnt, dass jeweils 800 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 800 µl vorlagen. Zur Durchführung des eigentlichen *Pulldown*-Assays wurden die vorbereiteten Proteinproben für 1 h bei 4°C unter ständiger Rotation mit den entsprechenden *Beads* inkubiert. Zur Analyse der Rac1-Aktivität wurden jeweils 20 µg *Beads* verwendet, an denen die Proteinbindedomäne des Rac1-Effektors PAK immobilisiert war; zur Analyse der RhoA-Aktivität wurden stattdessen 80 µg *Beads* verwendet, an denen die RhoA-Bindedomäne von Rhotekin immobilisiert war. Nach dieser Inkubation wurden die *Beads*, die nun spezifisch an die GTP-beladene aktive Form der Rho-GTPasen gebunden waren, durch eine Zentrifugation für 1 min bei 5.000 x g und 4°C pelletiert. Nach Abtrennung des Überstandes wurden die *Beads* in 300 µl Waschpuffer aufgenommen und erneut durch Zentrifugation für 3 min bei 5.000 x g und 4°C pelletiert. Nachdem der Überstand vollständig abgenommen worden war, wurden die *Beads* in 35 µl 2x Ladepuffer resuspendiert und zur vollständigen Elution der gebundenen Rho-GTPasen für 7 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die *Beads* für 2 min bei 5.000 x g und RT pelletiert und die Proben zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE (vgl. 2.2.3.5) und Immunoblotting (vgl. 2.2.3.6) auf Gradientengele aufgetragen. Zur Kontrolle der Totalmengen der Rho-GTPasen in den verwendeten Proben wurden auch jeweils 25 µg des Gesamt-Zelllysates vor Affinitätsaufreinigung aufgetragen.

2.2.7 NMR-Messungen

2.2.7.1 Untersuchung der GPC-Hydrolyse mittels ³¹P-NMR

Die ³¹P-NMR-Messungen zur Untersuchung der EDI3-vermittelten GPC-Hydrolyse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Roland Hergenröder und Dr. Jörg Lambert am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften in Dortmund durchgeführt. Hierzu wurden 20 µg rekombinantes Protein oder 250 µg NIH3T3-EDI3-Zellysat in einem Gesamtvolumen von 500 µl Reaktionspuffer (25 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM MgCl₂) mit 5 mM GPC bei 37°C inkubiert. Diese Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Wegfrieren der Proben in Flüssigstickstoff gestoppt und die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Für die ³¹P-NMR-Messung wurden die Proben in einem 5 mm-NMR-Röhrchen mit 100 µl D₂O versetzt, was eine Stabilisierung des Feld/Frequenz-Verhältnisses ermöglicht und so einen Drift des NMR-Signals während der laufenden Messung verhindert. Die Referenzierung der chemischen Verschiebung erfolgte extern, indem vor der eigentlichen Messung ein Standard (85% (v/v) H₃PO₄) gemessen und deren ³¹P-NMR-Signal auf 0 ppm gesetzt wurde. Unter denselben Bedingungen wurden dann die vorbereiteten Proben mit Hilfe eines 500-MHz-NMR-Spektrometers (Bruker) bei einer Messfrequenz von 202,5 MHz analysiert. Die Messungen erfolgten bei 7°C, um eine mögliche thermische Dekomposition weitgehend auszuschließen.

2.2.7.2 Bestimmung intrazellulärer Cholin-Metabolit-Konzentrationen

2.2.7.2.1 Konzentrationsbestimmung von GPC und PC mittels ¹H-NMR

Die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerophosphocholin und Phosphocholin in MCF7- und AN3CA-Zellen nach EDI3-Knockdown wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Hector Keun am *Imperial College* in London durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst in eiskaltem Methanol abgeschabt und für 5 min bei 500 x g und 4°C pelletiert. Nachdem überschüssiges Methanol abgenommen worden war, wurden die Proben vollständig bei RT getrocknet und bei -80°C gelagert bzw. auf Trockeneis verschickt. Zur Anreicherung der hydrophilen Metabolite wurde mit Hilfe der Methanol-Chloroform-Methode eine Zweiphasentrennung durchgeführt und die wässrige Phase extrahiert und getrocknet [Blygh & Dyer, 1959]. Die wasserlöslichen Metabolite wurden in 600 µl eines

Phosphatpuffers (0,2 M Na₂HPO₄, 0.043 M NaH₂PO₄, 100 mM TSP und 3 mM NaN₃ in D₂O) aufgenommen und mittels ¹H-NMR-Messungen an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer (Bruker) analysiert. Deuteriertes Trimethylsilylpropionat (TSP) diente hierbei als interner Standard zur Referenzierung der chemischen Verschiebung. Diese NMR-Messungen wurden nur an jeweils zwei unabhängigen biologischen Proben durchgeführt.

2.2.7.2.2 Bestimmung intrazellulärer Cholin-Metabolite mittels ¹H-NMR/³¹P-NMR

Die Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerophosphocholin, Phosphocholin, Cholin und Glycerin-3-phosphat in MCF7- und OVCAR3-Zellen nach EDI3-Knockdown wurde in Kooperation mit Dr. Roland Hergenröder und Dr. Jörg Lambert am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften in Dortmund durchgeführt. Hierzu wurden Gesamt-Zelllysate (vgl. 2.2.3.1.1) mit einer hohen Proteinkonzentration von 3 mg in 1 ml RIPA-Puffer hergestellt und ohne weitere Aufarbeitung mit Hilfe eines 600-MHz-NMR-Spektrometers (Bruker) analysiert. Jeweils 500 µl der Probe wurden, wie bereits beschrieben, mit 100 µl D₂O und 50 mM TSP versetzt, um sowohl ¹H- als auch ³¹P-NMR-Messungen durchzuführen. Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Signale zu den einzelnen Metabolit-Strukturen erfolgte anhand von Literaturdaten. Aufgrund des internen Standards erfolgte die Quantifizierung, soweit möglich, anhand der ¹H-NMR-Spektren und weitergehend anhand der relativen Integrale der Signale im ³¹P-NMR-Spektrum.

2.2.8 Statistische Datenanalyse

Wenn nicht explizit angegeben, wurden alle Experimente mindestens mit drei unabhängigen biologischen Proben durchgeführt. Für statistische Vergleiche zwischen Kontroll-Zellen und behandelten Proben bzw. Zellen mit modifizierter EDI3-Expression wurde der gepaarte Student-t-Test durchgeführt. Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Alle numerischen Daten werden als Mittelwerte und Standardabweichung (SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 EDI3 ist eine GPC-hydrolysierende Glycerophosphodiesterase

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie war anzunehmen, dass EDI3 zu der Familie der Glycerophosphodiesterasen (GDEs) zählt. Für die bereits näher charakterisierten Mitglieder der GDE-Familie konnte entweder eine bevorzugte Enzymaktivität gegenüber Glycerophosphoinositol oder Glycerophosphocholin (GPC) beschrieben werden. Da EDI3 im Gegensatz zu allen anderen GDEs keine Transmembran-Domänen besitzt, sollte insbesondere die potenzielle GPC-hydrolysierende Aktivität (Abb. 3.1) dieses zytosolischen Proteins untersucht werden.

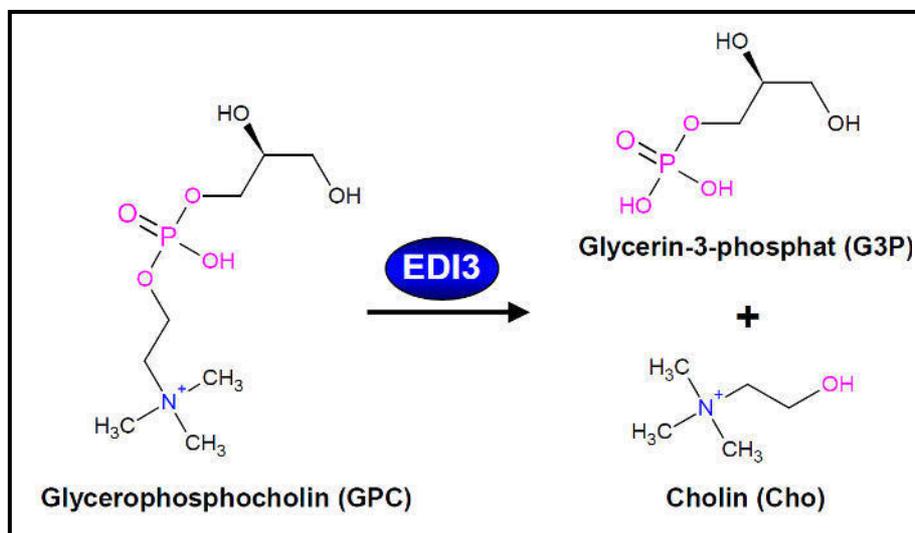


Abbildung 3.1: Putative Enzymreaktion von EDI3. EDI3 hydrolysiert Glycerophosphocholin (GPC) und generiert die beiden Produkte Glycerin-3-phosphat (G3P) und Cholin (Cho).

3.1.1 Nachweis der EDI3-vermittelten G3P-Produktion durch ³¹P-NMR

Um die spezifische Enzymaktivität von EDI3 *in vitro* näher zu untersuchen, wurde rekombinantes EDI3 (AMS Bio) mit GPC inkubiert und die Hydrolyse dieses potenziellen Substrates mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie verfolgt (Abb. 3.2A). Bereits nach wenigen Minuten konnte das GPC-Signal bei einer chemischen Verschiebung von etwa 0,6 ppm nicht mehr detektiert werden. Stattdessen wurde ein Signal bei 4,5 ppm detektiert, das in der Kontrolle ohne EDI3 nicht nachweisbar war und einem der beiden möglichen Reaktionsprodukte, G3P, zugeordnet werden konnte. Dieselbe Reaktion konnte auch durch Inkubation von Lysaten stabil transfizierter NIH3T3-EDI3-Zellen mit GPC bestätigt werden (Abb. 3.2B).

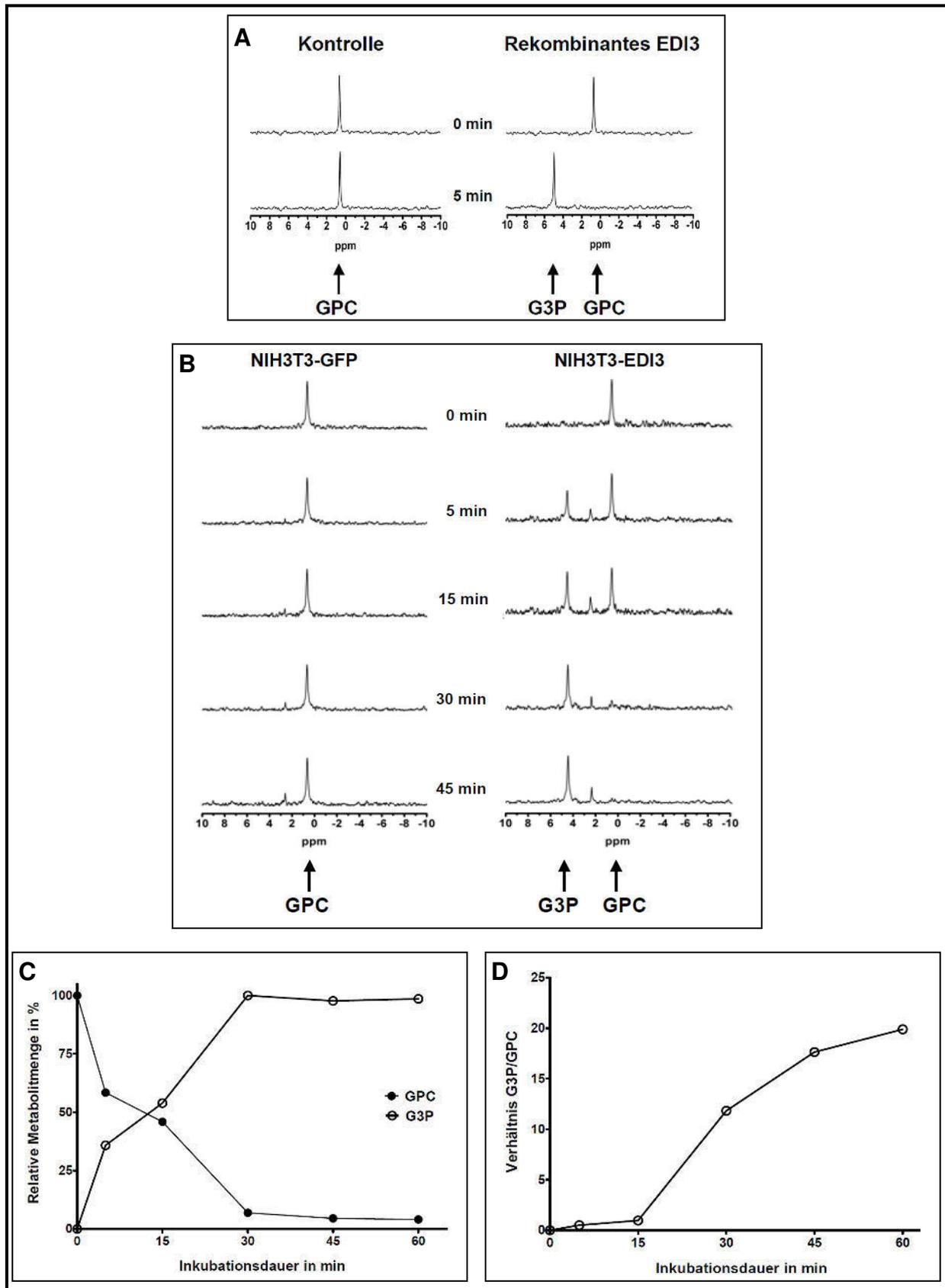


Abbildung 3.2: EDI3 hydrolysiert GPC unter Bildung von G3P. Die Inkubation von **A)** rekombinantem EDI3 oder **B)** EDI3-überexprimierenden NIH3T3-Zelllysaten mit dem Substrat GPC führt zu einer zeitabhängigen GPC-Hydrolyse sowie einer korrespondierenden G3P-Produktion (**C**), so dass das Verhältnis von G3P zu GPC in den EDI3-überexprimierenden Proben insgesamt zunimmt (**D**). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse einer repräsentativen ^{31}P -NMR-Messung.

In den Homogenaten mit starker EDI3-Überexpression kam es zu einer zeitabhängigen Abnahme des GPC-Signals sowie zu einer entsprechenden Zunahme des G3P-Signals (Abb. 3.2C, D), während in Vektor-transfizierten Kontrollen auch nach längerer Inkubationsdauer nur eine langsame, spontane Hydrolyse auftrat (Signal von anorganischem Phosphat bei etwa 2,4 ppm).

3.1.2 Nachweis der Cholin-Produktion im Rahmen der EDI3-vermittelten GPC-Hydrolyse mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten spektrophotometrischen Assays

Um auch die Präsenz des zweiten Reaktionsproduktes der GPC-Hydrolyse nachzuweisen, wurde ein Enzym-gekoppelter spektrophotometrischer Assay etabliert, der es ermöglicht, *in vitro* die EDI3-vermittelte Cholin-Produktion ausgehend von GPC durch Fluoreszenz-Messungen zu quantifizieren.

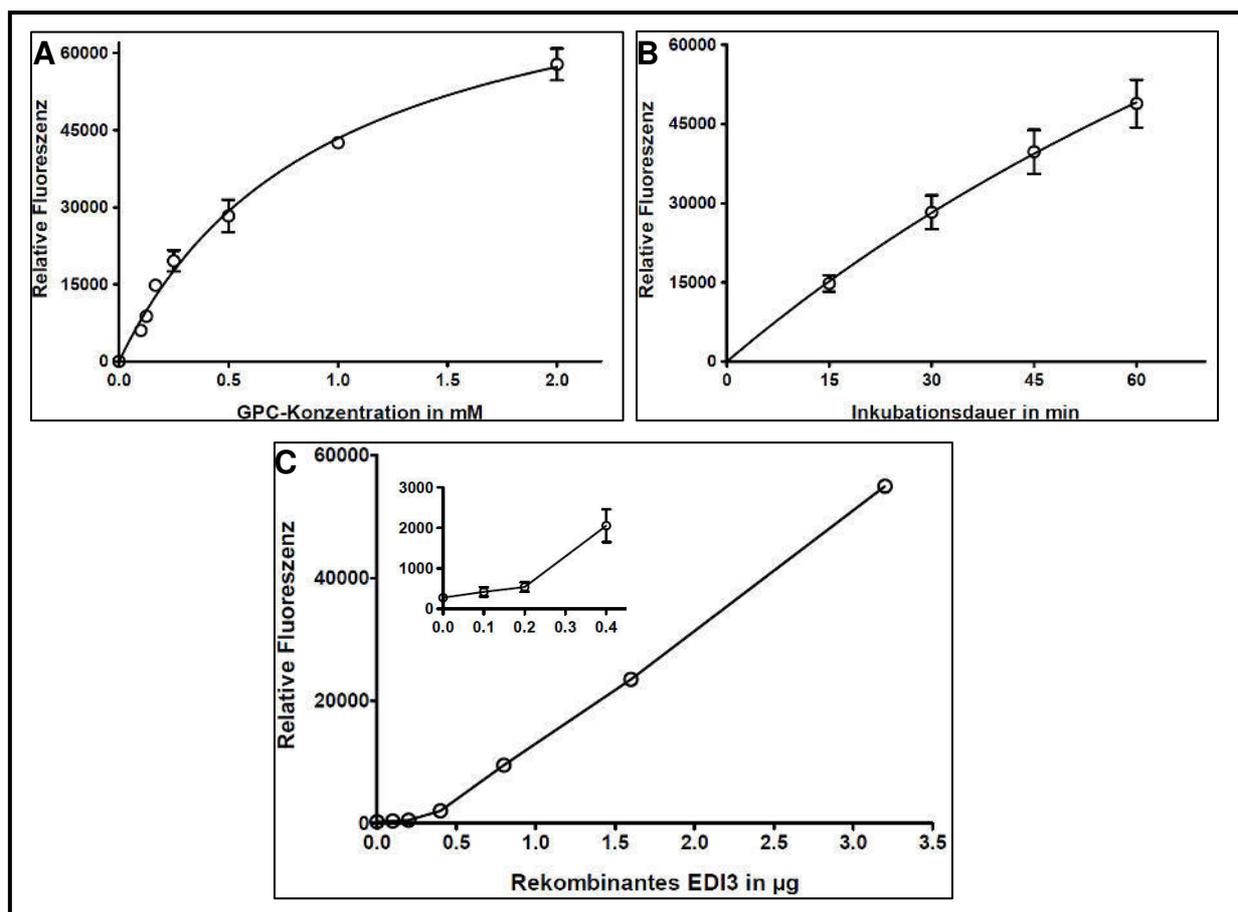


Abbildung 3.3: EDI3 hydrolysiert GPC unter Bildung von Cholin. A) Die Inkubation von 1 µg rekombinanter EDI3 für 30 min bei 37°C mit steigenden Substratkonzentrationen führt zu einer Zunahme der gemessenen Fluoreszenzwerte bis zum Erreichen der oberen Detektionsgrenze. Die Fluoreszenz und somit die Cholin-Produktion steigt bei einer Substratkonzentration von 0,5 mM GPC linear mit der Inkubationsdauer (**B**) sowie der Enzymmenge (**C**) an. Dargestellt sind Mittelwerte und SD eines Experimentes durchgeführt mit drei technischen Replikaten.

Erste Versuche mit rekombinantem EDI3 (AMS Bio) dienten dazu, die Reaktionsbedingungen dieses EDI3-Aktivitätsassays wie z. B. Pufferkomposition, Enzym- und Substratmenge sowie die Inkubationsdauer der Reaktionspartner zu optimieren. Sowohl steigende Substratkonzentrationen (Abb. 3.3A) als auch längere Inkubationszeiten (Abb. 3.3B) und zunehmende Enzymmengen (Abb. 3.3C) führten erwartungsgemäß zu einem Anstieg der gemessenen Fluoreszenzwerte. Da der Assay später routinemäßig dazu dienen sollte, Unterschiede der EDI3-Aktivitäten zwischen Zelllysaten mit unveränderter, stark erhöhter sowie reduzierter EDI3-Expression abzubilden, wurde verstärkt darauf geachtet, dass die gewählten Reaktionsbedingungen das Abdecken eines weiten Messbereiches ermöglichten. Auch bei Verwendung EDI3-überexprimierender NIH3T3-Zelllysate war so eine konzentrations- sowie zeitabhängige Cholin-Produktion ausgehend von dem Substrat GPC zu detektieren, die in Kontroll-Lysaten ohne EDI3 ausblieb (Abb. 3.4).

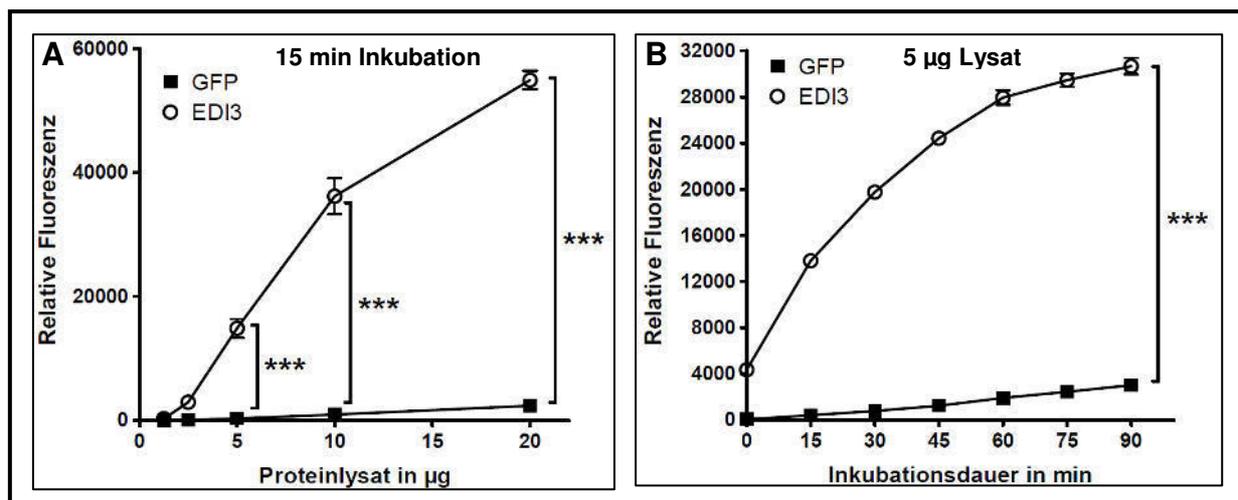


Abbildung 3.4: Konzentrations- und zeitabhängige EDI3-Aktivität in NIH3T3-Zelllysaten. Die EDI3-Überexpression in NIH3T3-EDI3-Zelllysaten führt zu einer konzentrations- (A) sowie zeitabhängigen (B) Cholin-Produktion. In Lysaten der GFP-Kontrolle kann dagegen auch bei längerer Inkubationszeit nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz detektiert werden. Die GPC-hydrolysierende Enzymaktivität in den EDI3-überexprimierenden Zelllysaten ist somit signifikant erhöht. Dargestellt sind die Mittelwerte und SD von jeweils drei unabhängigen Experimenten. *** indiziert $p < 0,001$.

Mit Hilfe zweier unabhängiger Techniken konnte also eindeutig geklärt werden, dass EDI3 GPC hydrolysiert und so die mittels ^{31}P -NMR bzw. per Fluoreszenz-basierendem Aktivitätsassay detektierbaren Reaktionsprodukte G3P und Cholin bildet.

3.2 Modulation der EDI3-Expression in Tumorzellen

Nachdem die Enzymaktivität von EDI3 als GPC-hydrolysierende GDE *in vitro* aufgeklärt worden war, sollte untersucht werden, ob EDI3 auch in humanen Tumorzelllinien einen Einfluss auf die Level verschiedener Cholin-Metabolite ausüben kann. Dafür musste zunächst eine reproduzierbare Modulation der EDI3-Expression erzielt werden.

3.2.1 Transiente Reduktion der EDI3-Expression mittels RNA-Interferenz

Die klinische Relevanz von EDI3 als Metastasen-förderndem Protein war sowohl in Endometrium- als auch in Ovarialkarzinomen gezeigt worden [Stewart *et al.*, 2012]. Für die weiteren Untersuchungen von EDI3 wurden deshalb neben der gut charakterisierten und vielfältig eingesetzten Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 auch die Endometriumkarzinom-Zelllinie AN3CA sowie die Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR3 ausgewählt. Durch die Transfektion von siRNAs (*small interfering RNAs*) sollte in diesen drei Tumorzelllinien eine transiente Reduktion der EDI3-Expression, ein sogenannter EDI3-Knockdown, erreicht werden.

Dazu wurden die Zellen entweder für 72 h mit einer von zwei verschiedenen EDI3-siRNAs behandelt, die spezifisch für eine Herunterregulation der *EDI3*-Genexpression sorgten, oder sie wurden stattdessen mit einer Kontroll-siRNA behandelt, die keine spezielle Zielstruktur hat und somit nicht die EDI3-Expression verändert. Die Konzentration der eingesetzten siRNA wurde so optimiert, dass robust ein maximaler Knockdown in Abwesenheit morphologischer Veränderungen der Zellen erzielt werden konnte (Abb. 3.5/6/7 A). Die Effizienz des Knockdowns wurde routinemäßig durch eine Bestimmung der *EDI3*-Expression auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR kontrolliert (Abb. 3.5/6/7 B). Für weitere Experimente wurden die siRNA-behandelten Zellen nur dann verwendet, wenn im Falle von MCF7-/AN3CA-Zellen eine Reduktion der *EDI3*-Genexpression von mindestens 80% bzw. im Falle der OVCAR3-Zellen von mindestens 60% nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurde der EDI3-Knockdown bei Bedarf auch auf Protein-Ebene mit Hilfe von Western Blot-Analysen (Abb. 3.5/6/7 C) und dem Fluoreszenz-basierten EDI3-Aktivitätsassay (Abb. 3.5/6/7 D) überprüft.

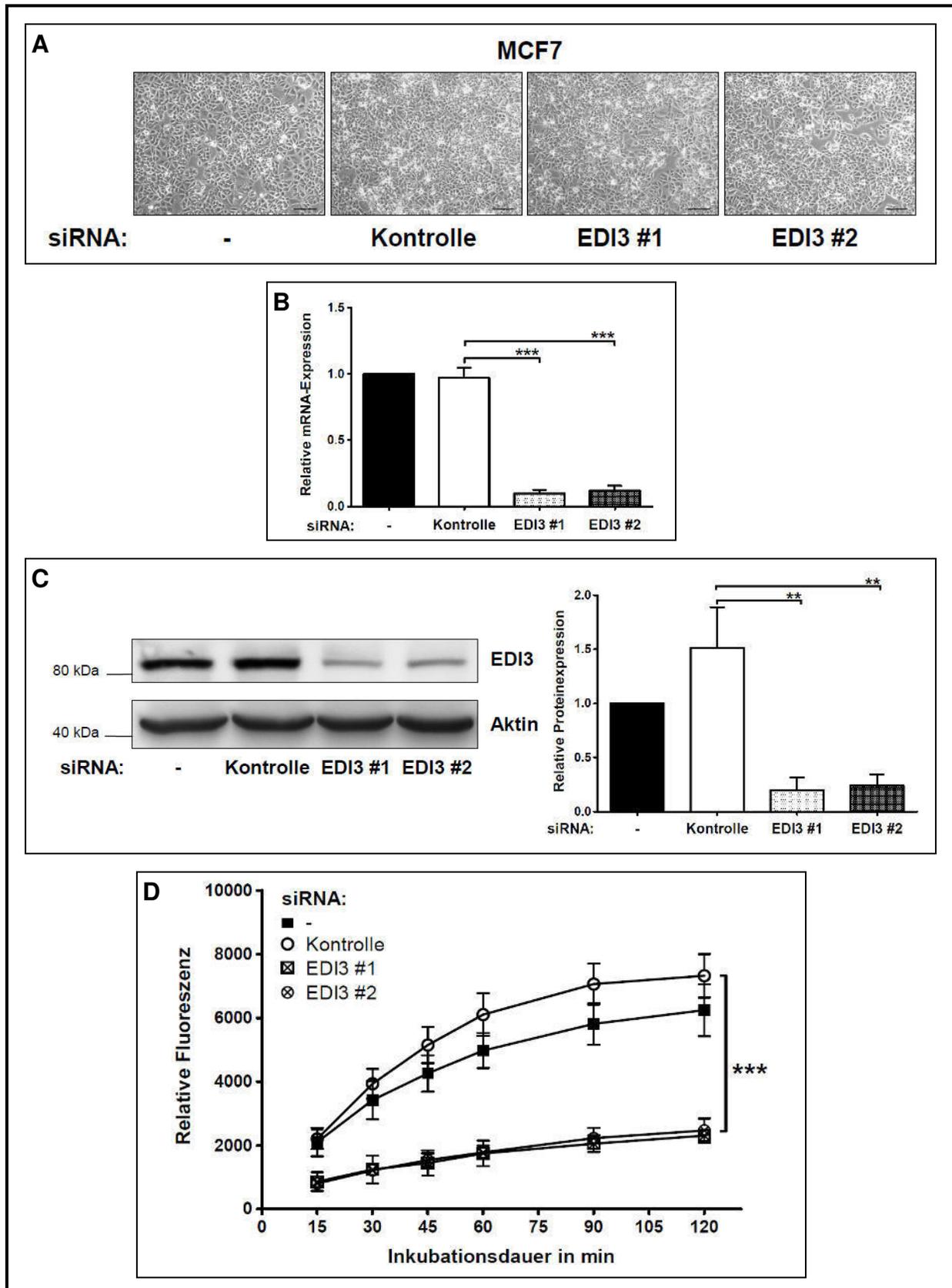


Abbildung 3.5: EDI3-Knockdown in MCF7-Zellen. Die Effizienz des EDI3-Knockdowns nach 72 h siRNA-Behandlung wird bewertet anhand von **A**) der Abwesenheit morphologischer Veränderungen sowie der Reduktion der **B**) RNA-Expression, **C**) Proteinexpression und **D**) Enzymaktivität. Gezeigt werden repräsentative Bilder der Zellen (Messbalken: 100 μ m) bzw. der Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). Die Quantifizierungen stellen Mittelwerte und SD aus fünf (B) bzw. drei (C, D) unabhängigen Experimenten dar. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$.

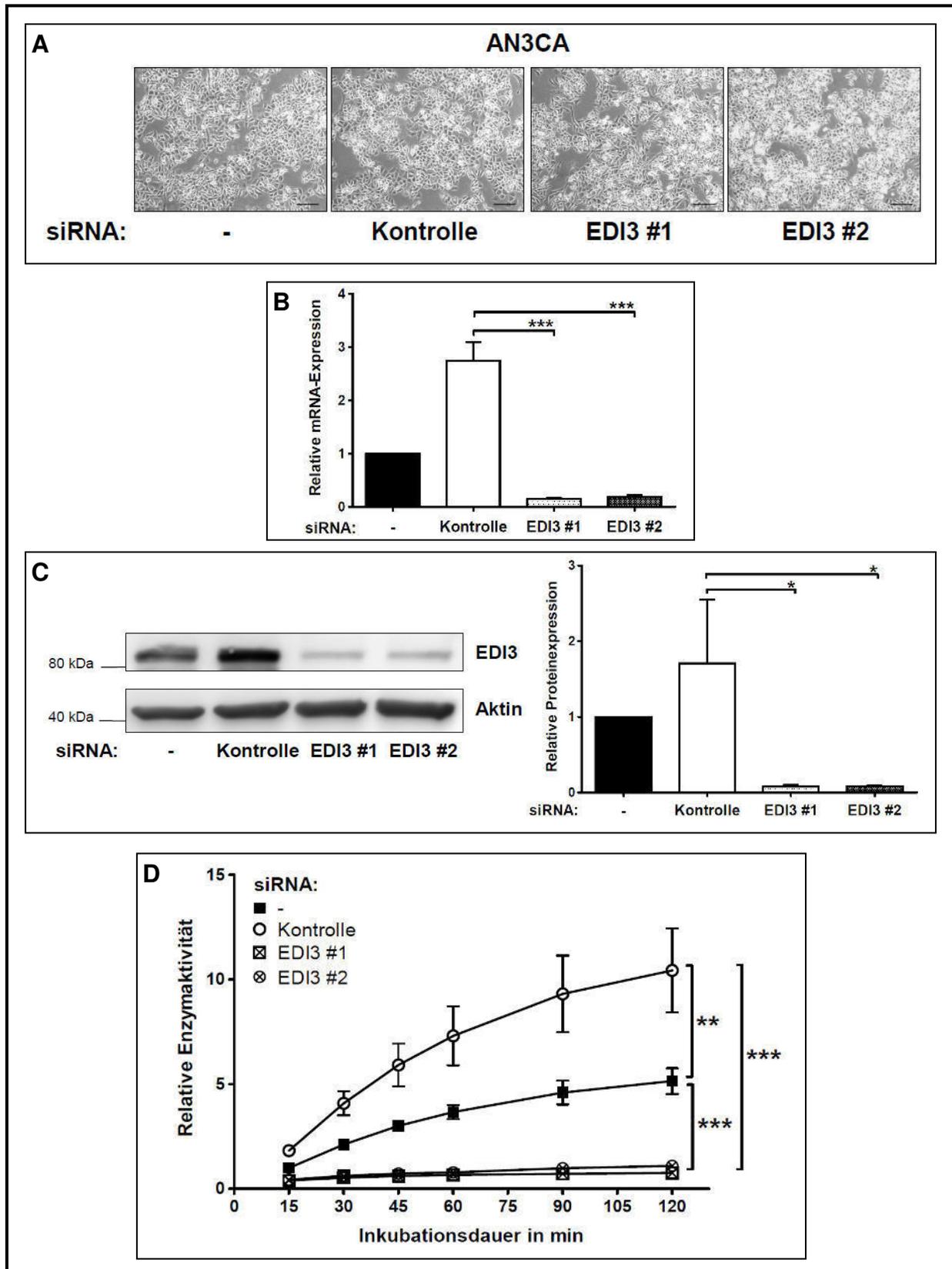


Abbildung 3.6: EDI3-Knockdown in AN3CA-Zellen. Die Effizienz des EDI3-Knockdowns nach 72 h siRNA-Behandlung wird bewertet anhand von **A**) der Abwesenheit morphologischer Veränderungen sowie der Reduktion der **B**) RNA-Expression, **C**) Proteinexpression und **D**) Enzymaktivität. Gezeigt werden repräsentative Bilder der Zellen (Messbalken: 100 μ m) bzw. der Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). Die Quantifizierungen stellen Mittelwerte und SD aus fünf (B) bzw. drei (C, D) unabhängigen Experimenten dar. * indiziert $p < 0,05$. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$.

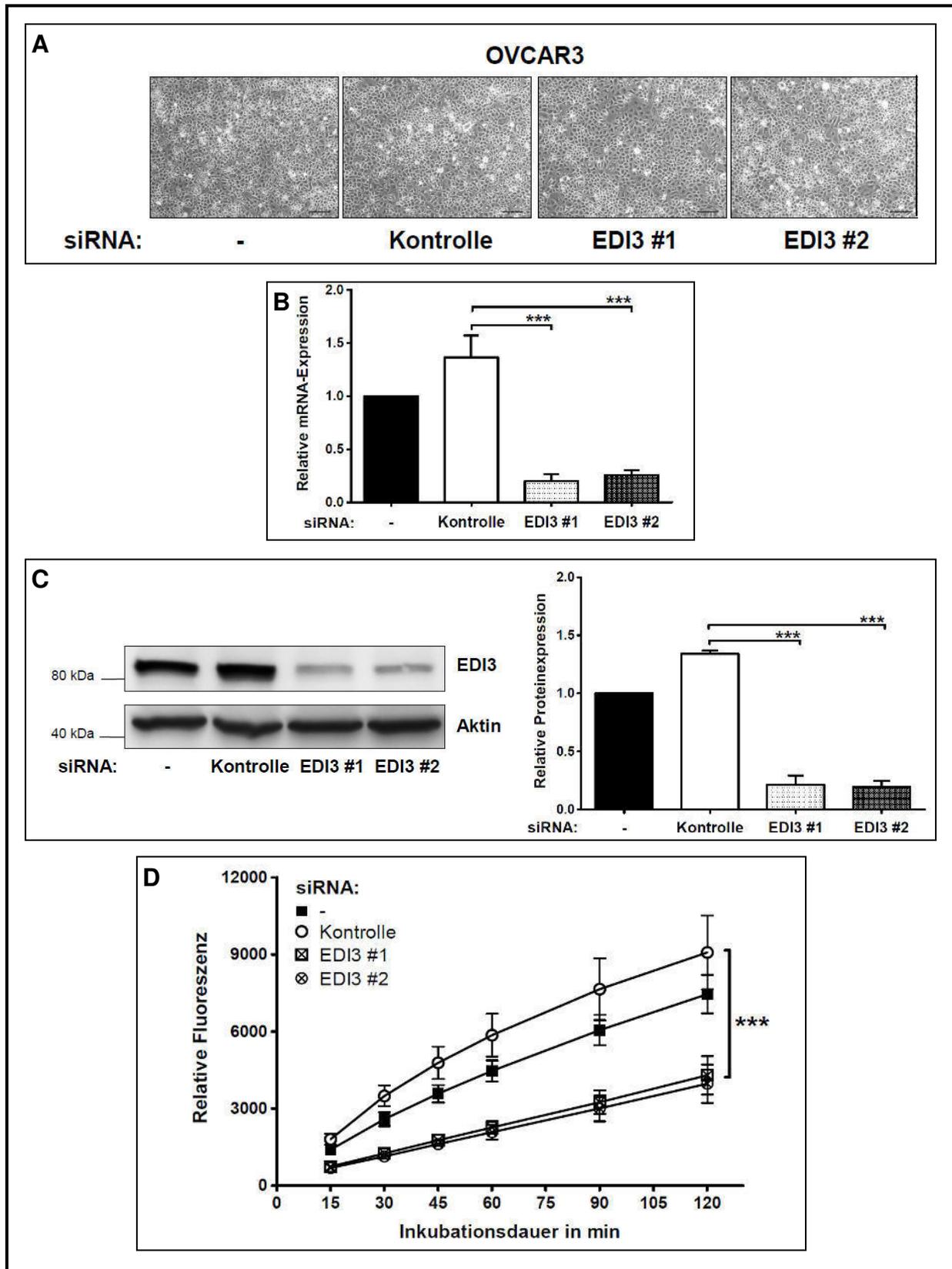


Abbildung 3.7: EDI3-Knockdown in OVCAR3-Zellen. Die Effizienz des EDI3-Knockdowns nach 72 h siRNA-Behandlung wird bewertet anhand von **A)** der Abwesenheit morphologischer Veränderungen sowie der Reduktion der **B)** RNA-Expression, **C)** Proteinexpression und **D)** Enzymaktivität. Gezeigt werden repräsentative Bilder der Zellen (Messbalken: 100 μ m) bzw. der Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). Die Quantifizierungen stellen Mittelwerte und SD aus fünf (B) bzw. drei (C, D) unabhängigen Experimenten dar. *** indiziert $p < 0,001$.

3.2.2 Stabile Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen

Um später die Möglichkeit zu haben die Funktion von EDI3 in Tumorzellen umfassender zu beleuchten, wurde neben einer Reduktion der EDI3-Expression auch ein Zellmodell mit moderater EDI3-Überexpression angestrebt. Hierzu wurden MCF7-Zellen stabil transfiziert (AMS Bio) und die generierten MCF7-GFP-EDI3-Klone wurden hinsichtlich ihrer Morphologie und dem Level der EDI3-Überexpression verglichen. Zur Verwendung in weiteren Experimenten wurde ein Klon ausgewählt, der EDI3 auf RNA- und Protein-Ebene etwa zehnfach überexprimiert, aber keinerlei morphologische Unterschiede zu MCF7-Zellen aufweist, die mit einem entsprechenden Kontrollvektor ohne EDI3 transfiziert wurden (Abb. 3.8).

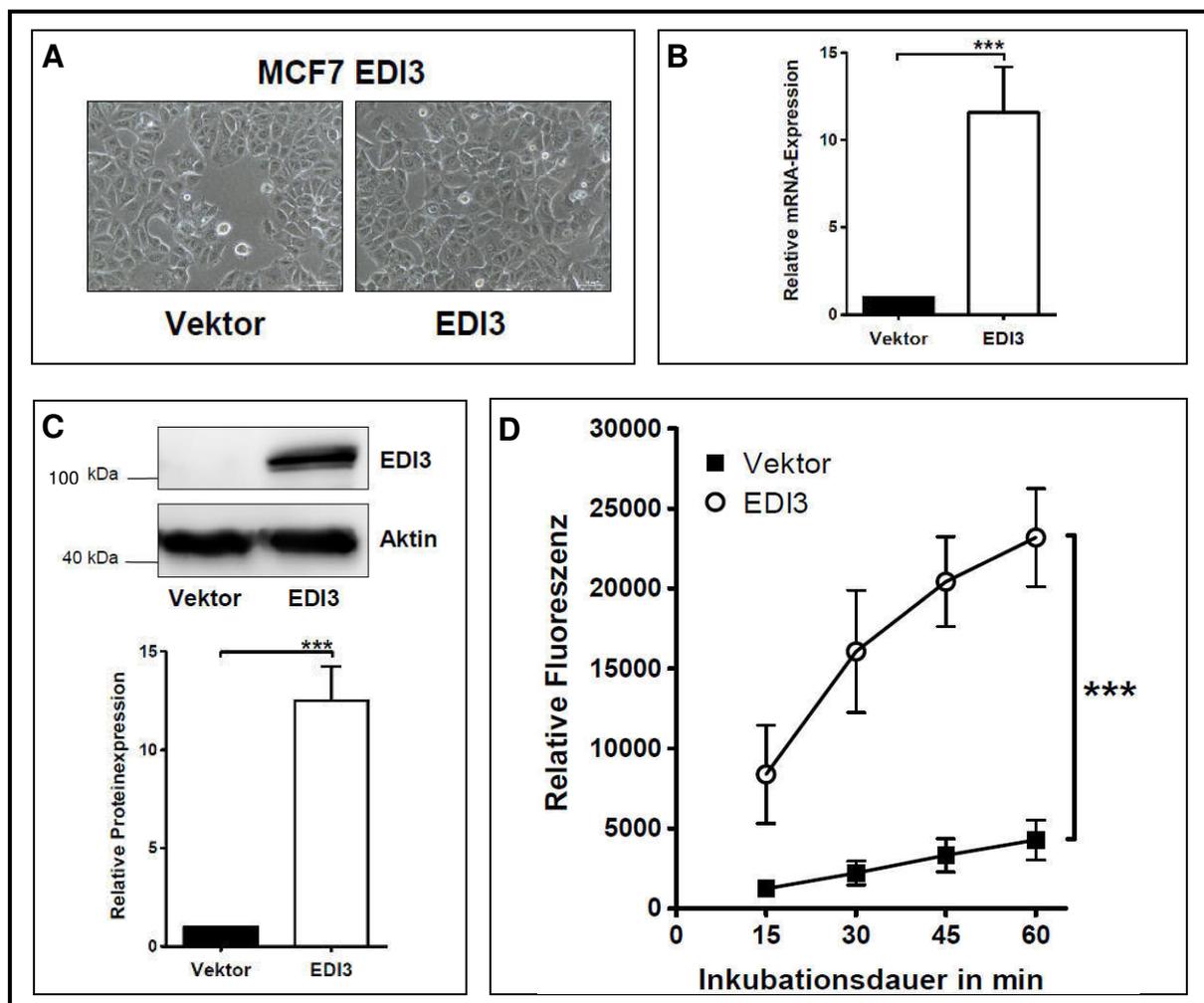


Abbildung 3.8: EDI3-Überexpression in MCF7-Zellen. Der Erfolg der stabilen Transfektion wird bewertet anhand von **A**) der Abwesenheit morphologischer Veränderungen sowie der moderaten Steigerung der **B**) RNA-Expression, **C**) Proteinexpression und **D**) Enzymaktivität von EDI3. Gezeigt werden repräsentative Bilder der Zellen (Messbalken: 50 μ m) bzw. der Western Blot-Analyse (die endogene EDI3-Bande bei 80 kDa ist nicht abgebildet; Aktin dient als Ladungskontrolle). Die Quantifizierungen stellen Mittelwerte und SD aus fünf (B) bzw. drei (C, D) unabhängigen Experimenten dar. *** indiziert $p < 0,001$.

3.2.3 Die Modulation von EDI3 hat keinen Einfluss auf die GDE2-Expression

Um sicherzugehen, dass später identifizierte Unterschiede zwischen Knockdown bzw. Überexpression und Kontroll-Zellen ausschließlich auf EDI3 und nicht etwa auf die verwandte Glycerophosphodiesterase GDE2, die als einziges weiteres Mitglied der GDE-Familie die Hydrolyse von GPC zu G3P und Cholin katalysieren kann, zurückzuführen sind, wurde nach Modulation der EDI3-Expression mittels RT-qPCR auch die RNA-Expression von *GDE2* in den verschiedenen Tumorzelllinien überprüft (Abb. 3.9). Diese Messungen gaben weder Hinweise darauf, dass die verwendeten siRNAs einen unspezifischen Effekt auf *GDE2* haben könnten, noch war in den EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen eine signifikant erhöhte *GDE2*-Genexpression zu detektieren. Außerdem kam es in keinem der vier Zellmodelle zu einer Kompensation der erniedrigten bzw. erhöhten EDI3-Expression durch *GDE2*.

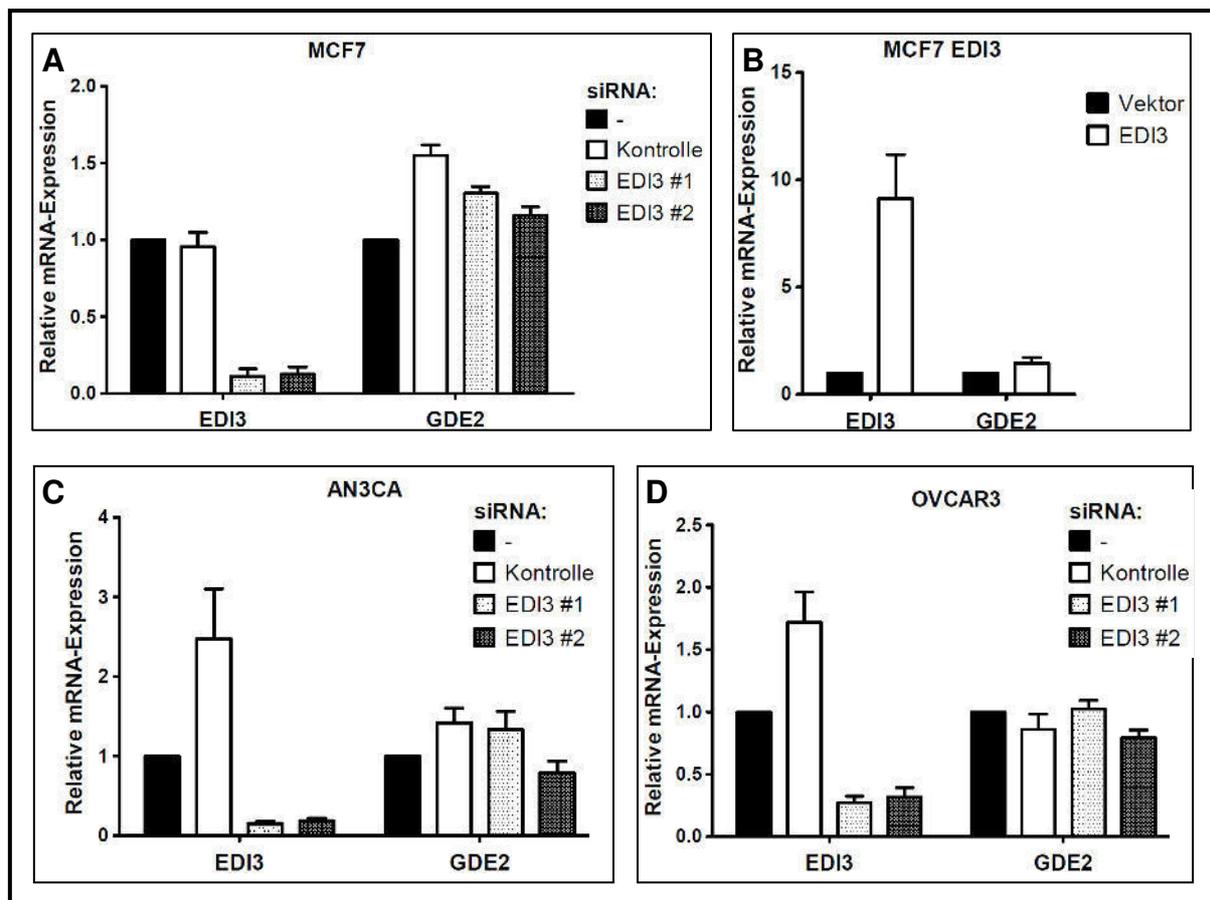


Abbildung 3.9: Veränderungen der EDI3-Level beeinflussen nicht die Expression von GDE2. Der Knockdown von EDI3 führt weder in **A)** MCF7-Zellen, noch in **C)** AN3CA-Zellen oder **D)** OVCAR3-Zellen zu einer Reduktion oder einem kompensatorischen Anstieg der *GDE2*-Genexpression. Auch die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen **(B)** induziert keine signifikant erhöhte *GDE2*-Genexpression oder bedingt einen kompensatorischen Verlust von *GDE2*. Die Quantifizierungen stellen Mittelwerte und SD aus jeweils fünf unabhängigen Experimenten dar.

3.3 EDI3 beeinflusst das intrazelluläre GPC/PC-Verhältnis in Tumorzellen

Um zu untersuchen, ob EDI3 auch einen Einfluss auf die endogenen Level verschiedener Cholin-Metabolite in Tumorzellen hat, sollten deren intrazelluläre Konzentrationen mit Hilfe von NMR-Spektroskopie bestimmt werden.

3.3.1 Der Knockdown von EDI3 führt zu einem erhöhten GPC/PC-Verhältnis

Zunächst wurden mittels hochauflösender $^1\text{H-NMR}$ an Zelllysaten nach EDI3-Knockdown die intrazellulären Level von Glycerophosphocholin (GPC) und Phosphocholin (PC) analysiert. Sowohl MCF7- als auch AN3CA-Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt worden waren, wiesen ein für Tumorzellen typisches, niedriges GPC/PC-Verhältnis auf (Abb. 3.10/3.11 A). PC war in beiden Zelllinien der bevorzugte Cholin-Metabolit, die GPC-Konzentrationen waren dagegen in MCF7-Zellen vergleichsweise gering und in AN3CA-Zellen praktisch nicht nachweisbar. Der Knockdown von EDI3 führte in MCF7-Zellen zu signifikanten Konzentrationsveränderungen beider Metabolite (Abb. 3.10). Es kam einerseits zu der erwarteten Akkumulation des EDI3-Substrates GPC und andererseits zu einer deutlichen Abnahme von PC, welches direkt aus dem Produkt der EDI3-katalysierten Reaktion, Cholin, generiert wird. Insgesamt war also nach EDI3-Knockdown aufgrund der Verschiebung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen von PC hin zu GPC ein erhöhtes GPC/PC-Verhältnis messbar. Dieses erhöhte GPC/PC-Verhältnis als Folge des EDI3-Knockdowns konnte auch in AN3CA-Zellen bestätigt werden (Abb. 3.11A). Allerdings lag der Einfluss von EDI3 in dieser Zelllinie hauptsächlich in einer Akkumulation von GPC, während die PC-Konzentrationen nur schwach abnahmen (Abb. 3.11B,C). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass der Einfluss der katalytischen Aktivität von EDI3 und somit auch seine biologische Funktion in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich oder zumindest unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann.

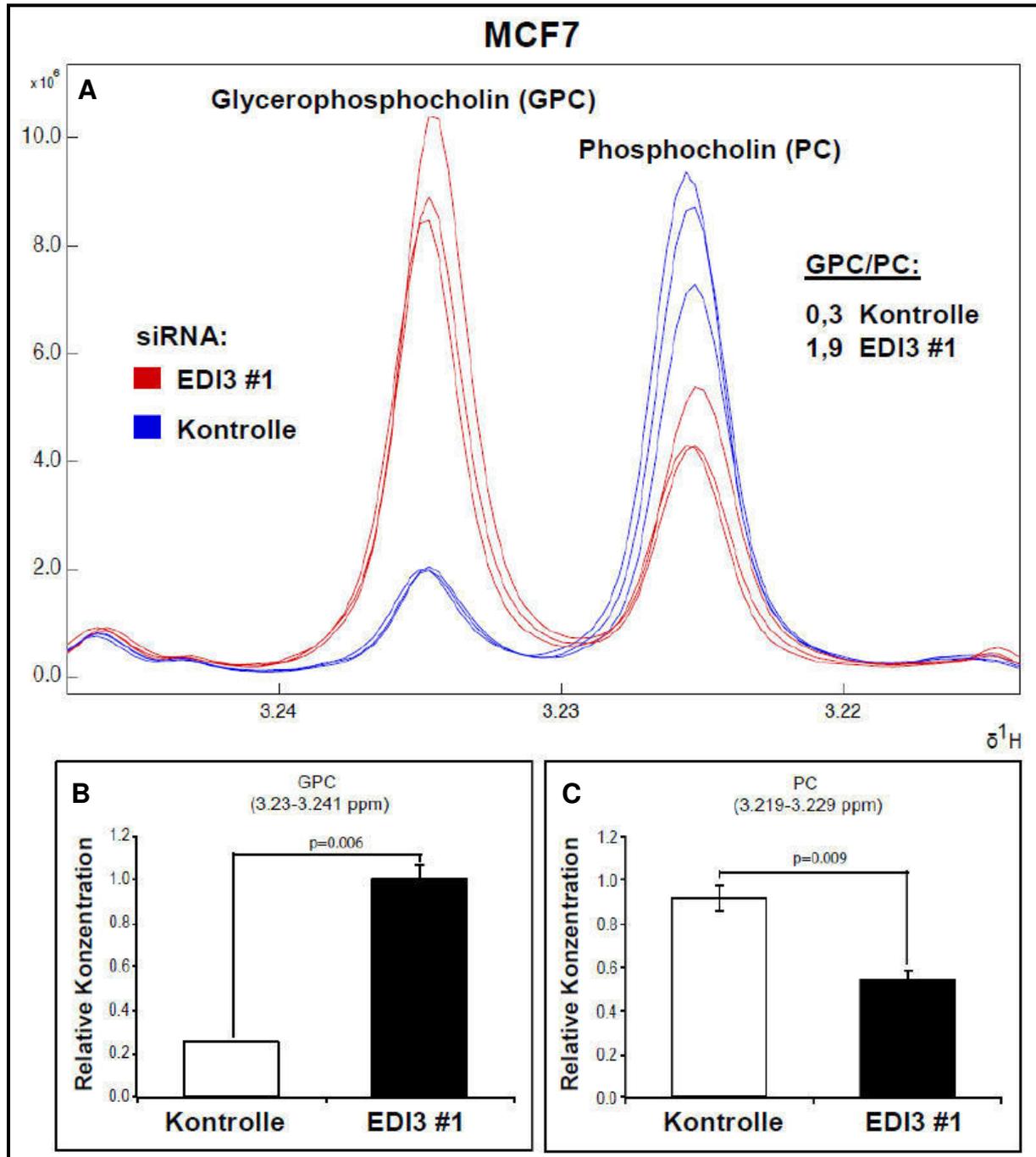


Abbildung 3.10: Der Knockdown von EDI3 in MCF7-Zellen verändert die intrazellulären Metabolit-Konzentrationen von GPC und PC. A) Eine Verschiebung der Metabolit-Konzentrationen in Folge des EDI3-Knockdowns führt in MCF7-Zellen insgesamt zu einem erhöhten GPC/PC-Verhältnis. Nach Knockdown von EDI3 (rote Kurven) ist die Signalintensität des GPC-Peaks bei einer chemischen Verschiebung von etwa 3,235 ppm und somit die GPC-Konzentration (**B**) verglichen mit Kontroll-Zellen (blaue Kurven) signifikant erhöht. Die Signalintensität des PC-Peaks bei etwa 3,225 ppm ist dagegen nach EDI3-Knockdown signifikant erniedrigt (**C**). Dargestellt sind die ^1H -NMR-Ergebnisse von drei technischen Replikaten eines repräsentativen Experimentes.

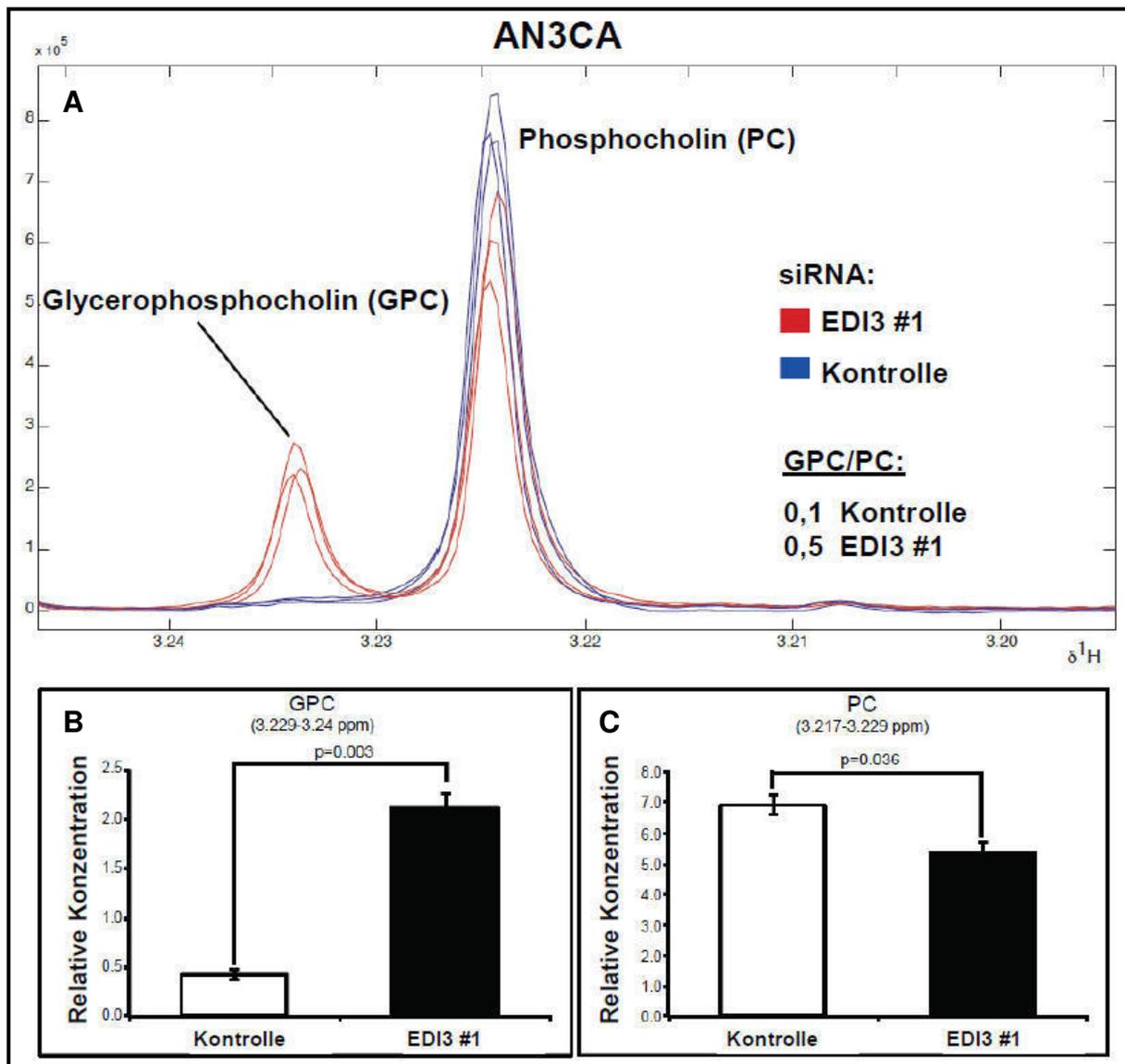


Abbildung 3.11: Der Knockdown von EDI3 in AN3CA-Zellen erhöht die intrazelluläre GPC-Konzentration. **A)** In AN3CA-Zellen kommt es in Folge des EDI3-Knockdowns zu einer Erhöhung des GPC/PC-Verhältnisses. Zurückzuführen ist dies hauptsächlich auf eine erhöhte Signalintensität des GPC-Peaks bei einer chemischen Verschiebung von etwa 3,235 ppm nach Knockdown von EDI3 (rote Kurven). In Kontroll-Zellen (blaue Kurven) ist dieser Metabolit kaum detektierbar, akkumuliert jedoch im Falle des EDI3-Knockdowns (**B**). Die Signalintensität des PC-Peaks bei etwa 3,225 ppm wird dagegen im EDI3-Knockdown nur schwach erniedrigt (**C**). Dargestellt sind die ^1H -NMR-Ergebnisse von drei technischen Replikaten eines repräsentativen Experimentes.

3.3.2 EDI3 beeinflusst *in vivo* in erster Linie die Konzentration von GPC

Um diese ersten Ergebnisse bezüglich der Rolle von EDI3 im Rahmen des zellulären Cholin-Metabolismus ausführlicher zu analysieren, wurden mittels einer Kombination aus ^1H - und ^{31}P -NMR weitere Messungen an Zelllysaten nach EDI3-Knockdown durchgeführt, die neben GPC und PC auch eine Quantifizierung der intrazellulären Konzentrationen von Cholin und G3P erlaubten. Eine entsprechende Wiederholung der NMR-Analysen in MCF7-Zellen bestätigte, dass das endogene GPC/PC-

Verhältnis durch den Knockdown von EDI3 erhöht wird. Dies wurde allerdings insbesondere durch eine Akkumulation des EDI3-Substrates GPC verursacht, da der Einfluss auf die PC-Konzentrationen in diesem Fall nicht signifikant war (Abb. 3.12A).

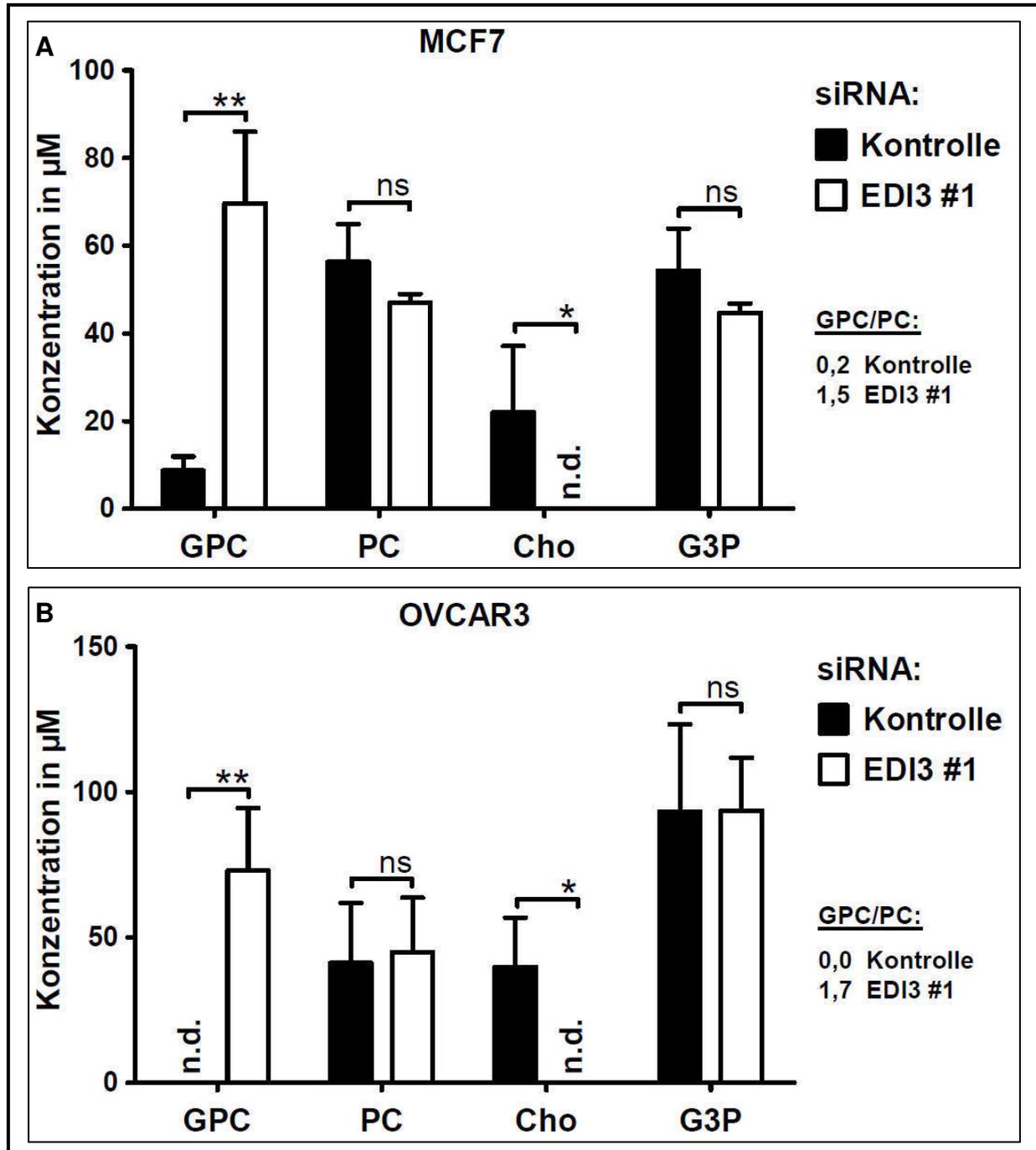


Abbildung 3.12: Der Knockdown von EDI3 führt intrazellulär zu einer Erhöhung der GPC- sowie zu einer Abnahme der Cholin-Konzentration. Der Einfluss von EDI3 auf Cholin-Metabolite in Tumorzellen erstreckt sich hauptsächlich auf das direkte Substrat GPC sowie eines der beiden Reaktionsprodukte, Cholin. Die intrazellulären Level von PC und dem zweiten Produkt der EDI3-katalysierten Reaktion, G3P, werden in **A)** MCF7-Zellen nur geringfügig und in **B)** OVCAR3-Zellen gar nicht verändert. Insgesamt führt der EDI3-Knockdown immer zu einer Erhöhung des GPC/PC-Verhältnisses. Dargestellt sind die Mittelwerte und SD aus drei unabhängigen NMR-Experimenten. * indiziert $p < 0.05$. ** indiziert $p < 0.01$. ns: nicht signifikant. n.d.: nicht detektierbar.

Die Quantifizierung der beiden direkten Reaktionsprodukte der EDI3-vermittelten GPC-Hydrolyse zeigte, dass die Cholin-Produktion durch den Knockdown von EDI3 so stark herabgesetzt wurde, dass die Level unterhalb der Nachweisgrenze lagen, während keine signifikante Senkung der G3P-Level zu detektieren war (Abb. 3.12A). Noch eindeutiger fielen die NMR-Ergebnisse für OVCAR3-Zelllysate aus. Während in Kontroll-Zellen nur das Produkt der EDI3-katalysierten Reaktion, Cholin, nachzuweisen war, nicht aber das Substrat GPC, war dies in Zellen mit EDI3-Knockdown genau umgekehrt (Abb. 3.12B). Die Konzentrationen von PC und G3P blieben dagegen völlig unverändert. Auch in dieser Zelllinie konnte eine Erhöhung des GPC/PC-Verhältnisses nach EDI3-Knockdown festgestellt werden. Diese differenziertere Betrachtung der intrazellulären Metabolit-Konzentrationen erlaubt die Aussage, dass EDI3 aufgrund seiner katalytischen Aktivität generell das GPC/PC-Verhältnis in Tumorzellen verändern kann, was hauptsächlich durch seinen direkten Einfluss auf GPC erklärt werden kann.

3.4 EDI3 beeinflusst die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen

Nachdem die grundlegende enzymatische Funktion von EDI3 als GPC-hydrolysierende Glycerophosphodiesterase sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher charakterisiert worden war, sollte nun untersucht werden, welche zellulären Eigenschaften EDI3 im Speziellen beeinflussen kann. Aufgrund ihrer großen Bedeutung im Rahmen der Metastasierung und ihrer vergleichsweise einfachen Quantifizierbarkeit in *in vitro*-Experimenten wurde zunächst die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen mit und ohne modulierter EDI3-Expression verglichen.

3.4.1 Der Knockdown von EDI3 verschlechtert die PKC α -abhängige Migration von MCF7-Zellen

In einem traditionellen *in vitro*-Wundheilungsversuch, dem sogenannten *Scratch*-Assay, wurde die Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen nach EDI3-Knockdown mit der von Kontroll-Zellen verglichen. Hierzu wurde ein Teil einer konfluenten Zell-Monoschicht jeweils so entfernt, dass sich eine definierte Lücke zwischen den Zellfronten bildete, die mit der Zeit durch das Einwandern der Zellen in diesen Bereich wieder geschlossen wurde. Der prozentuale Wundschluss relativ zur Ausgangsgröße der Lücke wurde in regelmäßigen Zeitintervallen quantifiziert.

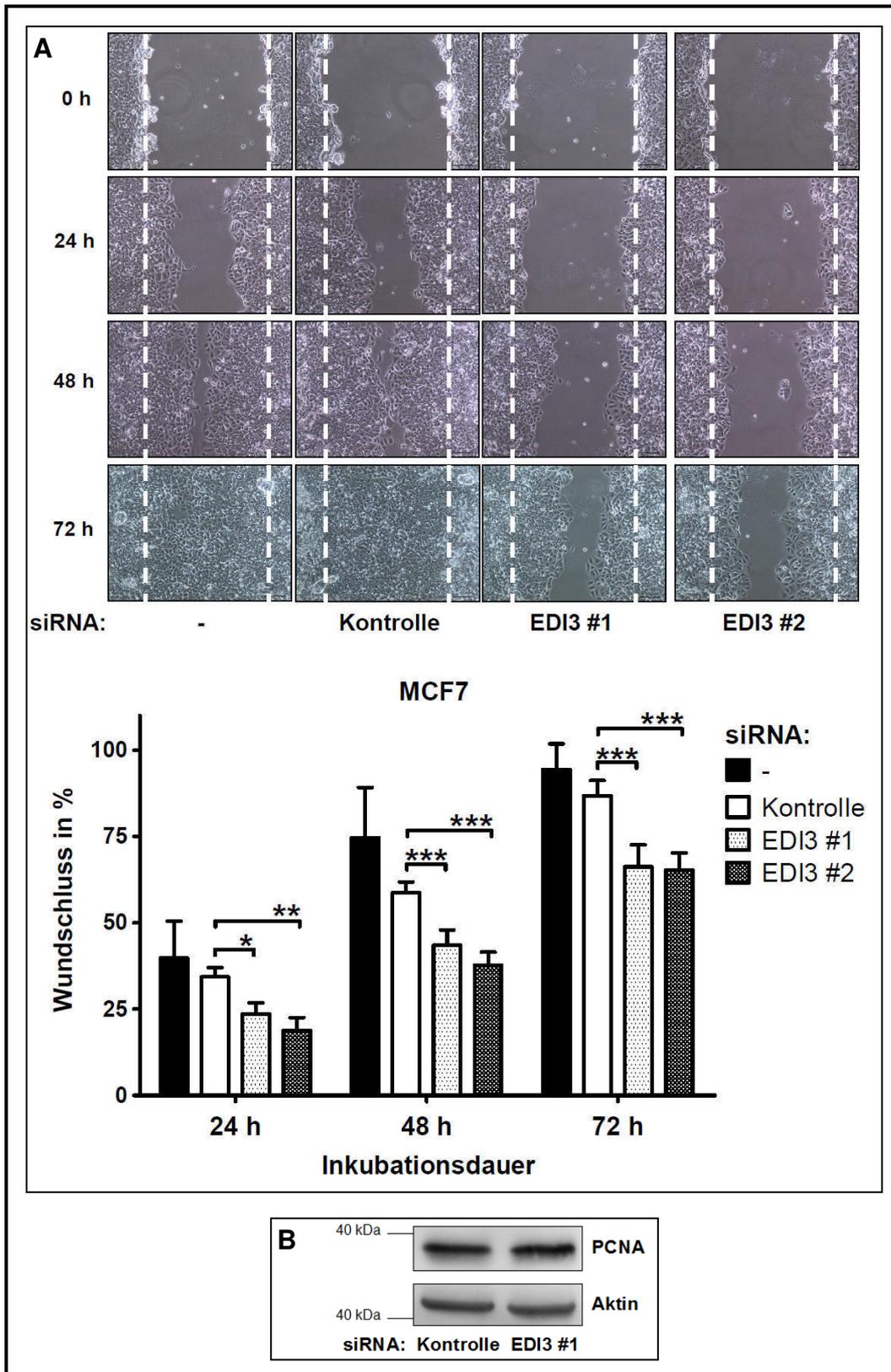


Abbildung 3.13: Der Knockdown von EDI3 beeinträchtigt die Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen. **A)** MCF7-Zellen mit verminderter EDI3-Expression sind im Vergleich zu Kontroll-Zellen nicht in der Lage, eine gleich große Lücke in derselben Zeitspanne zu schließen. **B)** Die Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA blieb unterdessen unverändert. Dargestellt sind repräsentative Bilder (Messbalken: 100 μ m) sowie die Mittelwerte und SD von drei unabhängigen Experimenten. * indiziert $p < 0,05$. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass eine Herabsetzung der EDI3-Expression in MCF7-Zellen mit einer Verlangsamung der zellulären Migration einhergeht. Während Kontroll-Zellen eine Lücke von etwa 600 μm Breite innerhalb von 72 h vollständig schließen konnten, war zu diesem Zeitpunkt nach EDI3-Knockdown noch etwa ein Drittel der Lücke vorhanden (Abb. 3.13A). Da u. a. die Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA unverändert blieb, ist davon auszugehen, dass es sich bei diesem Effekt tatsächlich um Migrations- und nicht etwa um Proliferationsunterschiede handelt (Abb. 3.13C).

Um eine Idee zu bekommen, welche Signalmechanismen dieser Beobachtung zugrunde liegen könnten, wurde per Immunoblotting anhand von Zelllysaten nach EDI3-Knockdown die Proteinexpression und Phosphorylierung verschiedener Signalproteine analysiert, die für ihre Rolle in der Regulation der zellulären Migration bekannt sind. Dabei konnte eine Assoziation zwischen verminderter EDI3-Expression und reduzierter PKC α -Expression festgestellt werden (Abb. 3.14B), die sich auch mittels RT-qPCR auf RNA-Ebene bestätigen ließ (Abb. 3.14A).

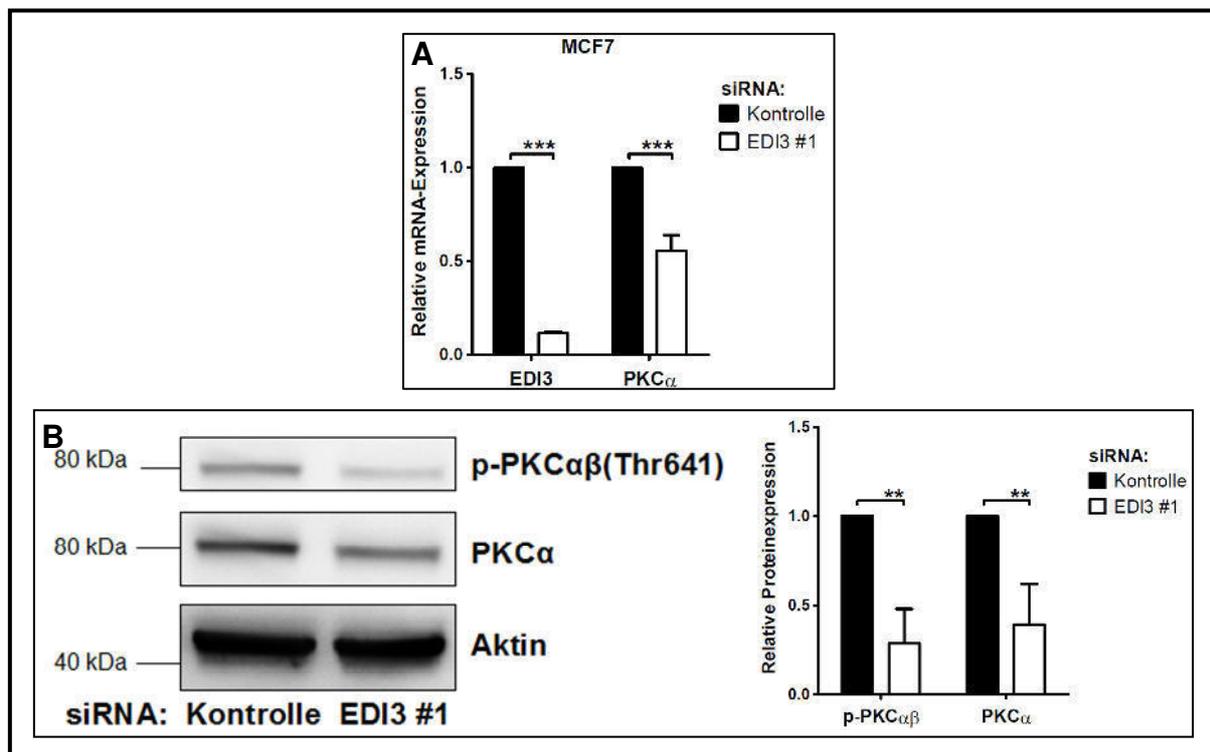


Abbildung 3.14: Der Knockdown von EDI3 führt zu einer Reduktion der PKC α -Expression in MCF7-Zellen. Eine Herabsetzung der EDI3-Expression ist assoziiert mit **A)** reduzierter Transkription sowie **B)** reduzierter Proteinexpression von PKC α . Dargestellt ist eine repräsentative Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). Quantifizierungen sind dargestellt als Mittelwerte und SD von fünf (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass EDI3 eine Rolle bei der PKC α -vermittelten Migration spielt, sollte die Verwendung einer Kombination aus EDI3- sowie PKC-Modulation liefern. Hierzu wurden MCF7-Zellen nach erfolgreichem EDI3-Knockdown zusätzlich mit dem PKC-Aktivator TPA stimuliert bzw. mit dem PKC-Inhibitor Gö6976 gehemmt und anschließend wurden die so behandelten Zellen in einem *Scratch*-Assay auf ihre Migrationsfähigkeit hin analysiert.

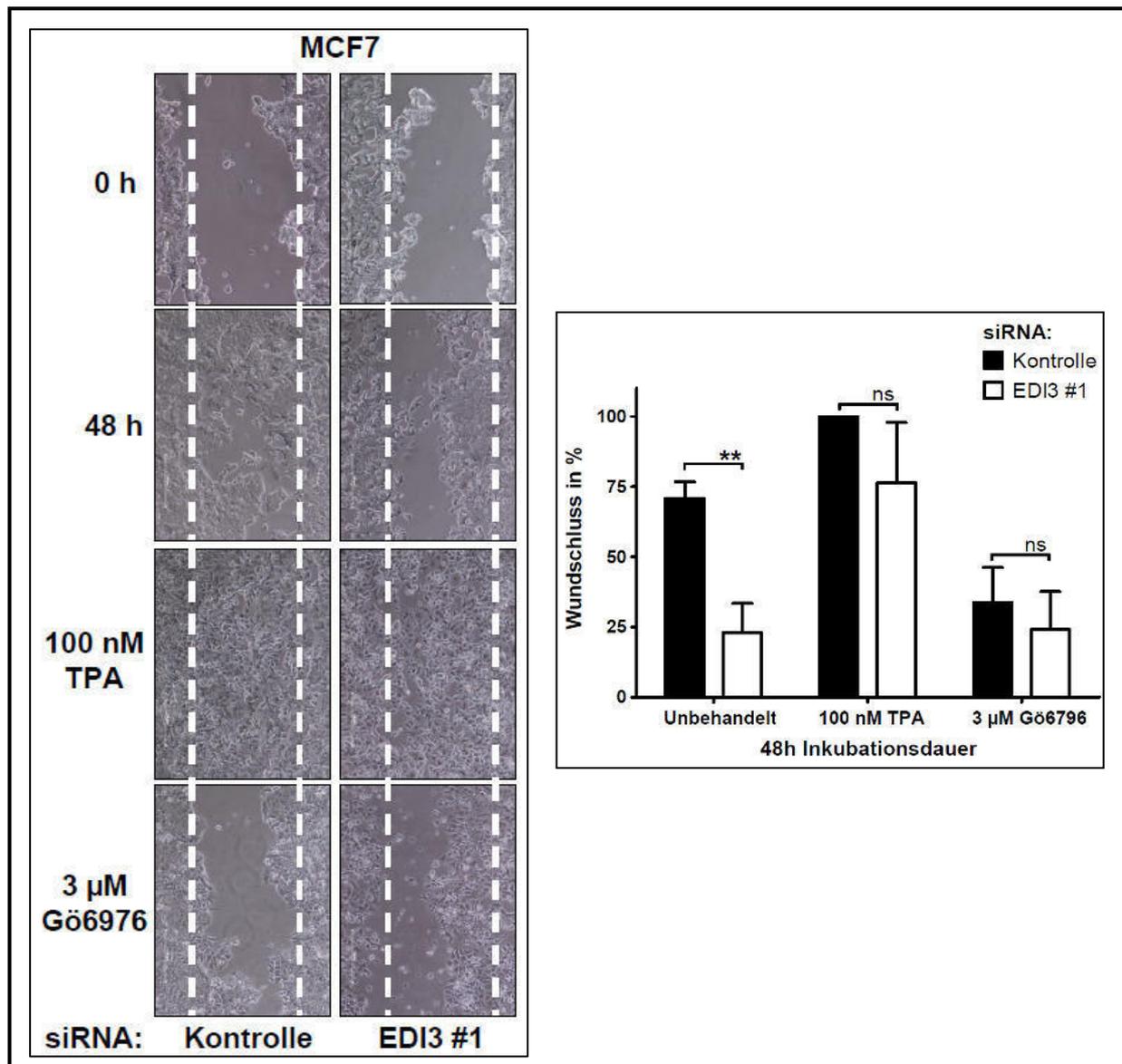


Abbildung 3.15: Analyse der Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen nach kombinierter EDI3- und PKC-Modulation. Der Knockdown von EDI3 führt zu verlangsamer Migration. Eine Umgehung des EDI3-Knockdowns durch Stimulation von PKC mit TPA kann die Migrationsfähigkeit der MCF7-Zellen wiederherstellen. Eine weitere Inhibierung von PKC nach bereits erfolgtem EDI3-Knockdown hat keinen weiteren negativen Effekt auf die Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen. Dargestellt sind die Bilder eines repräsentativen *Scratch*-Experimentes (Messbalken: 200 μ m) sowie die dazugehörige Quantifizierung als Mittelwerte und SD. ** indiziert $p < 0,01$. ns: nicht signifikant.

Der Knockdown von EDI3 beeinträchtigte, wie bereits beschrieben, die Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen. Behandelte man diese Zellen im Anschluss mit dem PKC-Aktivator TPA, so konnte der durch die erniedrigte EDI3-Expression bedingte Verlust von PKC umgangen werden und die normale Migrationsfähigkeit vergleichbar zu der Geschwindigkeit von Kontroll-Zellen konnte wiederhergestellt werden (Abb. 3.15). Wurden dagegen Kontroll-Zellen mit dem PKC-Inhibitor Gö6976 behandelt, so verschlechterte sich ihre Migrationsfähigkeit auf ein Niveau, das etwa dem der MCF7-Zellen nach EDI3-Knockdown entsprach. Eine Kombination aus EDI3-Knockdown und PKC-Inhibierung führte jedoch zu keiner weiteren Verschlechterung der zellulären Migration (Abb. 3.15). Das Ausbleiben eines kumulativen Effektes unterstützte zusätzlich die Interpretation, dass EDI3 die Migration von MCF7-Zellen über den PKC-vermittelten Signalweg beeinflusst.

3.4.2 Die Überexpression von EDI3 verbessert die PKC α -abhängige Migration von MCF7-Zellen

Um zu validieren, dass der im Knockdown beobachtete Einfluss auf die PKC α -vermittelte Migration von MCF7-Zellen spezifisch auf EDI3 zurückzuführen ist, wurden die Analysen zur Migrationsfähigkeit sowie zur Beteiligung von PKC α mit stabil transfizierten EDI3-überexprimierenden MCF7-EDI3-Zellen wiederholt. Dabei ergab sich ein komplementäres Bild. Mit Hilfe von *Scratch-Assays* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von EDI3 die Migration verglichen mit Vektor-transfizierten MCF7-Zellen deutlich beschleunigte (Abb. 3.16A). Während normale MCF7-Zellen eine Lücke von etwa 600 μm innerhalb von 72 h schließen konnten (vgl. Abb. 3.13), gelang den EDI3-überexprimierenden Zellen der vollständige Wundschluss bei vergleichbarer Ausgangsgröße der Lücke schon nach 48 h. Auch in diesem Fall traten keine Veränderungen der PCNA-Proteinexpression auf, so dass ein möglicher Einfluss von Proliferationsunterschieden gegenüber den Migrationsunterschieden vernachlässigt werden kann (Abb. 3.16B). Die Assoziation zwischen EDI3- und PKC α -Expression konnte ebenfalls durch RT-qPCR und Western Blot-Analysen bestätigt werden; eine Überexpression von EDI3 führte zu einer erhöhten PKC α -Expression auf RNA- (Abb. 3.16C) und Protein-Ebene (Abb. 3.16D).

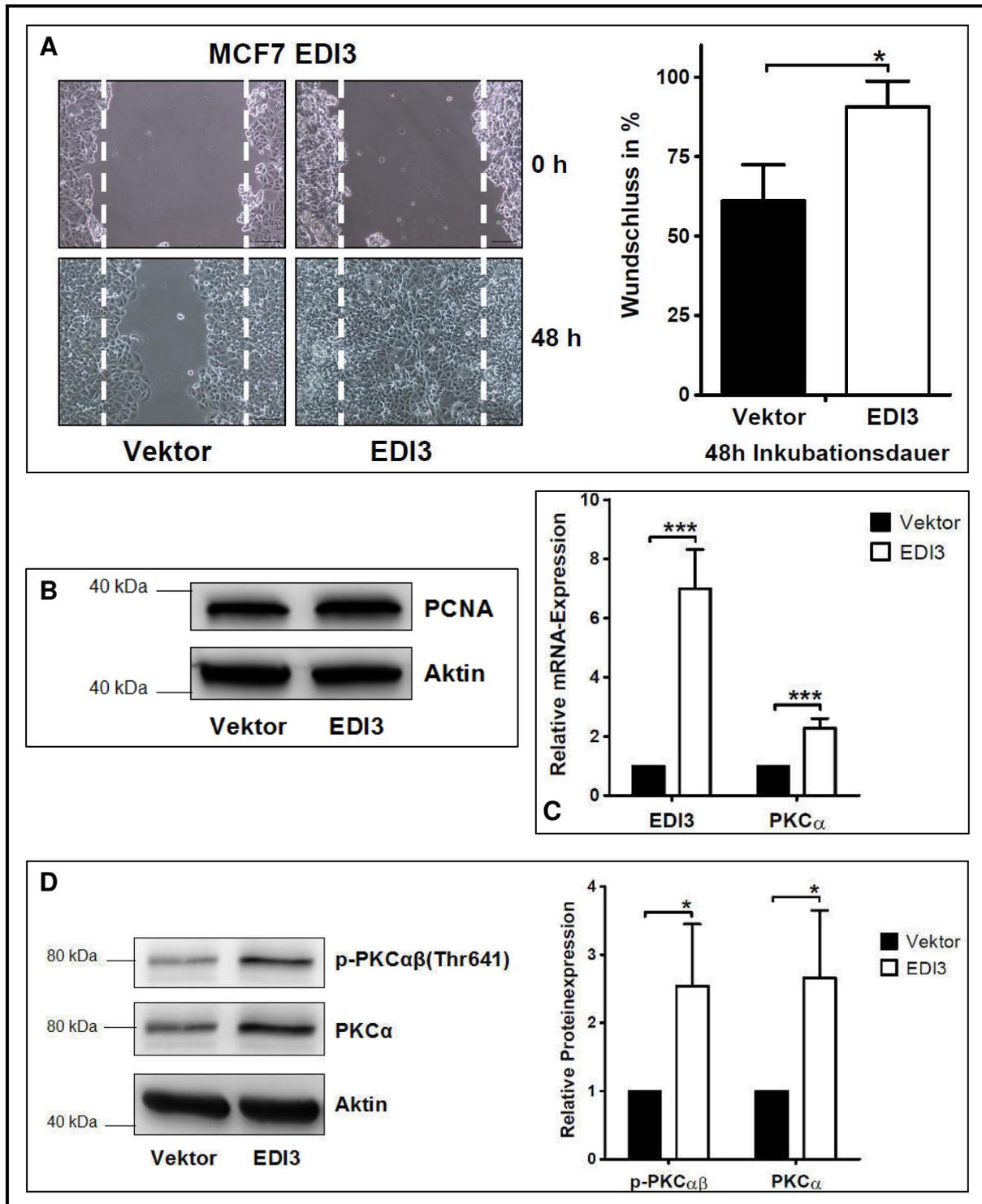


Abbildung 3.16: Die Überexpression von EDI3 verbessert die Migration von MCF7-Zellen und ist assoziiert mit einer Zunahme der PKC α -Expression. A) EDI3-überexprimierende Zellen weisen eine beschleunigte Migration verglichen mit Kontroll-Zellen auf. **B)** Die Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA bleibt dabei unverändert. Eine erhöhte EDI3-Expression geht mit einer Zunahme der PKC α -Expression auf **C)** RNA- und **D)** Protein-Ebene einher. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines *Scratch*-Assays (Messbalken: 100 μ m) bzw. einer Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). Die Quantifizierungen sind dargestellt als Mittelwerte und SD von fünf (C) bzw. drei unabhängigen Experimenten. * indiziert $p < 0,05$. *** indiziert $p < 0,001$.

Da die zuvor verwendeten PKC-Modulatoren TPA und Gö6976 nicht Isoform-spezifisch wirken, sollte eine Kombination von EDI3-Überexpression und PKC α -Knockdown mehr Aufschluss darüber geben, ob PKC α tatsächlich für die durch EDI3 beeinflussten Migrationsunterschiede verantwortlich sein konnte. Dafür wurden stabil transfizierte MCF7-EDI3-Zellen für 48 h mit einer spezifischen PKC α -siRNA bzw. einer Kontroll-siRNA behandelt und anschließend wurde mit Hilfe eines *Scratch*-Assays ihre Migrationsfähigkeit analysiert. Der PKC α -Knockdown konnte den Effekt der verbesserten Migration in EDI3-überexprimierenden Zellen aufheben und führte dazu, dass die Migrationsfähigkeit der behandelten Zellen nur noch vergleichbar mit der von normalen MCF7-Zellen war (Abb. 3.17).

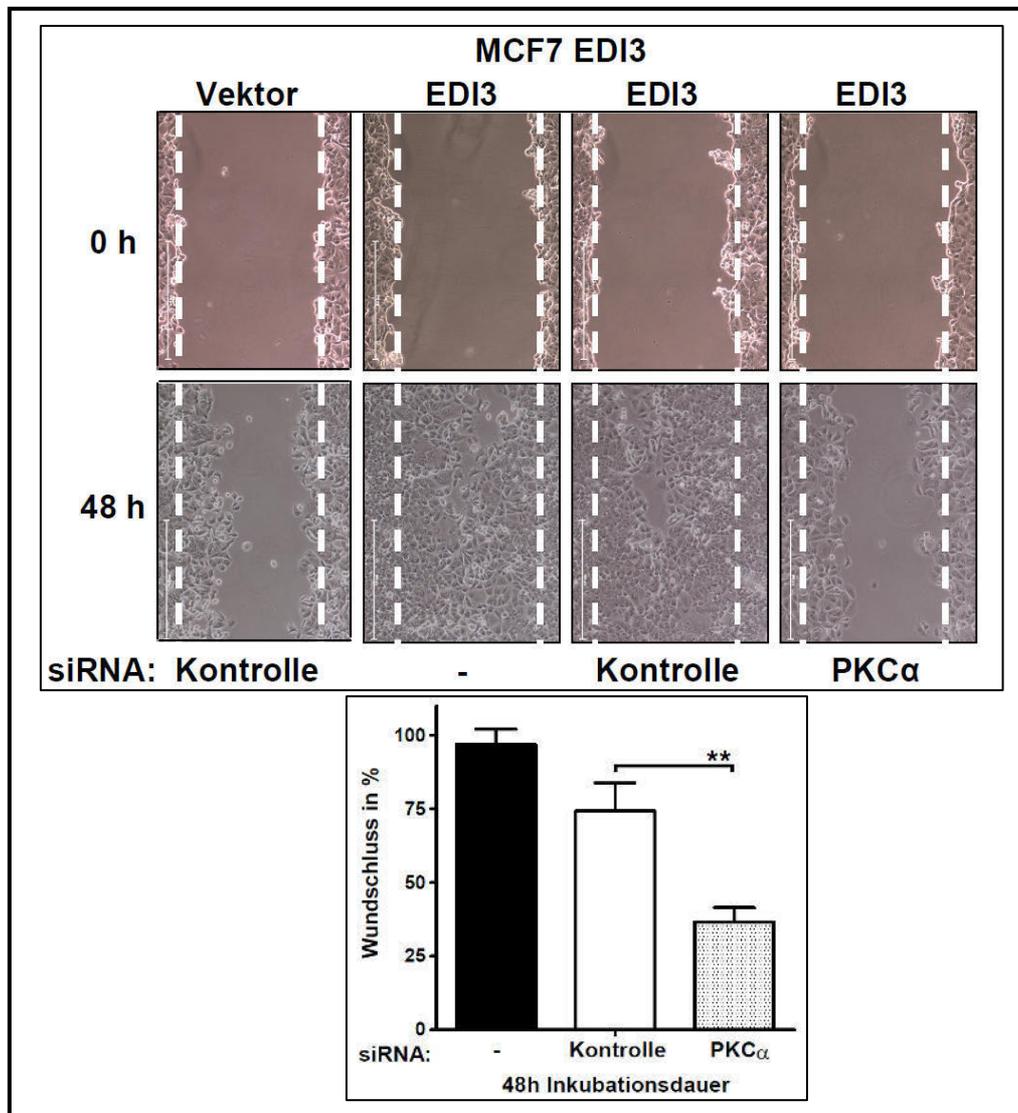


Abbildung 3.17: Analyse der Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen nach kombinierter EDI3-Überexpression und PKC α -Knockdown. Der spezifische Knockdown von PKC α kann die Beschleunigung der Migration in EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen verhindern bzw. rückgängig machen. Dargestellt sind die Bilder eines repräsentativen *Scratch*-Experimentes (Messbalken: 400 μ m) sowie die dazugehörige Quantifizierung als Mittelwerte und SD. ** indiziert $p < 0,01$.

3.4.3 Der Einfluss von EDI3 auf die PKC α -vermittelte Migration ist abhängig vom untersuchten Zelltyp

Nachdem der Einfluss von EDI3 auf die PKC α -abhängige Migration von MCF7-Zellen sowohl bei transienter Reduktion als auch bei stabiler Überexpression beobachtet werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob diese phänotypischen Unterschiede auch in anderen Tumorzellen auftreten. Dazu wurden mit zwei weiteren Zelllinien, AN3CA und OVCAR3, nach erfolgreichem EDI3-Knockdown Analysen der Migrationsfähigkeit sowie der PKC α -Expression durchgeführt.

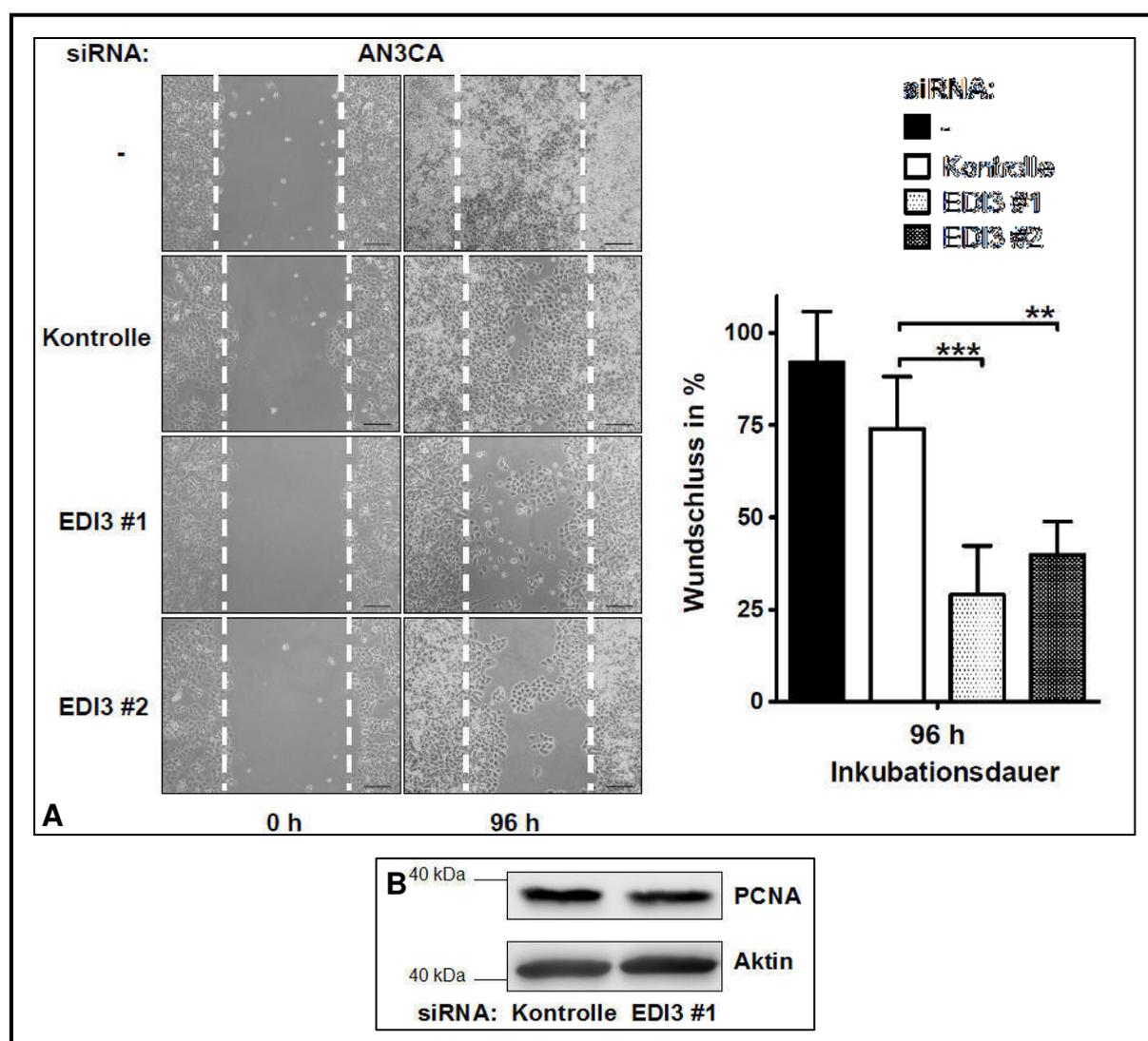


Abbildung 3.18: Der Knockdown von EDI3 verschlechtert die Migrationsfähigkeit von AN3CA-Zellen. **A)** In AN3CA-Zellen mit und ohne EDI3-Knockdown sind deutliche Migrationsunterschiede zu beobachten. **B)** Die Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA bleibt dabei unverändert. Dargestellt sind repräsentative Bilder eines *Scratch*-Assays (Messbalken: 100 μ m) bzw. einer Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). Die Quantifizierungen sind dargestellt als Mittelwerte und SD von einem repräsentativen Experiment durchgeführt mit drei technischen Replikaten. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$.

In AN3CA-Zellen konnte mittels eines *Scratch*-Assays gezeigt werden, dass der Knockdown von EDI3 die Migrationsfähigkeit der Zellen verhältnismäßig sogar noch weiter herabsetzt als in MCF7-Zellen (vgl. Abb. 3.13). Während die Kontroll-Zellen nach maximal 96 h vollständig in die entstandene Lücke eingewandert waren, konnten die Knockdown-Zellen sie nur etwa zur Hälfte schließen (Abb. 3.18A), was auch in dieser Zelllinie nicht auf Proliferationsunterschiede zurückzuführen ist, wie die gleichbleibende Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA vermuten lässt (Abb. 3.18B). Eine Assoziation zwischen reduzierter EDI3-Expression und verringerter PKC α -Expression konnte ebenfalls bestätigt werden (Abb. 3.19).

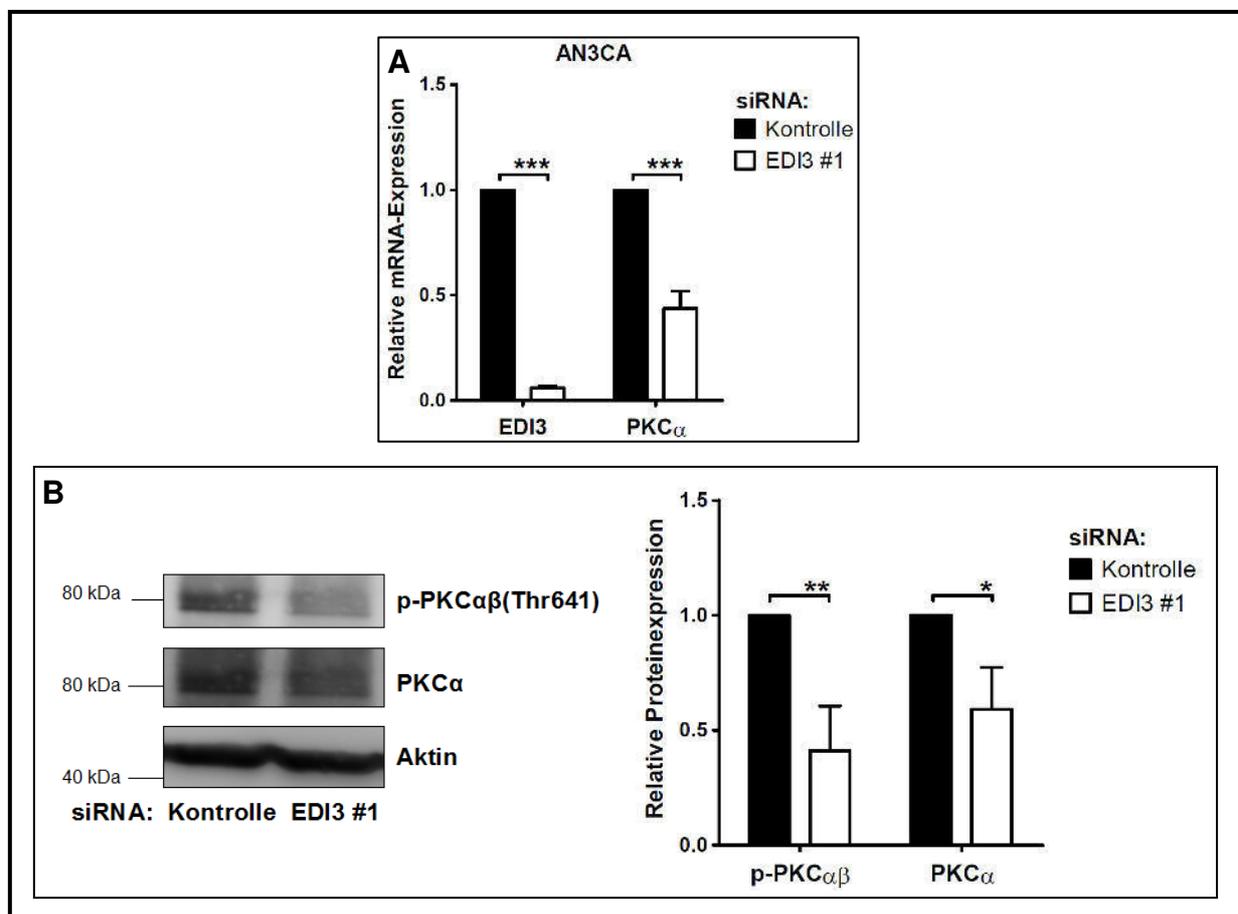


Abbildung 3.19: Der Knockdown von EDI3 in AN3CA-Zellen ist assoziiert mit verminderter Expression von PKC α . Eine Herabsetzung der EDI3-Expression in AN3CA-Zellen führt zu **A)** reduzierter Transkription sowie **B)** reduzierter Proteinexpression von PKC α . Dargestellt ist eine repräsentative Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). Quantifizierungen sind dargestellt als Mittelwerte und SD von fünf (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. * indiziert $p < 0,05$. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$.

In OVCAR3-Zellen ergab sich jedoch ein völlig anderes Bild. In dieser Zelllinie konnte die Migrationsfähigkeit spezifischer in einem Chemotaxis-Experiment mit Hilfe einer

modifizierten Boyden-Kammer analysiert werden. Dazu wurden OVCAR3-Zellen nach EDI3-Knockdown in serumfreiem Medium oberhalb einer porenhaltigen Membran ausgesät, durch die sie in Richtung einer unteren Kammer, welche mit serumhaltigem Medium gefüllt war, wandern konnten. Nach 24 h wurden alle migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert und gefärbt. Dabei ergaben sich keine Unterschiede in der Anzahl migrierter Zellen; auch die Zellen mit EDI3-Knockdown konnten die Membranporen problemlos durchqueren (Abb. 3.20A).

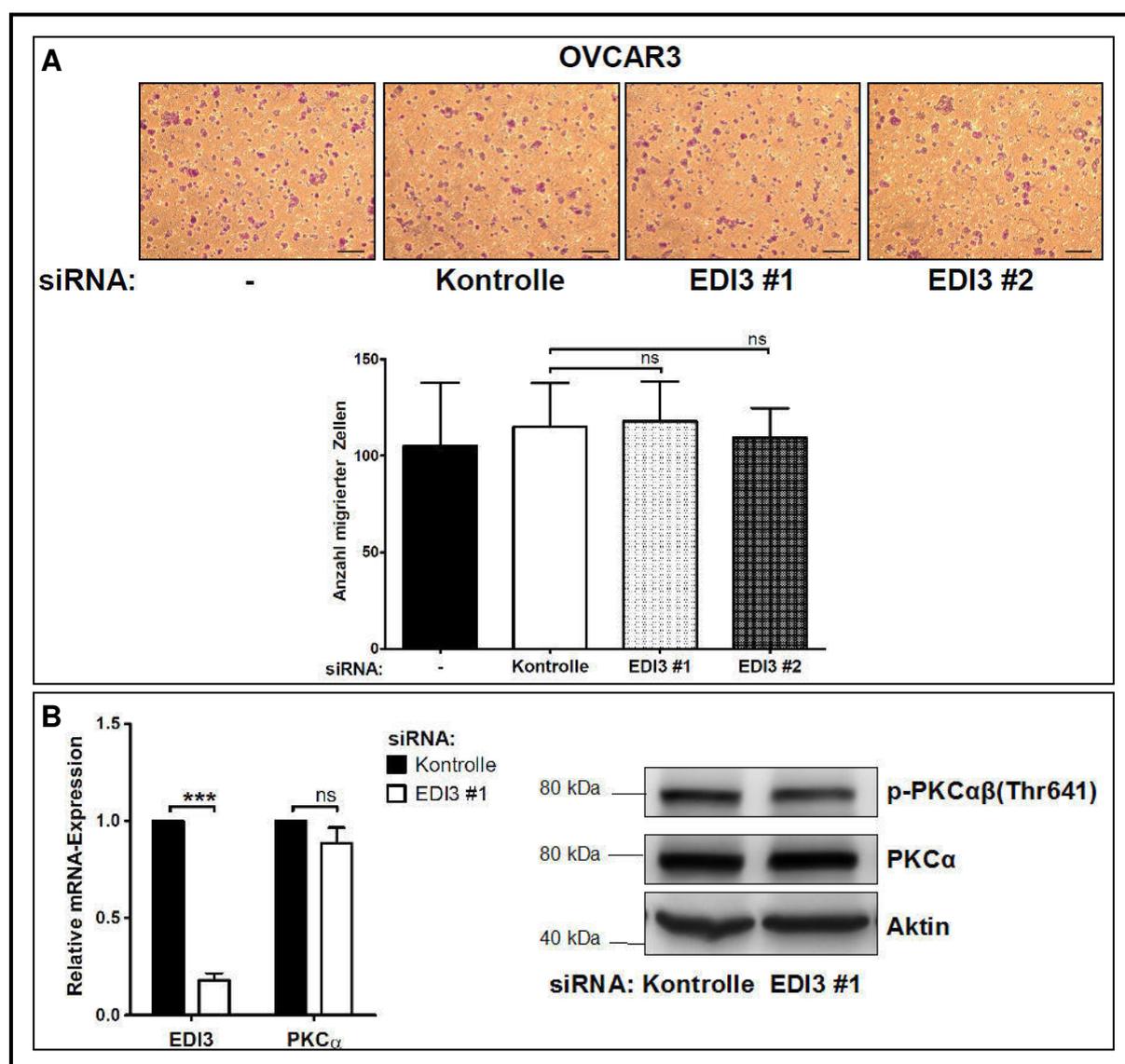


Abbildung 3.20: Der Knockdown von EDI3 hat in OVCAR3-Zellen keinen Einfluss auf die PKC α -vermittelte Migration. A) In OVCAR3-Zellen führt der Knockdown von EDI3 nicht zu einem veränderten Migrationsverhalten der Zellen. Dargestellt sind repräsentative Zellbilder (Messbalken: 100 μ m) eines Chemotaxis-Assays sowie die Mittelwerte und SD von drei unabhängigen Experimenten; ausgezählt wurden jeweils fünf Bilder pro Bedingung und Experiment. **B)** Auch ein Zusammenhang zwischen der Modulation der EDI3-Expression und Änderungen der PKC α -Expression ist in dieser Zelllinie nicht zu erkennen. Dargestellt sind Mittelwerte und SD von fünf unabhängigen RT-qPCR-Experimenten sowie eine repräsentative Western Blot-Analyse (Aktin dient als Ladungskontrolle). *** indiziert $p < 0,001$. ns: nicht signifikant.

Interessanterweise konnte in dieser Zelllinie auch keine Assoziation zwischen herabgesetzter EDI3-Expression und veränderter PKC α -Expression festgestellt werden (Abb. 3.20B). Dies deutet darauf hin, dass die Bedeutung von EDI3 durchaus abhängig vom Zelltyp variieren kann. Der Einfluss auf PKC α und der beobachtete Migrations-Phänotyp scheinen dabei eng miteinander verbunden zu sein. In den Zelllinien, in denen eine Reduktion bzw. Überexpression von EDI3 signifikant die Expression von PKC α verändern kann, ist auch eine Verschlechterung bzw. Verbesserung der Migrationsfähigkeit zu beobachten. In OVCAR3-Zellen, bei denen EDI3-bedingte Veränderungen der PKC α -Expression ausbleiben, treten dagegen keine Migrationsunterschiede auf.

3.5 EDI3 beeinflusst die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen

Nachdem in drei der vier gewählten Zellmodelle eine biologische Bedeutung von EDI3 im Rahmen der PKC α -vermittelten Migration identifiziert worden war, sollte der mögliche Einfluss von EDI3 auf weitere zelluläre Eigenschaften, die die Metastasierung von Tumorzellen begünstigen können, untersucht werden. Die Fähigkeit zur Migration hängt u. a. eng mit verwandten Prozessen wie der Adhäsion zusammen, da Zellen, um sich fortbewegen zu können, in kontrollierter Abfolge Kontakte mit der ECM ausbilden und wieder lösen müssen. Deshalb sollte im Weiteren näher analysiert werden, ob EDI3 auch eine Rolle bei der Adhäsion von Tumorzellen auf einem Substrat spielt. Hierfür musste zunächst ein zuverlässiges System etabliert werden, mit dem eine reproduzierbare Analyse der Zelladhäsion möglich war.

3.5.1 Etablierung eines Standardverfahrens zur Analyse der Zelladhäsion

Bereits bei den ersten Experimenten zum Thema Zelladhäsion fiel auf, dass bei diesen sensiblen Kurzzeitversuchen jegliche Abweichung bei der Behandlung der Zellen gravierenden Einfluss auf ihre Adhäsionsfähigkeit haben kann. Deshalb war es von großer Bedeutung, Standardbedingungen festzulegen, die eine gute Quantifizierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten konnten. Um einen möglichen Einfluss von EDI3 auf die Adhäsionsfähigkeit von OVCAR3-Zellen, für die bisher noch keine phänotypischen Unterschiede nach EDI3-Modulation beobachtet werden konnten, nicht zu übersehen, wurden die Randbedingungen für die nachfolgenden Analysen an dieser Zelllinie optimiert. Als Matrix für sämtliche Adhäsions-Assays wurde eine Fibronectin-Beschichtung (FN)

gewählt, auf der die Zellen nach Ablösen mit Trypsin und entsprechender Behandlung mit einem Trypsin-Inhibitor in serumfreiem Suspensionsmedium replattiert wurden. Wenn man die OVCAR3-Zellen nach 24 h Serumentzug erntete und direkt auf FN replattierte, wiesen sie insgesamt nur eine geringe Adhäsionsfähigkeit auf, die von dem Beibehalten einer runden Morphologie geprägt war (Abb. 3.21A). Sowohl das Einführen einer einstündigen Rotationsphase bei 37°C (Abb. 3.21B) zur Regeneration der Oberflächenrezeptoren zwischen der Trypsinierung und der Replattierung der Zellen, als auch der Verzicht auf das „Aushungern“ der Zellen durch Serumentzug (Abb. 3.21C) vor dem eigentlichen Versuchsbeginn führten zu einer deutlichen Verbesserung ihrer Adhäsionsfähigkeit auf FN.

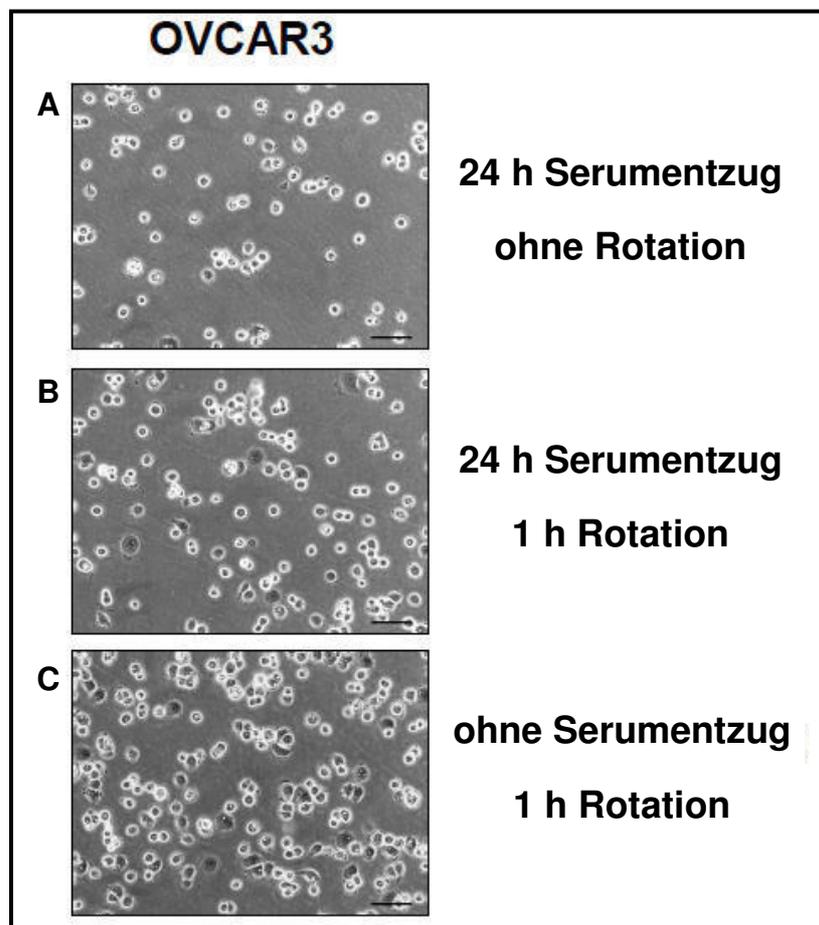


Abbildung 3.21: Schritte zur Verbesserung der Adhäsion von OVCAR3-Zellen auf Fibronektin. **A)** Nach 1 h Inkubationszeit bei 37°C adhären frisch geerntete OVCAR3-Zellen auf einer FN-Matrix einer Konzentration von 25 µg/ml vergleichsweise schlecht. **B)** Eine einstündige Rotation bei 37°C unmittelbar vor dem Replattieren hat einen positiven Einfluss auf die Adhäsion der Zellen. **C)** Ohne Serumentzug für 24 h vor Versuchsbeginn kann ihre Adhäsionsfähigkeit weiter verbessert werden. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrastbilder der OVCAR3-Zellen (Messbalken: 50 µm).

Um eine maximale Adhäsion der OVCAR3-Zellen auf der verwendeten FN-Matrix zu gewährleisten, sollte die Konzentration der für die Beschichtung genutzten FN-Lösung optimiert werden. Hierzu wurden OVCAR3-Zellen für 1 h auf verschiedenen konzentrierten FN-Beschichtungen replattiert, die adhären Zellen anschließend mit einer Kristallviolett-Lösung fixiert und gefärbt und schließlich die Adhäsion durch Absorptionsmessungen des wieder freigesetzten Kristallvioletts bei einer Wellenlänge von 570 nm mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan) quantifiziert.

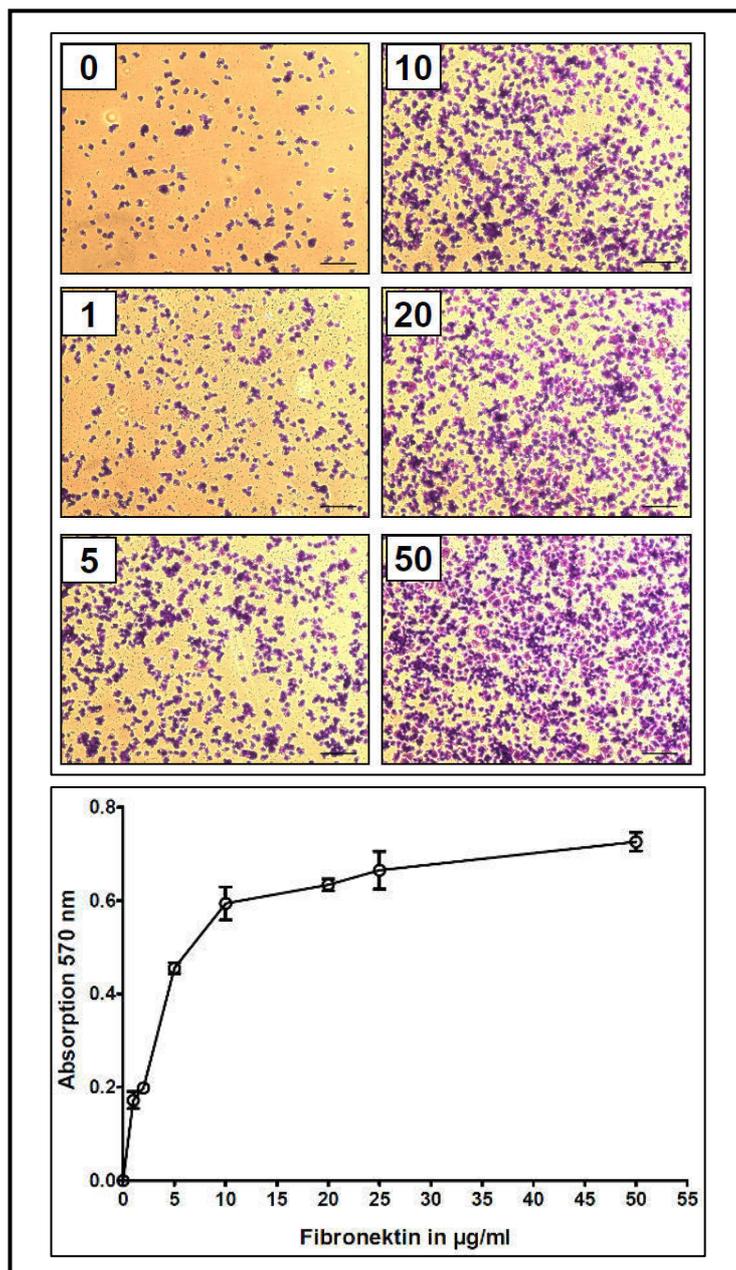


Abbildung 3.22: Einfluss der FN-Konzentration auf die Adhäsion von OVCAR3-Zellen. Eine Erhöhung der FN-Konzentration von 0 (BSA-beschichtete Negativkontrolle) bis 50 µg/ml geht mit einer Verbesserung der Adhäsion von OVCAR3-Zellen nach 1 h bei 37°C einher. Dargestellt sind Phasenkontrastbilder der Kristallviolett-gefärbten Zellen (Messbalken: 100 µm) sowie die Mittelwerte und SD eines Experimentes durchgeführt mit fünf technischen Replikaten.

Da bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ FN eine stetige Zunahme der Absorption zu verzeichnen war und somit eine kontinuierliche Verbesserung der Adhäsion erzielt werden konnte, es darüber hinaus aber kaum noch zu einer weiteren Steigerung der Zelladhäsion kam (Abb. 3.22), wurde für alle weiteren Experimente eine FN-Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ festgesetzt. Unter den so ermittelten Randbedingungen wurde zur Abschätzung der optimalen Adhäsionsdauer eine Zeitreihe mit unbehandelten MCF7-, OVCAR3- und AN3CA-Zellen auf einer FN-Matrix durchgeführt (Abb. 3.23). Sowohl für MCF7- als auch für OVCAR3-Zellen konnte dabei eine zeitabhängige Zunahme der Absorption, also ein Anstieg der Zahl adhärenter Zellen, beobachtet werden. Eine zuverlässige Quantifizierung der frühen Zelladhäsion, die klar unterscheidbar von jener in BSA-beschichteten Kontrollen war, konnte erst nach einer Adhäsionsdauer von etwa 15 min erfolgen. In Anbetracht der Tatsache, dass mit Hilfe dieses Adhäsions-Assays später Unterschiede zwischen unveränderten Tumorzellen sowie Zellen, deren EDI3-Expression erniedrigt bzw. erhöht worden war, untersucht werden sollten, schienen Zeitpunkte zwischen 30 und 60 min Adhäsionsdauer aufgrund der erreichten mittleren Absorptionswerte besonders geeignet zu sein.

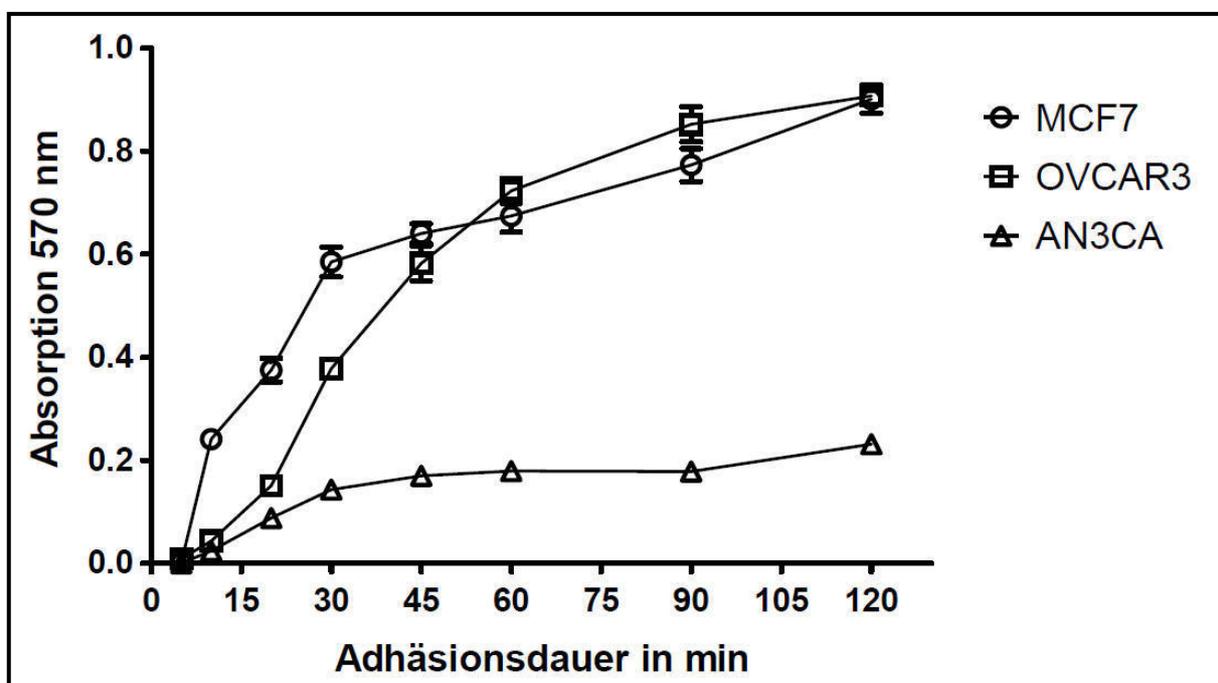


Abbildung 3.23: Adhäsions-Zeitreihen mit unbehandelten MCF7-, OVCAR3- und AN3CA-Zellen. Während MCF7- und OVCAR3-Zellen eine zeitabhängige Zunahme der Adhäsion auf einer FN-Matrix (20 $\mu\text{g/ml}$) zeigen, adhären AN3CA-Zellen insgesamt nur schlecht auf dieser Matrix. Dargestellt ist die Quantifizierung in Form von Mittelwerten und SD eines Experimentes durchgeführt mit fünf technischen Replikaten.

Da bei den Untersuchungen zur zellulären Migration aufgefallen war, dass die beobachteten Effekte nach EDI3-Modulation abhängig vom Zelltyp sein können, wurden die nachfolgenden Experimente parallel in MCF7- und OVCAR3-Zellen durchgeführt. Die AN3CA-Zellen wurden aufgrund ihrer vergleichsweise schlechten Adhäsion auf der FN-Matrix (vgl. Abb. 3.23) im Weiteren größtenteils vernachlässigt.

3.5.2 Eine Reduktion der EDI3-Expression verlangsamt die Zelladhäsion

Nachdem bereits festgestellt worden war, dass die transiente Reduktion der EDI3-Expression mittels RNA-Interferenz zumindest in einigen der verwendeten Tumorzelllinien einen negativen Einfluss auf deren Migrationsfähigkeit hatte, sollte auch ein möglicher Einfluss von EDI3 auf das Adhäsionsverhalten von Tumorzellen auf einer FN-Matrix untersucht werden. Dazu wurden MCF7- und OVCAR3-Zellen nach EDI3-Knockdown unter den eben beschriebenen optimierten Reaktionsbedingungen in Adhäsions-Assays eingesetzt. Im Falle der MCF7-Zellen waren nach einer Adhäsionszeit von 30 min signifikante Unterschiede zu erkennen; die Adhäsion der Knockdown-Zellen auf FN war gegenüber den Kontroll-Zellen deutlich verschlechtert (Abb. 3.24A). Diese Tendenz war zwar auch noch nach einer längeren Adhäsionszeit von 60 min festzustellen, fiel allerdings nicht mehr so deutlich aus; d. h. die Adhäsion wurde durch den Knockdown von EDI3 verlangsamt, aber nicht verhindert. Für die OVCAR3-Zellen, bei denen keine Migrationsunterschiede nach Knockdown von EDI3 beobachtet werden konnten (vgl. Abb. 3.20A), ergab sich im Hinblick auf die Adhäsion ein differenzierteres Bild. Während eine der beiden verwendeten spezifischen siRNAs (EDI3 #1), wie in MCF7-Zellen, zu einer signifikanten Verschlechterung der Adhäsionsfähigkeit nach EDI3-Knockdown führte, traten unter Verwendung der zweiten EDI3-spezifischen siRNA (EDI3 #2) keine klaren Adhäsionsunterschiede auf (Abb. 3.24B). Dabei galt auch in OVCAR3-Zellen, dass bei längerer Adhäsionszeit zwar die Tendenzen gleich, aber weniger deutlich ausgeprägt waren.

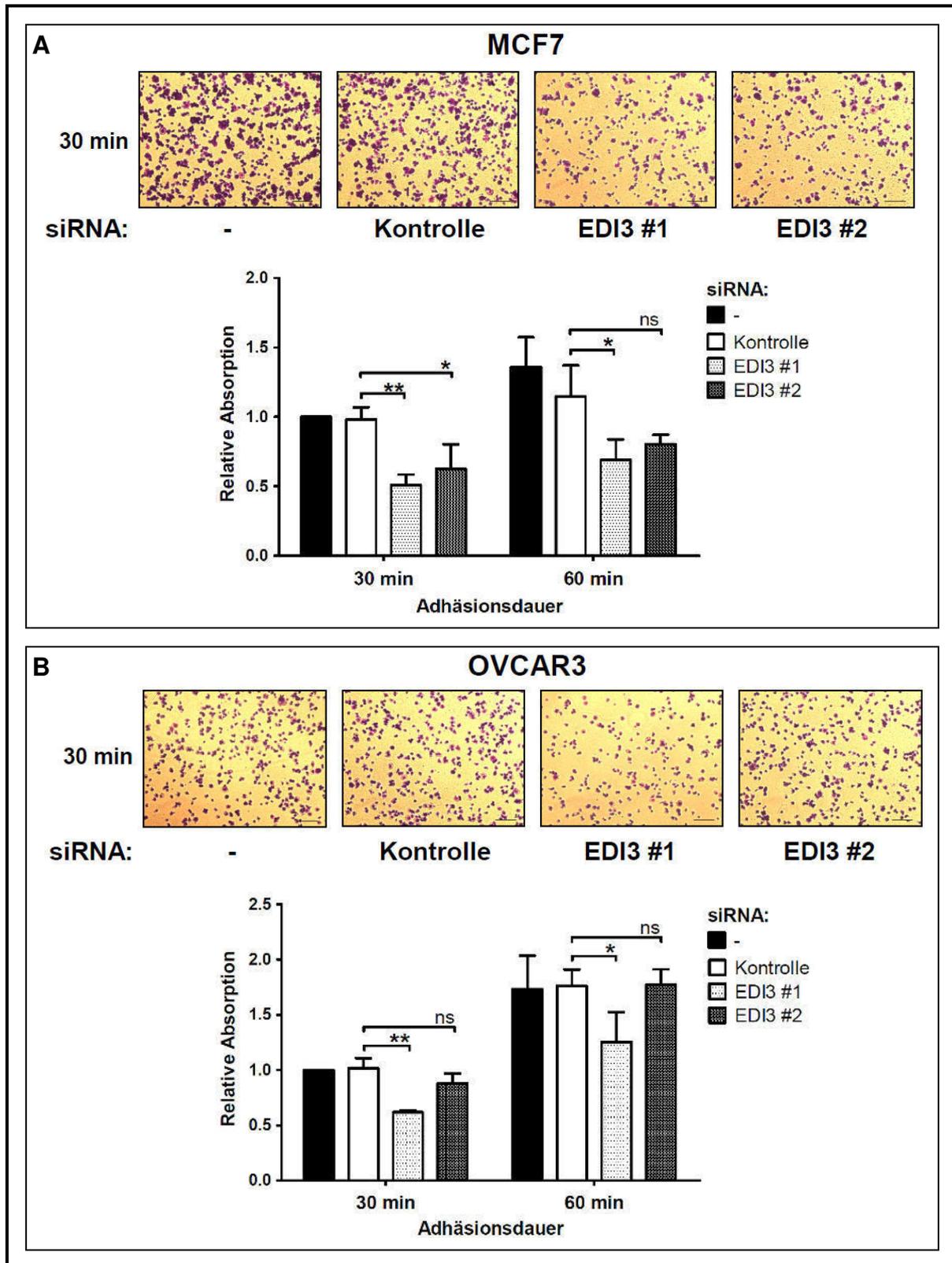


Abbildung 3.24: Der Knockdown von EDI3 verschlechtert die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen. **A)** In MCF7-Zellen führt eine Herabsetzung der EDI3-Expression zu einer Verlangsamung der Zelladhäsion auf einer FN-Matrix. **B)** In OVCAR3-Zellen führt der siRNA-Knockdown von EDI3 mit siRNA #1 ebenfalls zu einer signifikanten Verlangsamung der Adhäsion, während siRNA EDI3 #2 keinen Einfluss im Vergleich zu Kontroll-Zellen zeigt. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrastbilder (Messbalken: 100 μ m) der Kristallviolett-gefärbten adhärenen Zellen sowie die Mittelwerte und SD aus drei unabhängigen Experimenten. * indiziert $p < 0,05$. ** indiziert $p < 0,01$. ns: nicht signifikant.

3.5.3 Die Überexpression von EDI3 beschleunigt die Zelladhäsion

Um den bei Untersuchung des siRNA-Knockdowns nicht ganz eindeutig identifizierten Einfluss von EDI3 auf die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen näher aufzuklären, wurde auch die Adhäsion der stabil transfizierten MCF7-Zellen mit erhöhter EDI3-Expression auf einer FN-Matrix zeitabhängig analysiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 10 min waren kaum adhärenzte Vektor-transfizierte Zellen nachzuweisen, während eine Adhäsion der EDI3-überexprimierenden Zellen schon zu diesem frühen Zeitpunkt deutlich vorhanden und somit stark beschleunigt war (Abb. 3.25). Auch nach einer Adhäsionsdauer von 30 min war die Adhäsion der MCF7-EDI3-Zellen noch signifikant erhöht, nach 60 min konnten die Kontroll-Zellen allerdings bezüglich ihrer Adhäsionsfähigkeit auf das Niveau der EDI3-überexprimierenden Zellen aufschließen.

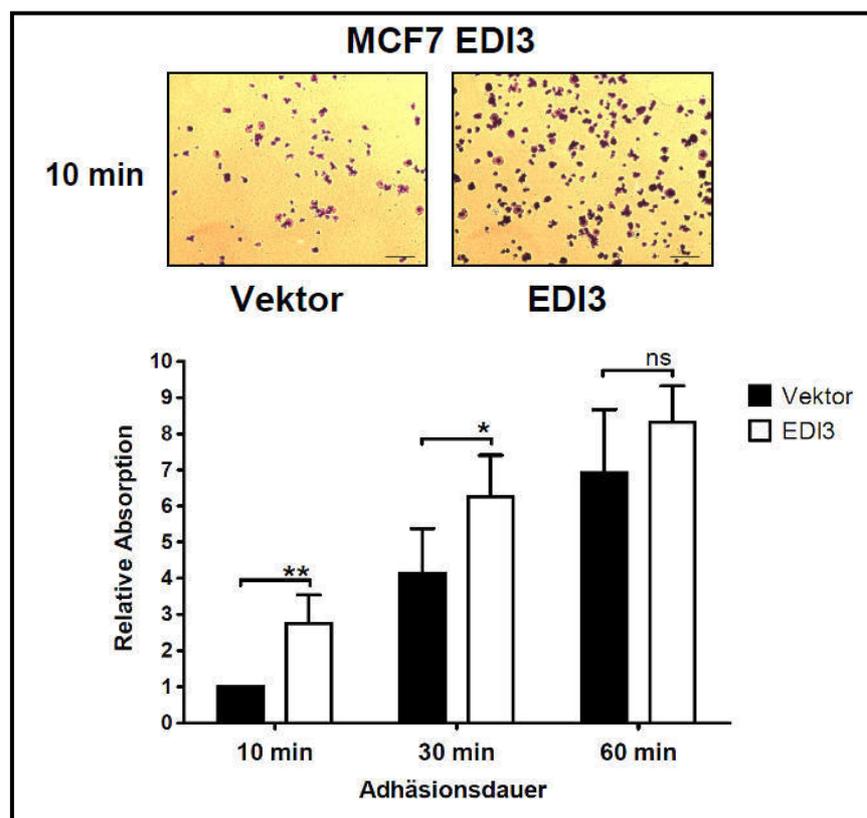


Abbildung 3.25: Die Überexpression von EDI3 verbessert die Adhäsion von MCF7-Zellen. In stabil transfizierten MCF7-Zellen führt die erhöhte Expression von EDI3 zu einer Beschleunigung der Zelladhäsion auf einer FN-Matrix. Eine Quantifizierung signifikanter Unterschiede ist bereits nach 10 min Inkubationsdauer möglich. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrastbilder (Messbalken: 100 μ m) der Kristallviolett-gefärbten adhärenzte Zellen sowie die Mittelwerte und SD aus drei unabhängigen Experimenten. * indiziert $p < 0,05$. ** indiziert $p < 0,01$. ns: nicht signifikant.

3.5.4 Eine Modulation der EDI3-Expression führt zu Veränderungen der Integrin-Expression

Nachdem phänotypische Unterschiede identifiziert worden waren, die einen Zusammenhang zwischen der Modulation der EDI3-Expression und einer veränderten Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen aufzeigen konnten, sollten auch mögliche involvierte Signalproteine untersucht werden. Da im Rahmen der Adhäsion von Zellen auf dem gewählten Substrat die Interaktion zwischen Integrinen, Transmembran-Rezeptoren an der Zelloberfläche, und dem entsprechenden ECM-Protein Fibronektin das initiale Ereignis darstellt, wurde ein möglicher Einfluss von EDI3 auf die Expression der Integrine analysiert. Hierzu erfolgten in den verschiedenen Zellmodellen unmittelbar nach siRNA-Knockdown von EDI3 sowie in den EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen RT-qPCR- und Western Blot-Analysen zur Ermittlung der Expressionslevel bestimmter Integrin-Untereinheiten.

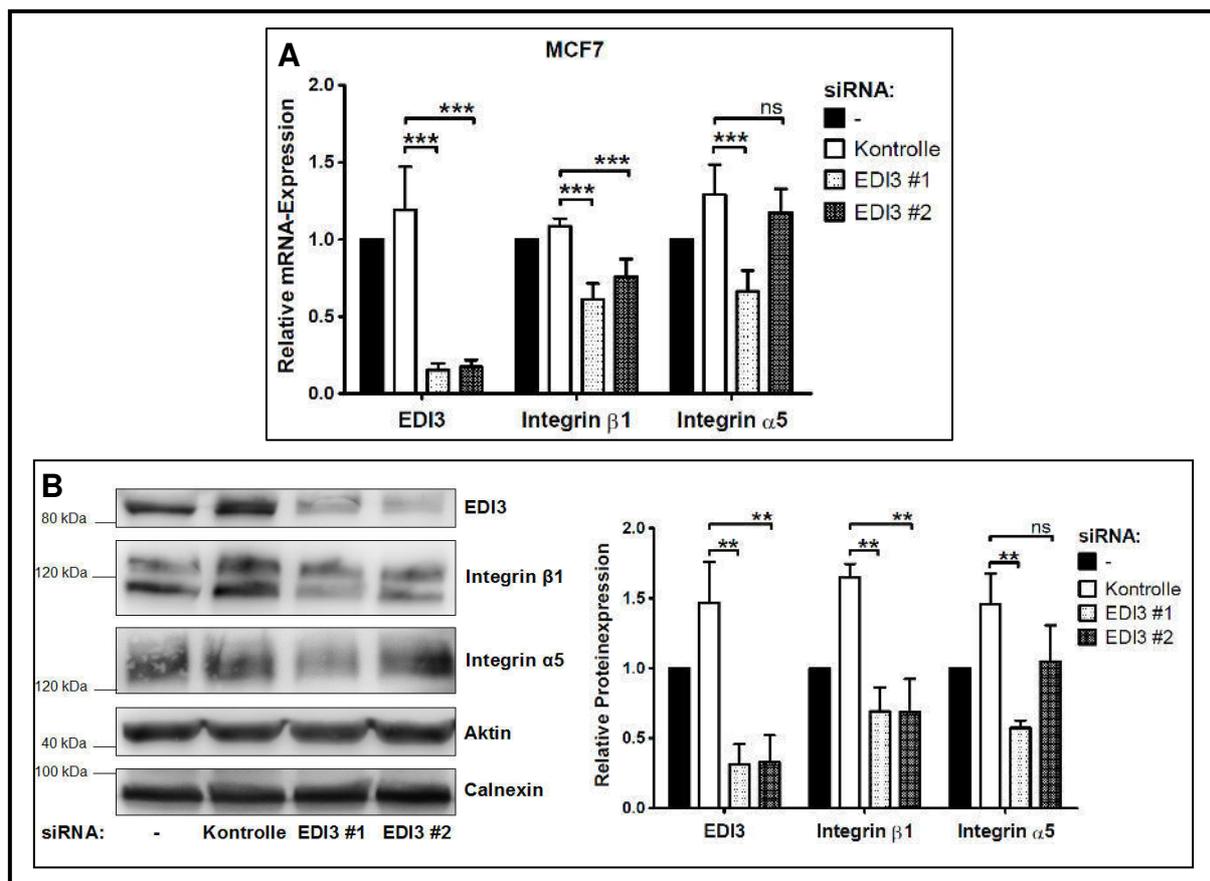


Abbildung 3.26: Der Knockdown von EDI3 führt zu reduzierter Expression des FN-Rezeptors Integrin α 5 β 1 in MCF7-Zellen. Eine Herabsetzung der EDI3-Expression führt in MCF7-Zellen zu erniedrigter Expression der Integrin-Untereinheiten β 1 und α 5 auf **A**) RNA- und **B**) Protein-Ebene. Dargestellt sind repräsentative Bilder einer Western Blot-Analyse (Aktin und Calnexin dienen als Ladungskontrollen) sowie Mittelwerte und SD aus fünf (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$. ns: nicht signifikant.

In allen untersuchten Zellmodellen war nach EDI3-Modulation eine signifikant veränderte RNA-Expression der zentralen Integrin-Untereinheit $\beta 1$ festzustellen (Abb. 3.26/27/28 A), die mit mehreren α -Untereinheiten Heterodimere ausbilden und so für die Interaktion mit verschiedenen ECM-Proteinen von Bedeutung sein kann. Darüber hinaus konnte insgesamt auch ein Einfluss von EDI3 auf die Expression der FN-spezifischen Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ beobachtet werden. Differenzierter betrachtet führte in MCF7-Zellen die Verwendung einer der beiden EDI3-spezifischen siRNAs (EDI3 #1) zu einer signifikanten Reduktion der Integrin $\beta 1$ - und Integrin $\alpha 5$ -Expression auf RNA- und Protein-Ebene, während der Einsatz der zweiten siRNA-Spezies (EDI3 #2) nur einen Effekt auf die Expression von Integrin $\beta 1$ hatte (Abb. 3.26). In OVCAR3-Zellen fiel der Effekt der siRNA-Spezies EDI3 #2 sogar noch schwächer aus, so dass auch für Integrin $\beta 1$ nur noch auf RNA-Ebene eine signifikante Reduktion verzeichnet werden konnte (Abb. 3.27).

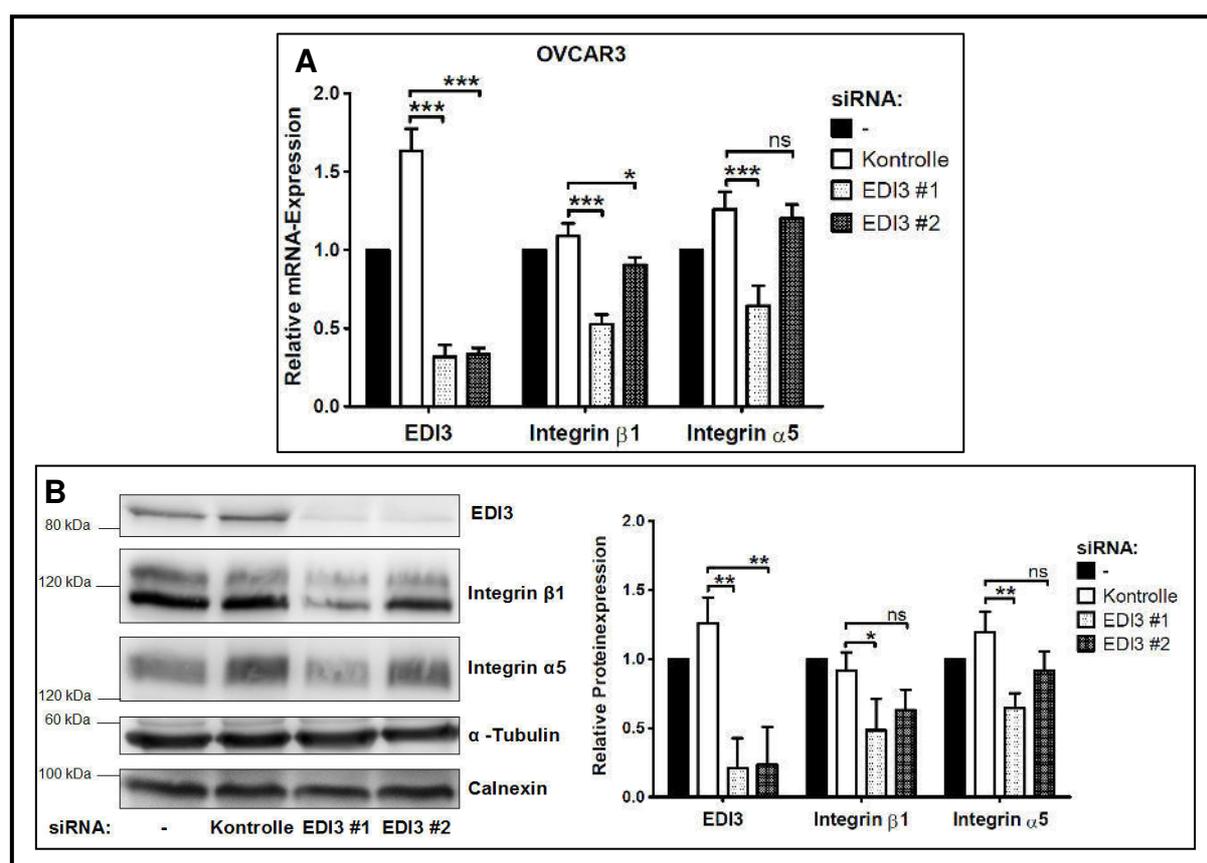


Abbildung 3.27: Der Knockdown von EDI3 kann in OVCAR3-Zellen die Expression des FN-Rezeptors Integrin $\alpha 5\beta 1$ reduzieren. Eine Herabsetzung der EDI3-Expression führt in OVCAR3-Zellen nur unter Verwendung einer der beiden spezifischen siRNA-Spezies (EDI3 #1) zu erniedrigter Expression der Integrin-Untereinheiten $\beta 1$ und $\alpha 5$ auf **A**) RNA- und **B**) Protein-Ebene. Dargestellt sind repräsentative Bilder einer Western Blot-Analyse (α -Tubulin und Calnexin dienen als Ladungskontrollen) sowie Mittelwerte und SD aus fünf (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. * indiziert $p < 0,05$. ** indiziert $p < 0,01$. *** indiziert $p < 0,001$. ns: nicht signifikant.

Der Knockdown von EDI3 mit der anderen siRNA-Spezies EDI3 #1 führte dagegen auch in OVCAR3-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Integrin β 1- und Integrin α 5-Expression auf RNA- und Protein-Ebene. Diese Differenzierung im Hinblick auf Veränderungen der Integrin-Expression war nicht durch siRNA-abhängige Unterschiede in der Effizienz des EDI3-Knockdowns zu erklären (vgl. Abb. 3.26/27). Dass die im Rahmen der siRNA-Knockdowns veranschaulichten Effekte auf die Integrin-Expression spezifisch auf die Veränderungen der EDI3-Expression zurückzuführen waren, konnte mit Hilfe der stabil transfizierten MCF7-EDI3-Zellen untermauert werden. Die Überexpression von EDI3 hatte in dieser Zelllinie eine signifikante Zunahme der Expression von Integrin β 1 und Integrin α 5 im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontroll-Zellen zur Folge (Abb. 3.28).

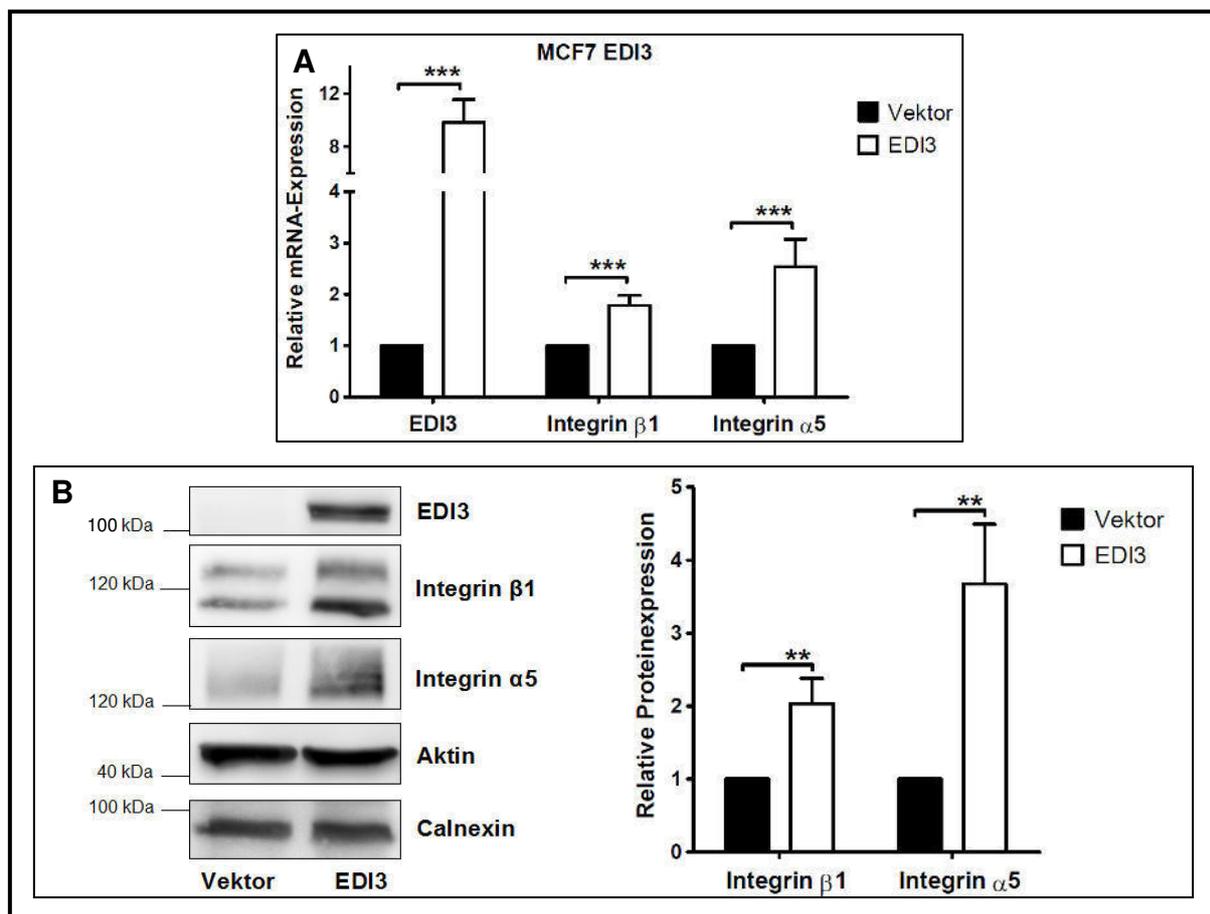


Abbildung 3.28: Die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen erhöht die Expression des FN-Rezeptors Integrin α 5 β 1. Eine Steigerung der EDI3-Expression in MCF7-Zellen führt zu einer Zunahme der Expression der Integrin-Untereinheiten β 1 und α 5 auf **A**) RNA- und **B**) Protein-Ebene. Dargestellt sind repräsentative Bilder einer Western Blot-Analyse (die endogene EDI3-Bande bei 80 kDa ist nicht abgebildet; Aktin und Calnexin dienen als Ladungskontrollen) sowie Mittelwerte und SD aus fünf (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. ** indiziert p < 0,01. *** indiziert p < 0,001.

Unter Berücksichtigung der differenzierten Effekte auf die Adhäsionsfähigkeit sowie die Integrin-Expression, die nach Knockdown von EDI3 mit zwei verschiedenen siRNA-Spezies in MCF7- und OVCAR3-Zellen beobachtet werden konnten, ist anzunehmen, dass insbesondere ein Zusammenhang zwischen herabgesetzter EDI3-Expression, der Reduktion der Integrin β 1-Expression und verschlechterter Adhäsion besteht.

3.6 EDI3 beeinflusst das Ausbreitungsverhalten von Tumorzellen auf FN

Nachdem in verschiedenen Zellmodellen neben einer Bedeutung von EDI3 für die PKC α -vermittelte Migration auch eine mögliche Rolle von EDI3 im Rahmen der Integrin-vermittelten Adhäsion beschrieben werden konnte, sollte das zeitliche Bindeglied zwischen diesen beiden ineinander übergehenden Prozessen untersucht werden. Hierzu wurde das Ausbreitungsverhalten von Tumorzellen auf einem zweidimensionalen Substrat, das sogenannte *Spreading*, direkt im Anschluss an die initiale Zelladhäsion näher analysiert. Erfolgreiches *Spreading* kann durch fortschreitende Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts charakterisiert werden und geht mit der Vergrößerung der Zellfläche durch die Ausbildung von Membranausstülpungen einher.

3.6.1 EDI3 beeinflusst die *Spreading*-Geschwindigkeit von Tumorzellen

Um einen Überblick über den zeitlichen Verlauf des *Spreadings* in den gewählten Zellmodellen zu bekommen, wurden MCF7- und OVCAR3-Zellen im Anschluss an den siRNA-Knockdown von EDI3 sowie EDI3-überexprimierende MCF7-Zellen analog zu den Experimenten zum Thema Zelladhäsion geerntet, auf FN replattiert und nach verschiedenen Zeitpunkten zur Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts fixiert und mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin gefärbt. Die mit Hilfe eines konfokalen Laserscan-Mikroskopes (Olympus) aufgenommenen Übersichtsbilder dieser Zeitreihen zeigten, dass sowohl in MCF7- (Abb. 3.29) als auch in OVCAR3-Zellen (Abb. 3.30) das *Spreading* durch die Herunterregulation von EDI3 deutlich verlangsamt wurde. Größtmögliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Knockdown-Zellen waren nach 1 h Adhäsionszeit zu erkennen, weshalb dieser Zeitpunkt für alle weiteren Analysen gewählt wurde. Nach einer längeren Adhäsionszeit von 4 h waren in beiden Zelllinien keine *Spreading*-Unterschiede mehr auszumachen.

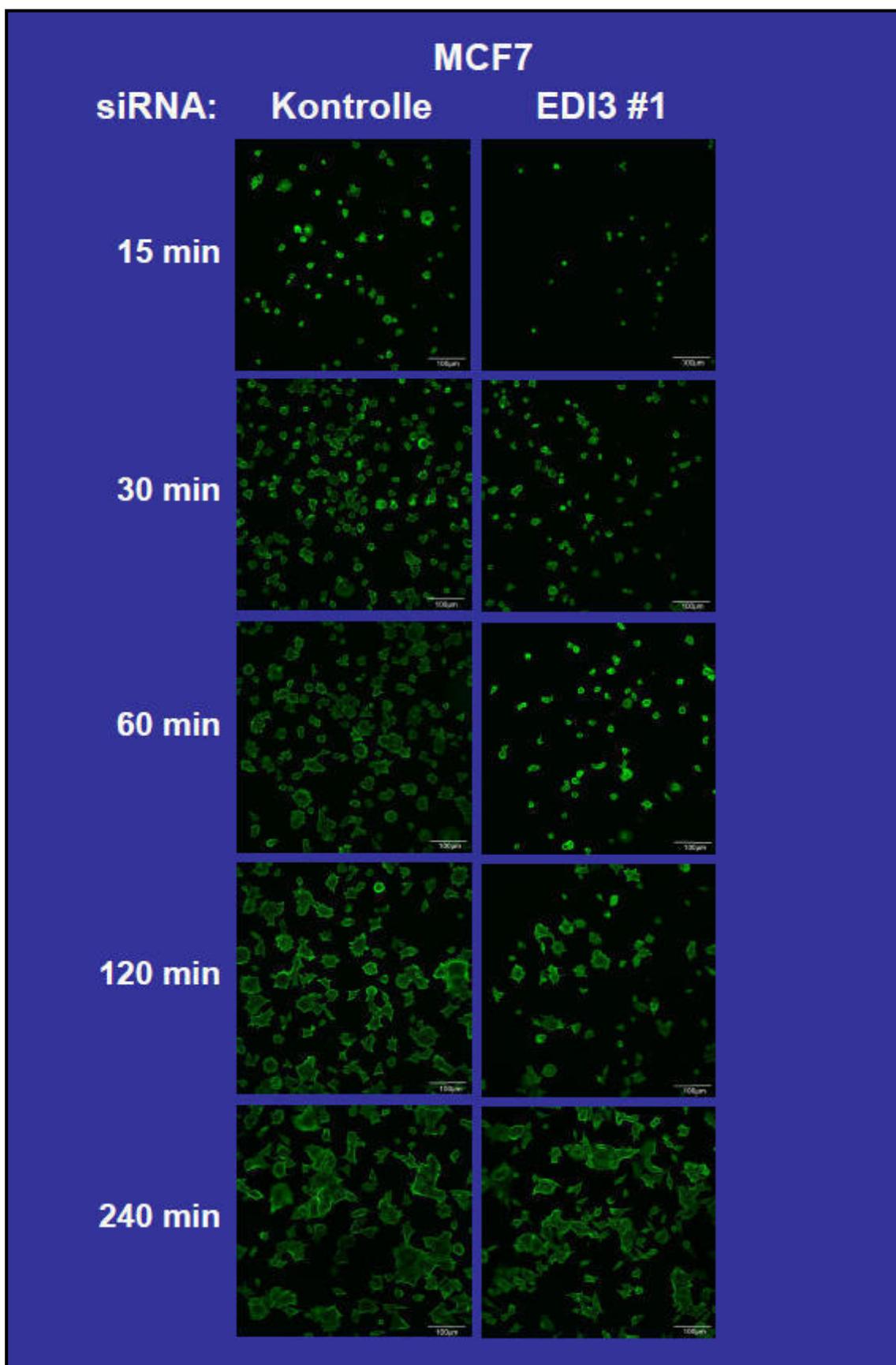


Abbildung 3.29: Der Knockdown von EDI3 verlangsamt das *Spreading* von MCF7-Zellen auf FN. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von MCF7-Zellen, die nach Knockdown von EDI3 auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach unterschiedlich langen Adhäsionszeiten fixiert und mit Phalloidin-Alexa488 (grün) gefärbt worden sind (Messbalken: 100 μm).

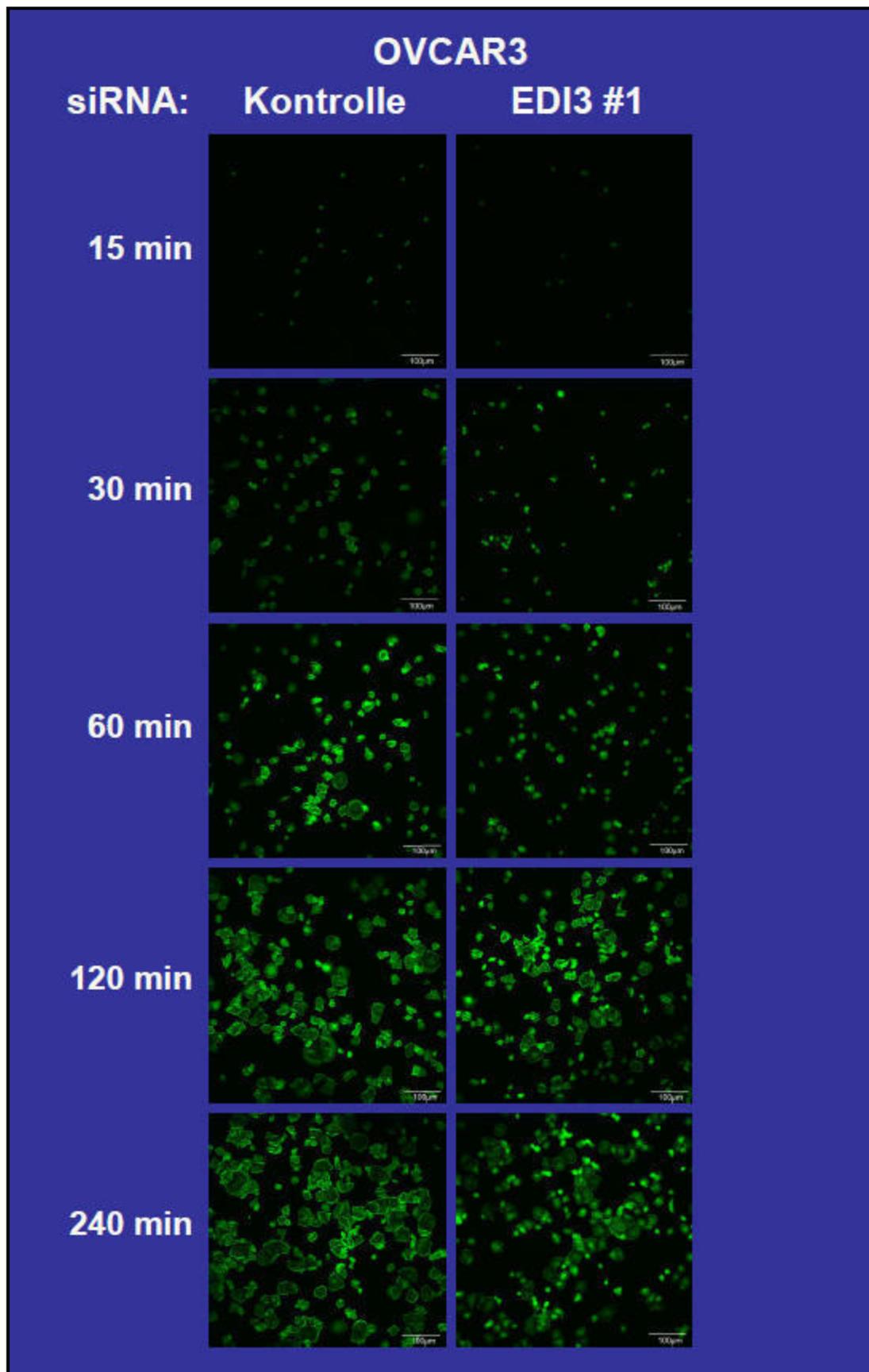


Abbildung 3.30: Der Knockdown von EDI3 verlangsamt das *Spreading* von OVCAR3-Zellen auf FN. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von OVCAR3-Zellen, die nach Knockdown von EDI3 auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach unterschiedlich langen Adhäsionszeiten fixiert und mit Phalloidin-Alexa488 (grün) gefärbt worden sind (Messbalken: 100 µm).

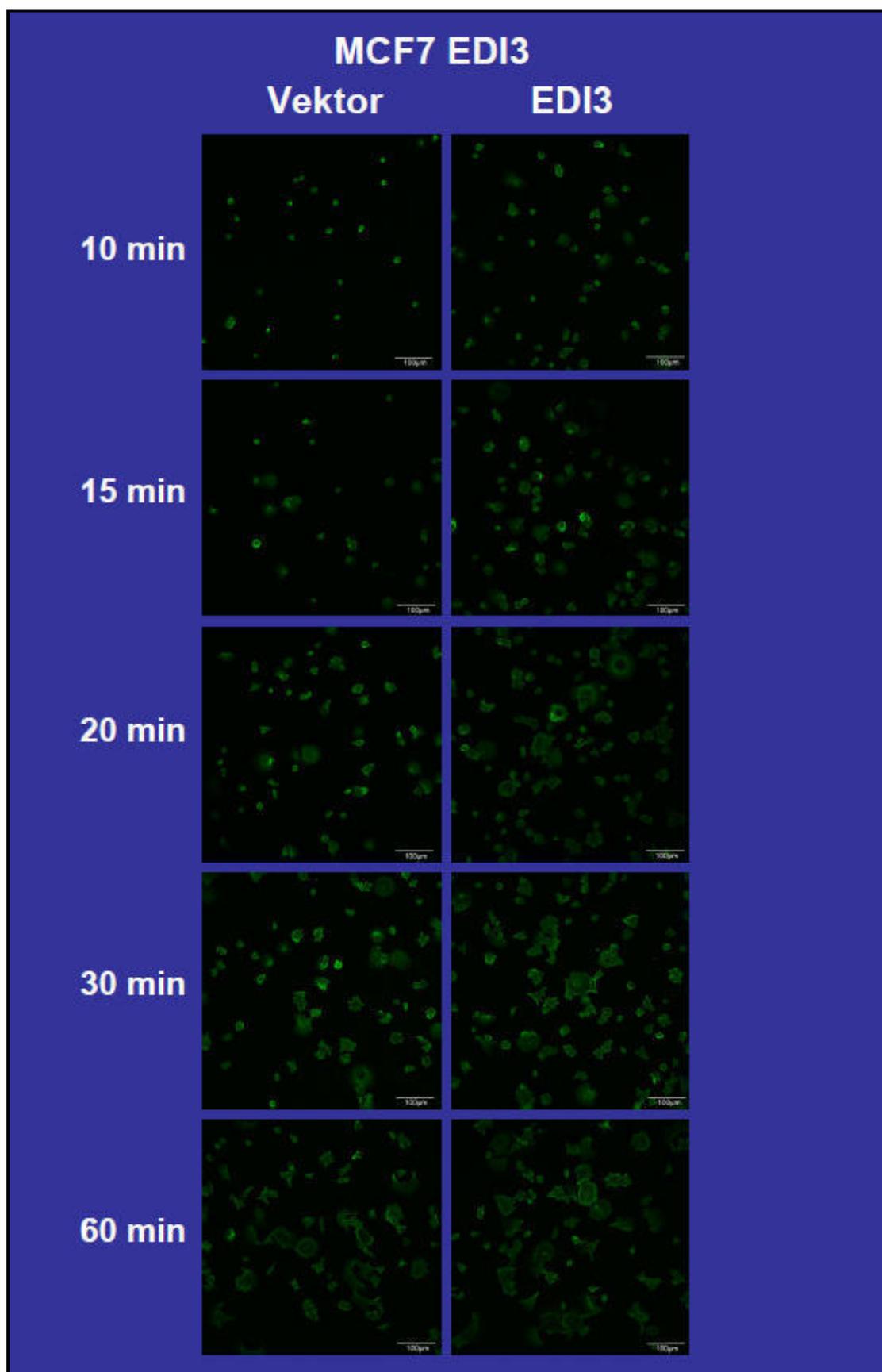


Abbildung 3.31: Die Überexpression von EDI3 beschleunigt das *Spreading* von MCF7-Zellen auf FN. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen, die auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach unterschiedlich langen Adhäsionszeiten fixiert und mit Rhodamin-Phalloidin (grün) gefärbt worden sind (Messbalken: 100 µm).

Die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen führte entsprechend zu einer Beschleunigung des *Spreading*s auf FN (Abb. 3.31). Gutes *Spreading* der EDI3-überexprimierenden Zellen war bereits nach 20 bis 30 min zu erkennen, während die Vektor-transfizierten Zellen 1 h benötigten, um auf dieses Niveau aufschließen zu können. Für alle weiteren Versuche wurde eine Adhäsionsdauer von 30 min zur Analyse von *Spreading*-Unterschieden gewählt.

3.6.2 Der Knockdown von EDI3 beeinträchtigt das *Spreading* von Tumorzellen

Um den Einfluss von EDI3 auf das *Spreading* von Tumorzellen und die Organisation ihres Aktin-Zytoskeletts zu verdeutlichen, wurden von MCF7- und OVCAR3-Zellen nach siRNA-Knockdown von EDI3 und einer Adhäsionszeit von 1 h auf FN auch vergrößerte Einzelzell-Bilder mit Hilfe eines konfokalen Laserscan-Mikroskopes (Olympus) aufgenommen. Während sich die Kontroll-Zellen im Fall von MCF7 (Abb. 3.32A) hauptsächlich unter Ausbildung eines Lamellipodiums und im Fall von OVCAR3 (Abb. 3.32B) zusätzlich unter Ausbildung von Stressfasern bereits auf dem Substrat ausgebreitet hatten und die Zellfläche entsprechend vergrößert erschien, war das *Spreading* der Knockdown-Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht weit fortgeschritten. MCF7-Zellen mit EDI3-Knockdown wiesen noch eine runde Morphologie auf (Abb. 3.32A), die durch das Fehlen jeglicher Membranausläufer bestimmt war. Das filamentöse Aktin war ausschließlich entlang der Zellmembran lokalisiert und zeichnete so die äußeren Umriss der Zellen nach; innerhalb der Zellen waren dagegen keinerlei netzwerkartige Aktinstrukturen zu erkennen. Die OVCAR3-Zellen mit EDI3-Knockdown schienen zu diesem Zeitpunkt schon etwas weiter zu sein, da sie bereits erkennbare Aktinstrukturen ausprägten und erste Stressfasern ausbildeten, wirkten jedoch insgesamt deutlich kleiner als die entsprechenden Kontroll-Zellen (Abb. 3.32B).

Mit Hilfe sogenannter *z-Stacks*, also zusammengesetzten Schichtaufnahmen einer Zelle in z-Richtung (Abb. 3.33/34), konnten neben der normalen Aufsicht auf eine zweidimensional dargestellte Zelle auch Querschnitte der Zellen entlang der x- bzw. y-Achse erstellt werden (Abb. 3.35A/B). Außerdem konnte die Oberflächenstruktur der Zellen anhand dieser Schichtaufnahmen rekonstruiert werden, um einen dreidimensionalen Eindruck der zellulären Morphologie zu vermitteln (Abb. 3.35C/D).

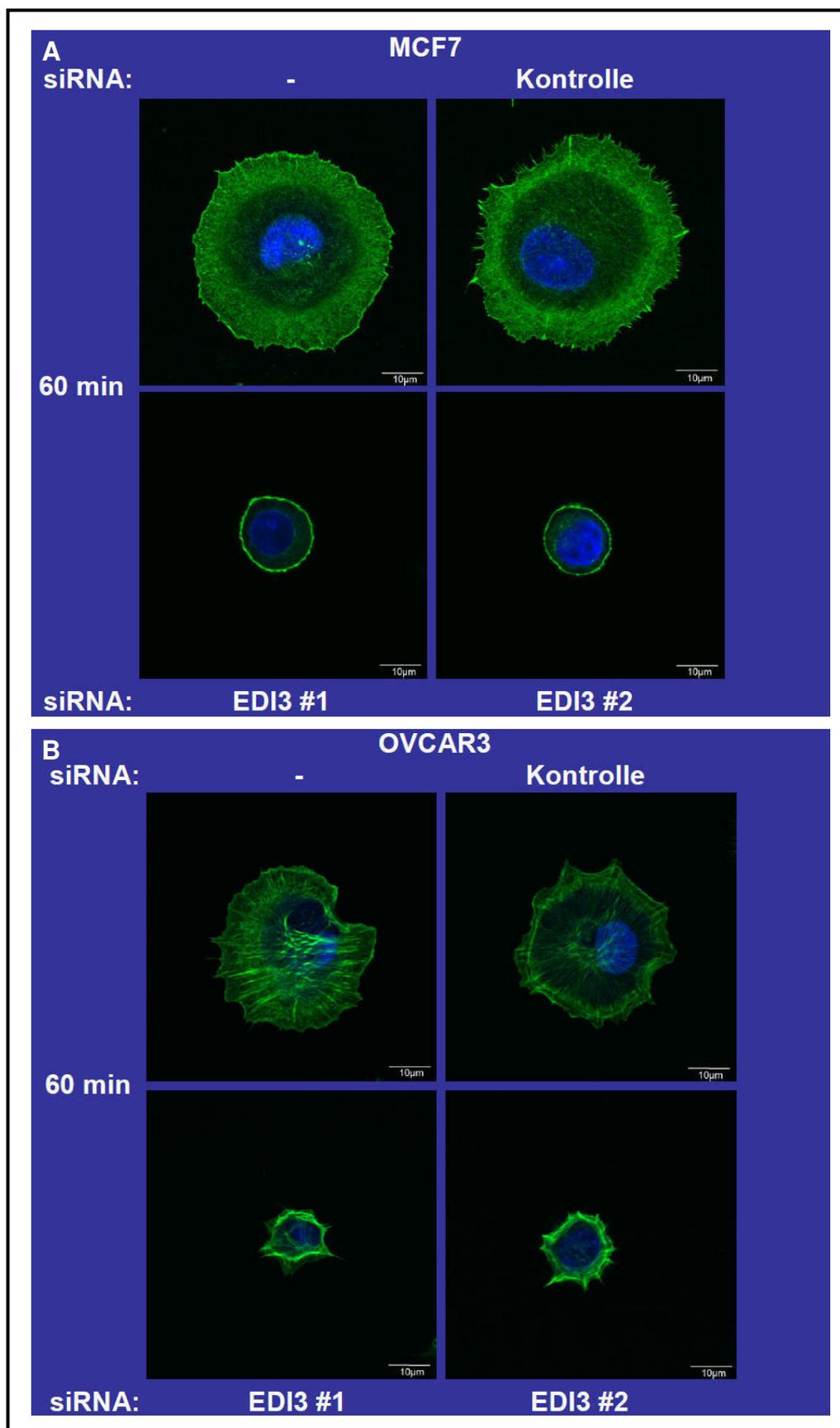


Abbildung 3.32: Der Knockdown von EDI3 beeinträchtigt das *Spreading* von Tumorzellen. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von **A)** MCF7- und **B)** OVCAR3-Zellen, die nach Knockdown von EDI3 auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach 1 h Adhäsionszeit mit DAPI (Zellkerne, blau) und Phalloidin-Alexa488 (Aktin, grün) gefärbt worden sind (Messbalken: 10 µm).

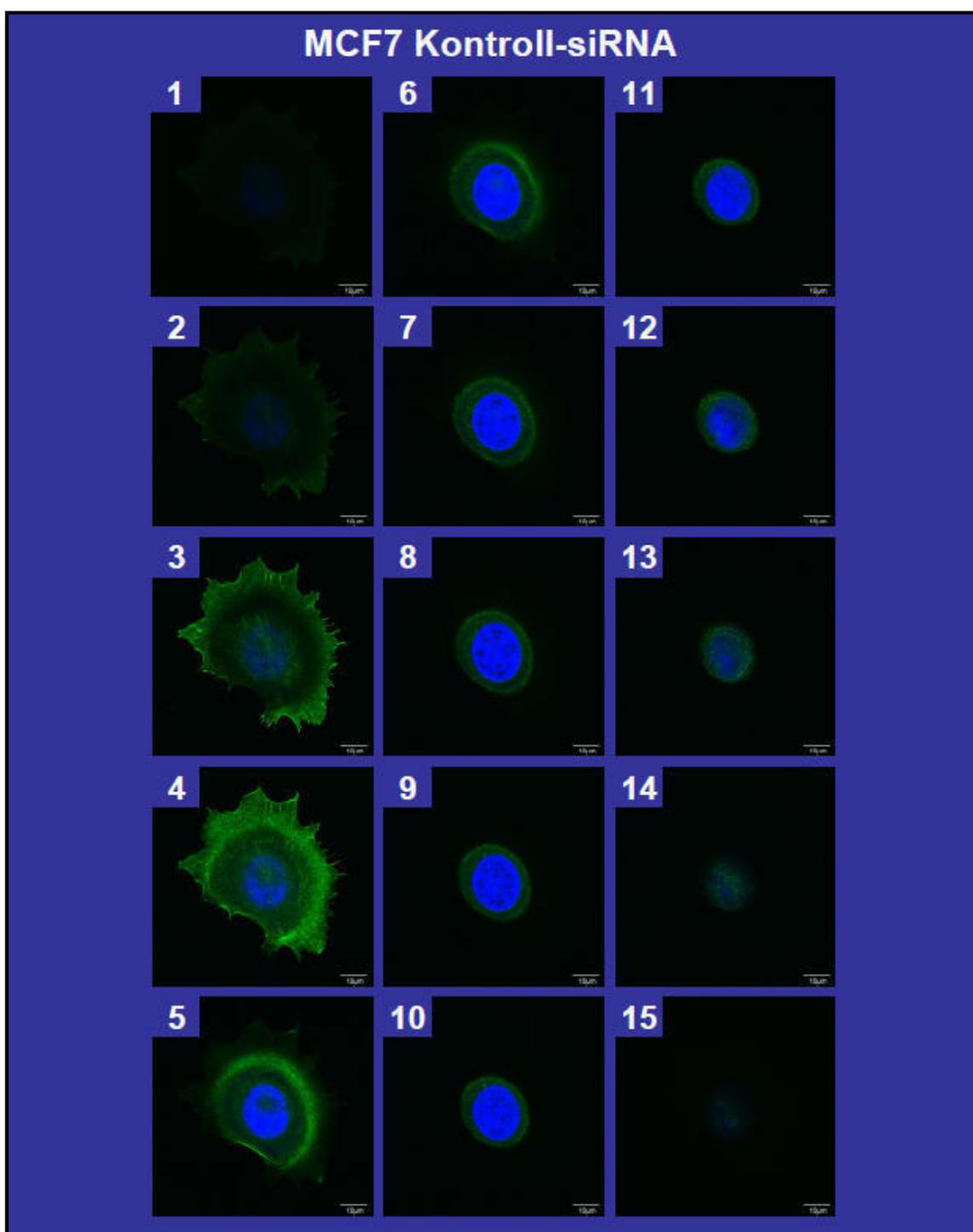


Abbildung 3.33: z-Stack einer MCF7-Kontroll-Zelle. Dargestellt sind die 15 einzelnen konfokalmikroskopischen Schichtaufnahmen (Abstand: 0,5 μm) eines repräsentativen z-Stacks einer MCF7-Zelle, die mit Kontroll-siRNA behandelt worden ist, nach 1 h Adhäsionszeit auf einer FN-Matrix (Messbalken: 10 μm ; blau: Zellkerne, DAPI; grün: Aktin, Phalloidin-Alexa488).

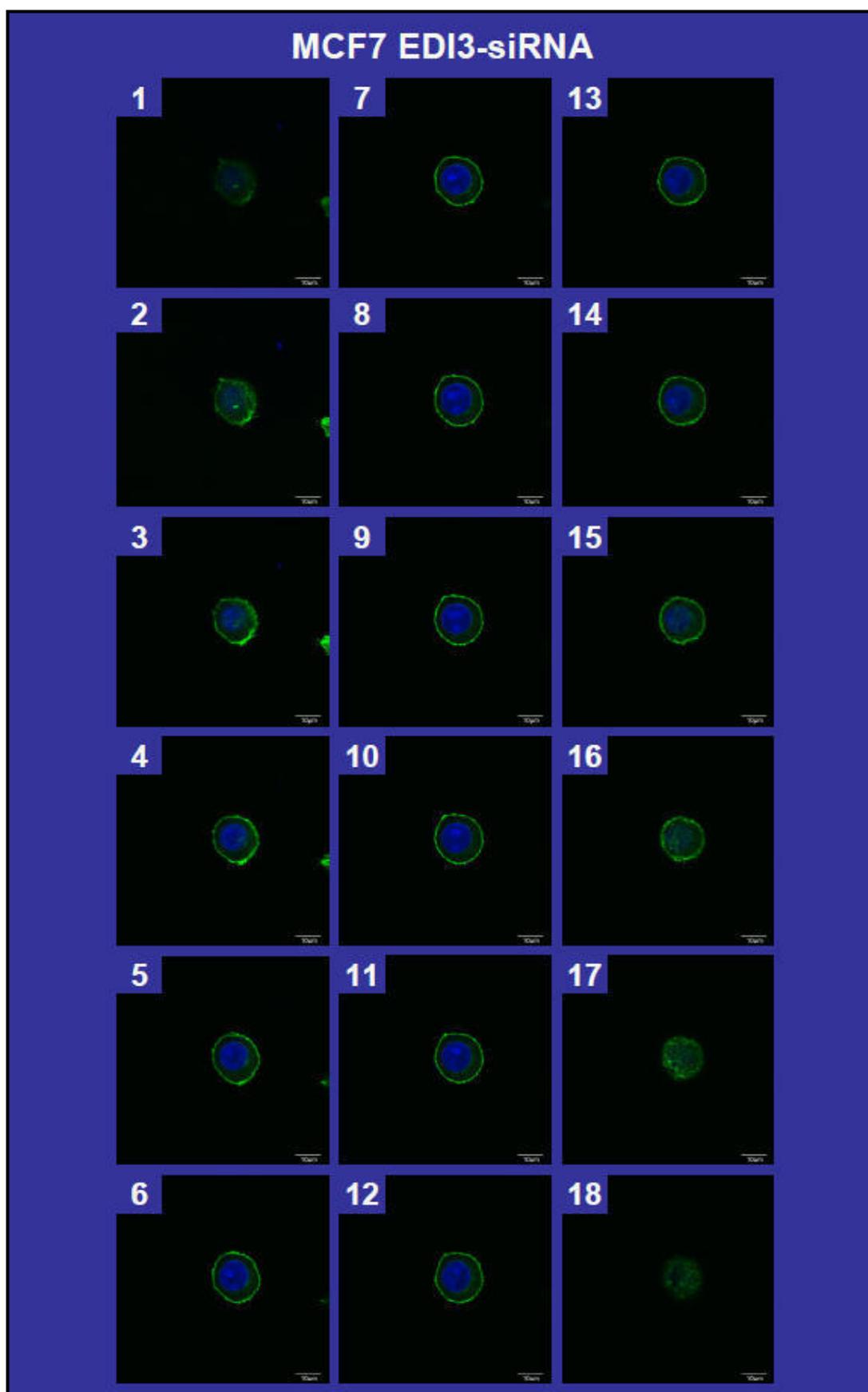


Abbildung 3.34: z-Stack einer MCF7-Zelle mit EDI3-Knockdown. Dargestellt sind die 18 einzelnen konfokalmikroskopischen Schichtaufnahmen (Abstand: 0,5 µm) eines repräsentativen z-Stacks einer MCF7-Zelle, die mit spezifischer EDI3-siRNA #1 behandelt worden ist, nach 1 h Adhäsionszeit auf einer FN-Matrix (Messbalken: 10 µm; blau: Zellkerne, DAPI; grün: Aktin, Phalloidin-Alexa488).

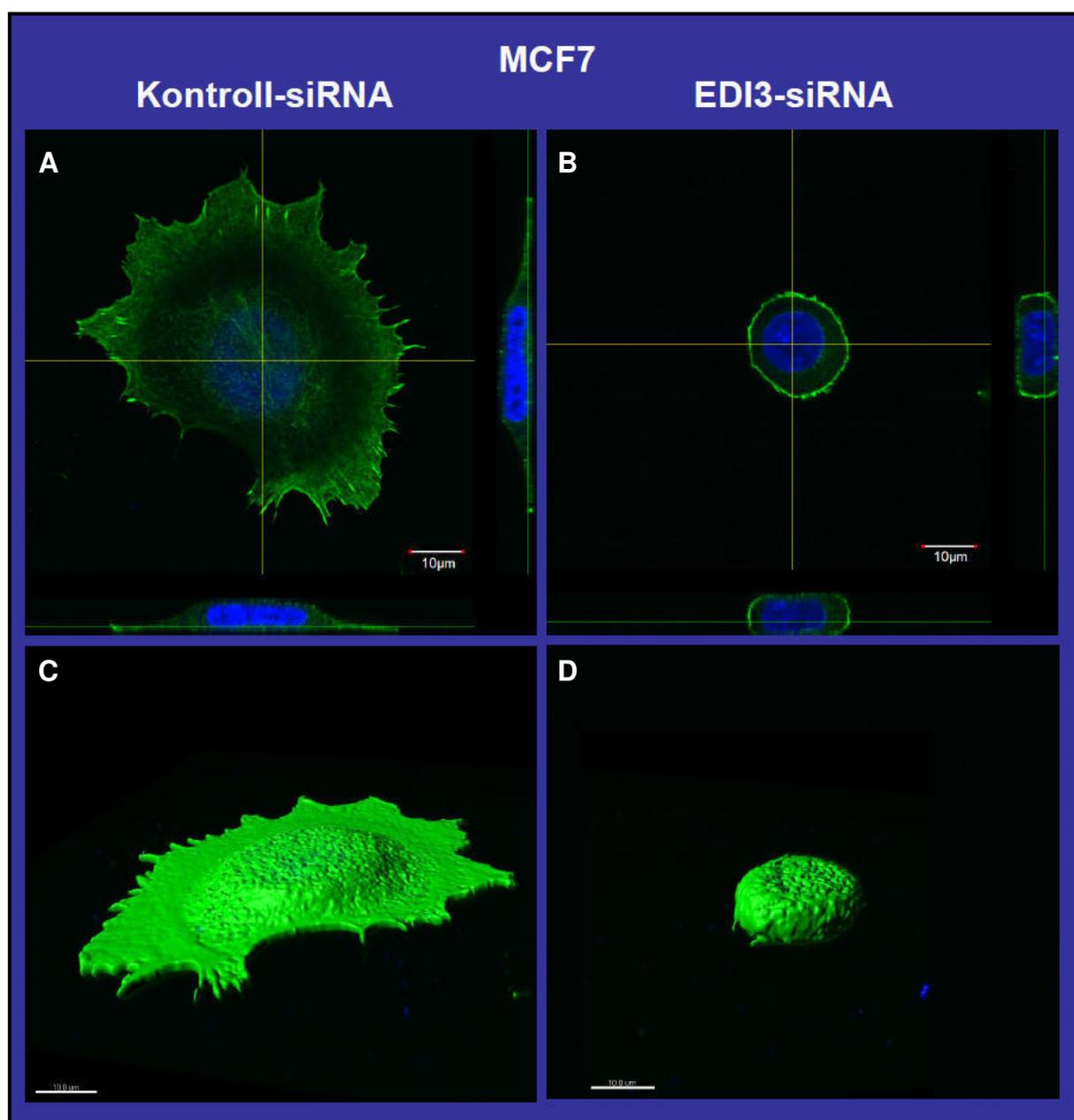


Abbildung 3.35: Verschiedene Darstellungsweisen von MCF7-Zellen während des *Spreading*. MCF7-Zellen wurden nach siRNA-Knockdown von EDI3 für 1 h auf einer FN-Matrix replattiert und das *Spreading* mittels konfokalmikroskopischer *z-Stack*-Aufnahmen Fluoreszenz-gefärbter Zellen analysiert (Messbalken: 10 µm; blau: Zellkerne, DAPI; grün: Aktin, Phalloidin-Alexa488). Dargestellt sind die Aufsicht sowie der Querschnitt jeweils einer repräsentativen MCF7-Zelle ohne (**A**) bzw. mit (**B**) EDI3-Knockdown sowie die dazugehörigen 3D-Zelloberflächen-Rekonstruktionen (**C, D**).

So konnte eindrucksvoll veranschaulicht werden, dass die Kontroll-Zellen in diesem Stadium des *Spreading* am ehesten als „spiegeleiförmig“ bezeichnet werden konnten (Abb. 3.35A); der Zellkörper mit dem Nukleus und dem Hauptanteil des Zytosols war beidseitig umgeben von etwa 1 µm flachen Aktin-reichen Membranausläufern, die kaum etwas zum Volumen der Zelle beitrugen, wie hier am Beispiel der MCF7-Zellen dargestellt ist. Die Zellen mit EDI3-Knockdown zeigten

dagegen eine kompaktere Morphologie. Nachdem die EDI3-bedingten Unterschiede in der Zellmorphologie von Tumorzellen während des *Spreadings* mit Hilfe verschiedener konfokalmikroskopischer Aufnahmen qualitativ beschrieben worden waren, sollten die Effekte nun auch quantitativ ausgewertet werden.

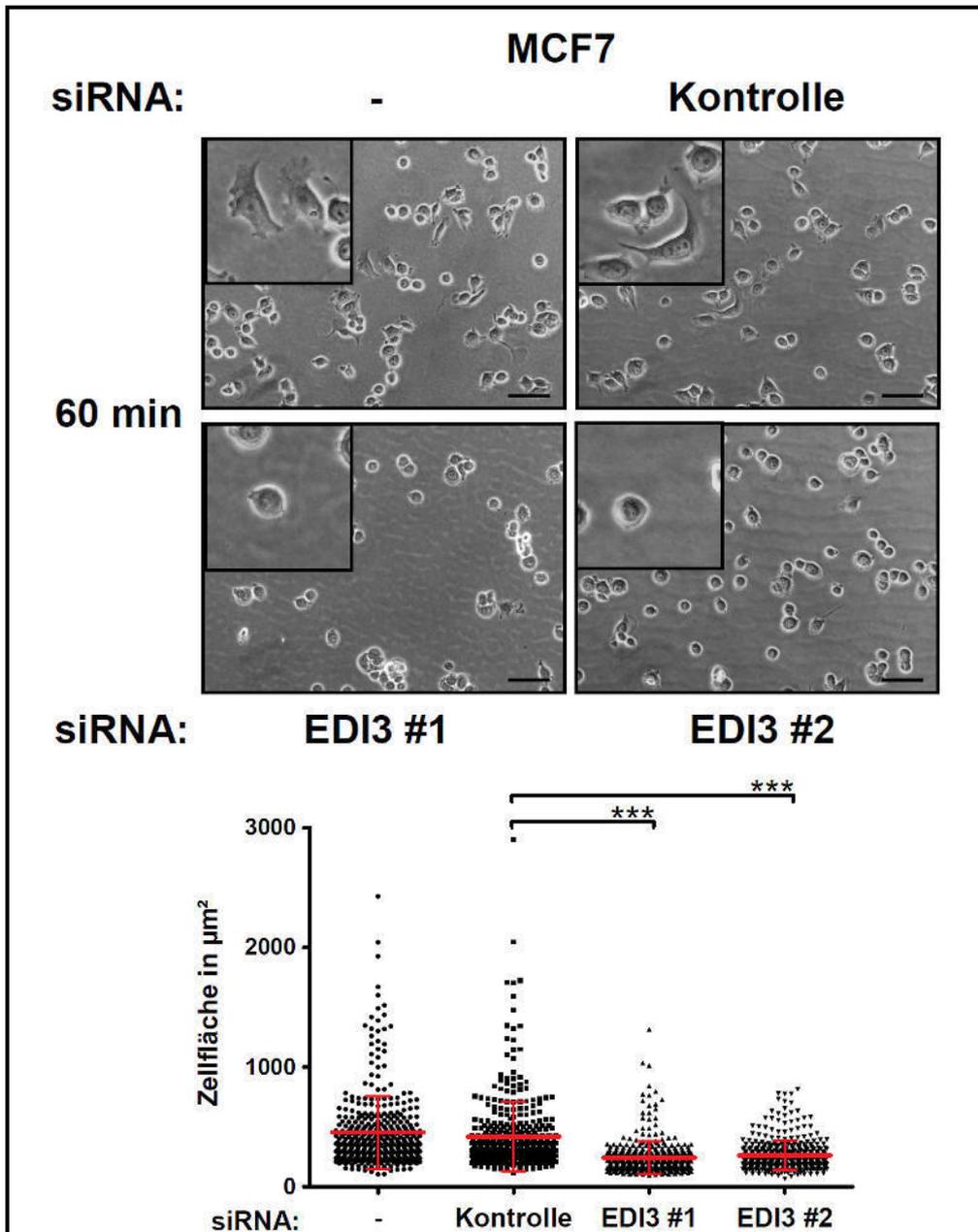


Abbildung 3.36: Der Knockdown von EDI3 in MCF7-Zellen führt zu verminderter Zellgröße während des *Spreadings*. Während Kontroll-Zellen nach 1 h Adhäsionszeit auf einer FN-Matrix bereits Membranausläufer ausbilden und ihre Zellfläche dadurch stark vergrößert wird, behalten MCF7-Zellen mit EDI3-Knockdown eine runde Morphologie bei und wirken deutlich kleiner. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen (Messbalken: 50 μm ; vergrößert in *Inserts*) sowie die Quantifizierung der Zellgröße als Mittelwerte und SD kalkuliert anhand von jeweils 100 Zellen aus vier unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt in der Grafik repräsentiert dabei eine einzelne gemessene Zelle. *** indiziert $p < 0,001$.

Hierzu wurden MCF7- und OVCAR3-Zellen nach siRNA-Knockdown von EDI3 wie zuvor für 1 h auf einer FN-Matrix replattiert. Diesmal wurden die Bilder der fixierten Zellen allerdings ohne vorherige Färbung mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskopes (Nikon) aufgenommen und anhand dieser Bilder die Größe von 100 zufällig ausgewählten Zellen pro Bedingung und Experiment bestimmt.

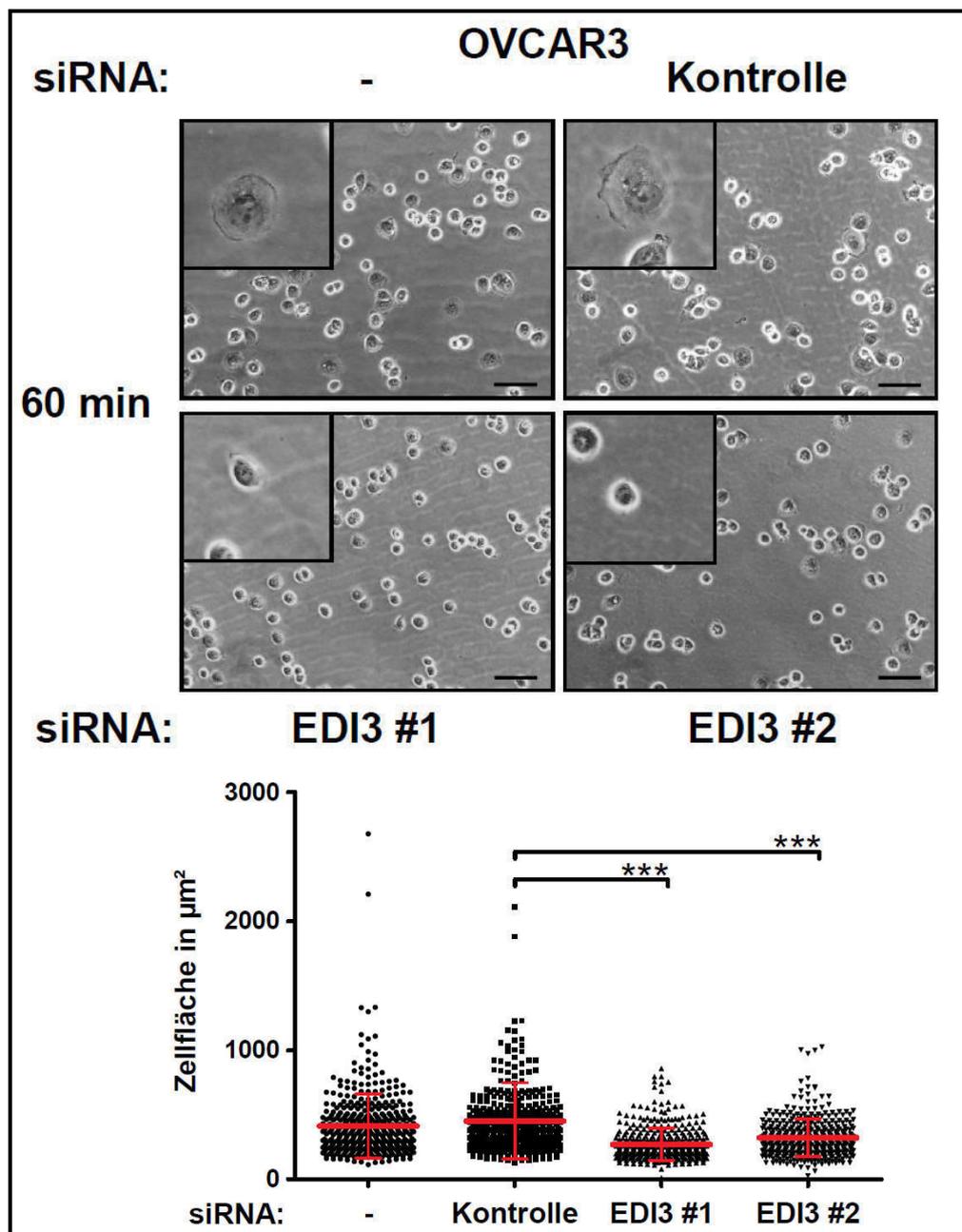


Abbildung 3.37: Der Knockdown von EDI3 in OVCAR3-Zellen führt zu verminderter Zellgröße während des *Spreadings*. OVCAR3-Zellen behalten nach 1 h Adhäsionszeit auf einer FN-Matrix insgesamt eine runde Morphologie bei; die Zellfläche von Kontroll-Zellen ist allerdings verglichen mit der von Zellen mit EDI3-Knockdown stark vergrößert. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen (Messbalken: 50 µm; vergrößert in *Inserts*) sowie die Quantifizierung der Zellgröße als Mittelwerte und SD kalkuliert anhand von jeweils 100 Zellen aus vier unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt in der Grafik repräsentiert dabei eine einzelne gemessene Zelle. *** indiziert $p < 0,001$.

Auch anhand dieser Phasenkontrast-Aufnahmen konnten die Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen Kontroll-Zellen und Zellen mit EDI3-Knockdown bestätigt werden. Die Ausbildung von Membranausläufern in MCF7-Zellen, die zu einer starken Vergrößerung der Fläche von Kontroll-Zellen führte, blieb in EDI3-defizienten Zellen weitgehend aus, so dass diese Zellen insgesamt als signifikant kleiner beschrieben werden konnten (Abb. 3.36). Im Gegensatz zu MCF7-Zellen behielten OVCAR3-Zellen im Laufe des *Spreadings* immer eine runde Morphologie bei (Abb. 3.37). Die Kontroll-Zellen erschienen allerdings ausgebreitet und abgeflacht, was bei den OVCAR3-Zellen mit EDI3-Knockdown nicht der Fall war, so dass auch hier eine signifikante Reduktion der Zellfläche verzeichnet werden konnte.

3.6.3 Die Überexpression von EDI3 verbessert das *Spreading* von Tumorzellen

Um die bei Untersuchung der siRNA-Knockdowns identifizierte Bedeutung von EDI3 für das *Spreading* von Tumorzellen zusätzlich aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten, wurde auch das *Spreading* von stabil transfizierten EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen näher analysiert. Eine *Spreading*-Zeitreihe in Kombination mit Phalloidin-färbungen hatte bereits erste Unterschiede aufgezeigt; die erhöhte EDI3-Expression konnte im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontroll-Zellen das *Spreading* auf einer FN-Matrix beschleunigen (vgl. Abb. 3.31). Dies konnte durch weitere konfokalmikroskopische Aufnahmen einzelner Phalloidin-gefärbter MCF7-Zellen nach einer Adhäsionszeit von 30 min veranschaulicht werden.

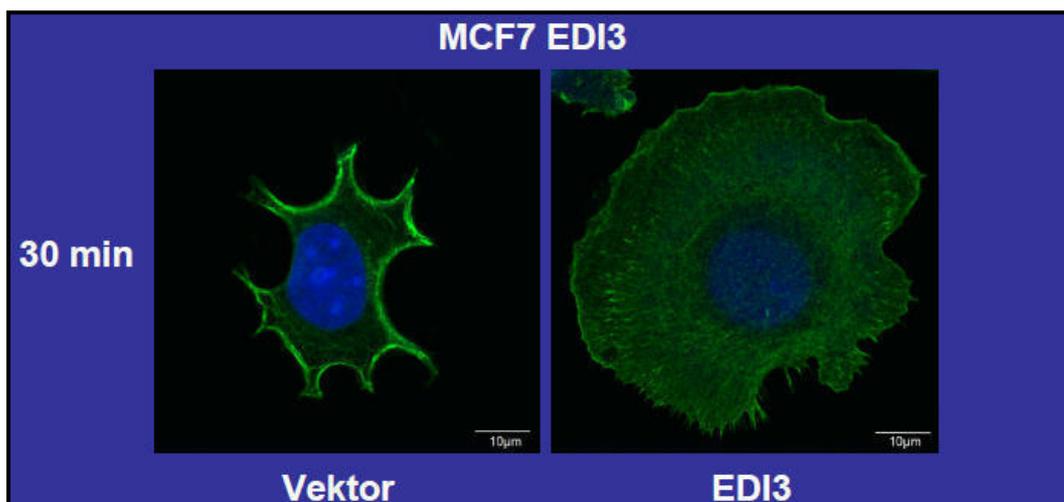


Abbildung 3.38: Die Überexpression von EDI3 verbessert das *Spreading* von Tumorzellen. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder stabil transfizierter EDI3-überexprimierender Zellen, die auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach 30 min Adhäsionszeit mit DAPI (Zellkerne, blau) und Rhodamin-Phalloidin (Aktin, grün) gefärbt worden sind (Messbalken: 10 μm).

Während Kontroll-Zellen zu diesem Zeitpunkt gerade erst mit der Ausbildung von Membranausläufern begannen, konnte in EDI3-überexprimierenden Zellen bereits ein voll ausgebildetes Lamellipodium beobachtet werden, das dramatisch zur Vergrößerung der Zellfläche beitrug (Abb. 3.38). Diese qualitativen Unterschiede konnten anhand von Phasenkontrast-Aufnahmen ungefärbter Zellen bestätigt und weitergehend auch quantitativ beschrieben werden (Abb. 3.39). Die erhöhte EDI3-Expression führte in den MCF7-Zellen insgesamt zu einer Verschiebung der Größenverteilung hin zu höheren Messwerten und somit nahezu zu einer Verdopplung der mittleren Zellfläche von rund 400 auf 700 μm^2 .

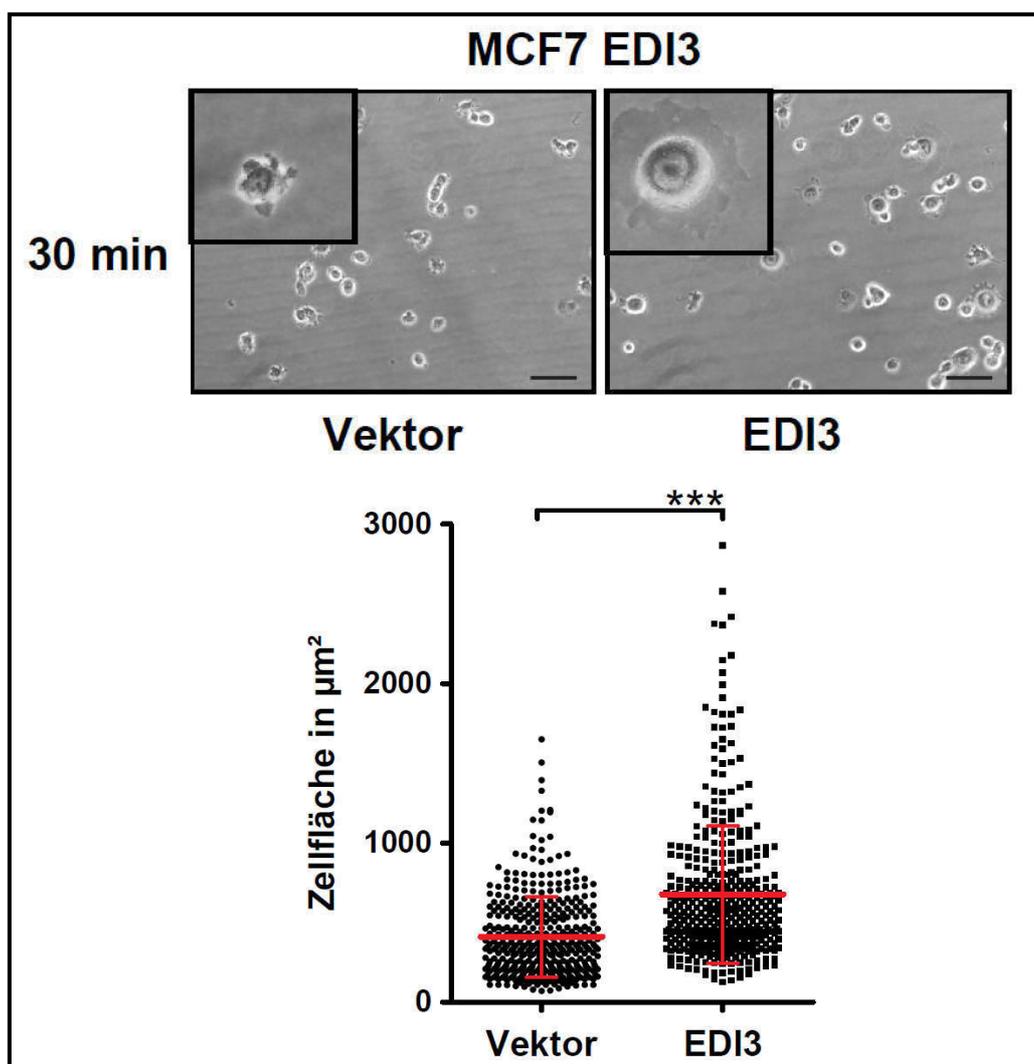


Abbildung 3.39: Die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen führt zu einer Vergrößerung der Zellfläche während des *Spreadings*. Während EDI3-überexprimierende MCF7-Zellen nach 30 min Adhäsionszeit auf einer FN-Matrix bereits ein Lamellipodium ausbilden und ihre Zellfläche dadurch stark vergrößert wird, erscheinen Kontroll-Zellen ohne Membranausläufer deutlich kleiner. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen (Messbalken: 50 μm ; vergrößert in *Inserts*) sowie die Quantifizierung der Zellgröße als Mittelwerte und SD kalkuliert anhand von jeweils 100 Zellen aus vier unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt in der Grafik repräsentiert dabei eine einzelne gemessene Zelle. *** indiziert $p < 0,001$.

3.6.4 EDI3 hat keinen Einfluss auf die Aktivität von Rac1 oder RhoA

Nachdem phänotypische Unterschiede identifiziert worden waren, die einen Zusammenhang zwischen der Modulation der EDI3-Expression und dem zeitlichen Verlauf des *Spreadings* von Tumorzellen aufzeigen konnten, sollte auch die Rolle von EDI3 im Rahmen möglicher zugrunde liegender Signalmechanismen untersucht werden. Da Rho-GTPasen als zentrale Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts und somit auch des *Spreadings* bekannt sind, sollte zunächst mit Hilfe spezifischer Affinitäts-basierter Aktivitätsassays überprüft werden, ob Veränderungen der EDI3-Expression die GTP-Beladung beeinflussen können. Hierzu wurden MCF7- und OVCAR3-Zellen nach EDI3-Knockdown sowie EDI3-überexprimierende MCF7-Zellen auf einer FN-Matrix replattiert und die anschließend gewonnenen Gesamt-Zelllysate durch eine Kombination aus *Pulldown*-Assay, SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

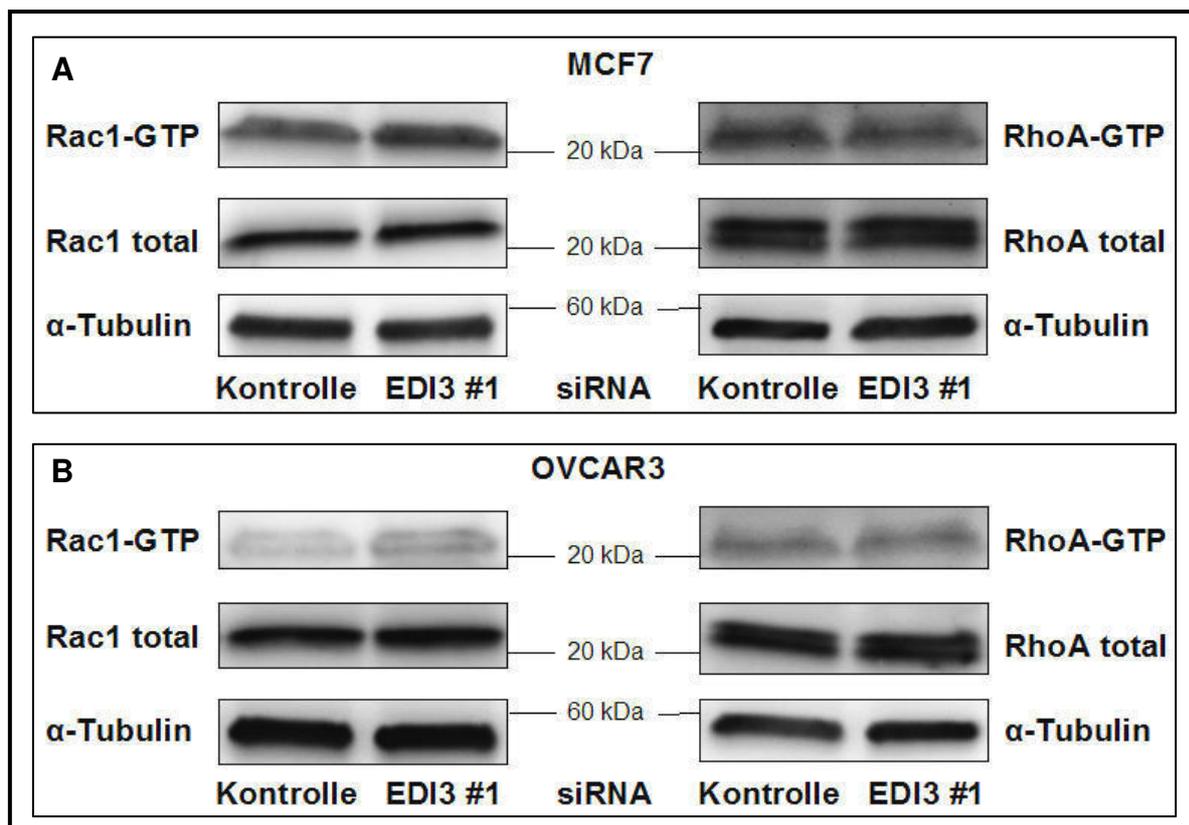


Abbildung 3.40: Der Knockdown von EDI3 hat keinen Einfluss auf die GTP-Beladung der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA. Eine transiente Reduktion der EDI3-Expression mittels siRNA-Knockdown hat nach Replattieren auf einer FN-Matrix und einer Adhäsionszeit von 1 h weder in **A**) MCF7- noch in **B**) OVCAR3-Zellen einen Einfluss auf die GTP-Beladung und somit die Aktivität der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western Blot-Analysen (α -Tubulin dient als Ladungskontrolle).

Aufgrund der anhand der Phalloidininfärbungen gewonnenen Erkenntnisse über die Aktinstrukturen, die in den untersuchten Zellmodellen hauptsächlich vorzufinden waren, beschränkten sich diese Analysen auf die Rho-GTPasen Rac1 (assoziiert mit der Ausbildung von Lamellipodien) und RhoA (assoziiert mit der Ausbildung von Stressfasern). Der Knockdown von EDI3 hatte erstaunlicherweise weder in MCF7- (Abb. 3.40A) noch in OVCAR3-Zellen (Abb. 3.40B) einen Einfluss auf die Aktivität dieser beiden Rho-GTPasen. Die Modulation der EDI3-Expression zog in beiden Zelllinien keine signifikanten Veränderungen der GTP-Beladung von Rac1 oder RhoA nach sich. Auch in den EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen waren gegenüber den Vektor-transfizierten Kontroll-Zellen keine Unterschiede in der Aktivität von Rac1 oder RhoA zu beobachten (Abb. 3.41); die GTP-Beladung dieser beiden Rho-GTPasen blieb unverändert.

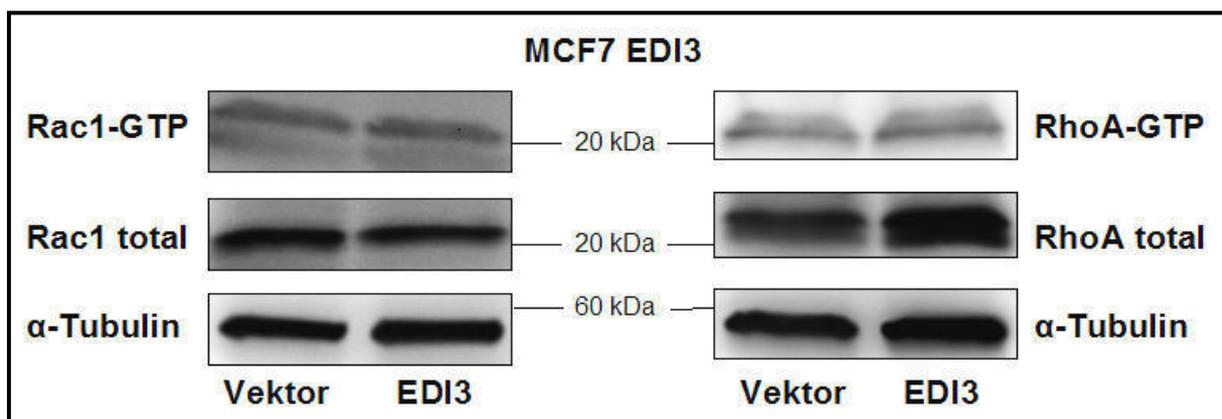


Abbildung 3.41: Die Überexpression von EDI3 hat keinen Einfluss auf die GTP-Beladung der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA. In EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen war nach Replattieren auf einer FN-Matrix und einer Adhäsionszeit von 30 min die GTP-Beladung und somit die Aktivität der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontroll-Zellen unverändert. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western Blot-Analysen (α -Tubulin dient als Ladungskontrolle).

Für die vollständige Aktivierung der Rho-GTPasen ist neben ihrer Beladung mit GTP auch die Translokation aus dem Zytosol zur Plasmamembran notwendig. Um einen direkten Einfluss von EDI3 auf die Aktivierung von Rac1 und RhoA, der die phänotypischen Unterschiede im *Spreading* der verwendeten Zellmodelle erklären könnte, weiter auszuschließen, wurde außerdem die intrazelluläre Lokalisation dieser beiden Rho-GTPasen untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Tumorzellen nach siRNA-Knockdown von EDI3 für 1 h auf einer FN-Matrix replattiert und die anschließend gewonnenen subfraktionierten Zelllysate anhand von Immunoblots

analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass weder in EDI3-defizienten MCF7- (Abb. 3.42A) noch in OVCAR3-Zellen (Abb. 3.42B) eine Veränderung der GTPase-Lokalisation zu beobachten war; das Zytosol/Membran-Verhältnis von Rac1 und RhoA blieb im Vergleich zu Kontroll-Zellen unverändert.

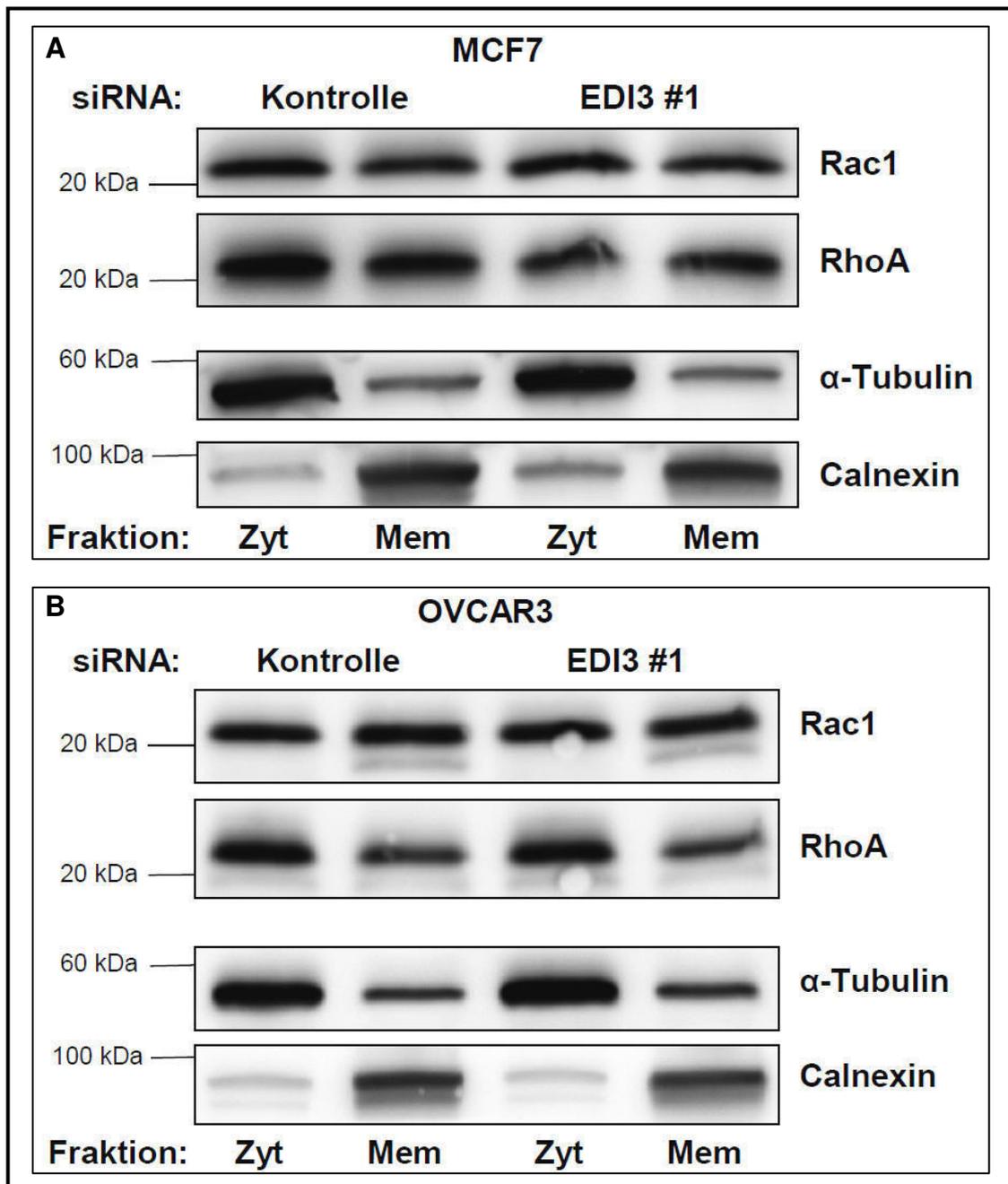


Abbildung 3.42: Der Knockdown von EDI3 hat keinen Einfluss auf die Membran-Translokation der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA. Eine transiente Reduktion der EDI3-Expression mittels siRNA-Knockdown hat nach Replattieren auf einer FN-Matrix (abweichend auf FN-beschichteten Kulturschalen von BD Biosciences) und einer Adhäsionszeit von 1 h weder in **A**) MCF7- noch in **B**) OVCAR3-Zellen einen Einfluss auf die Lokalisation der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western Blot-Analysen (α -Tubulin dient als Ladungskontrolle der Zytosol-Fraktion; Calnexin dient als Ladungskontrolle der Membran-Fraktion).

3.6.5 EDI3 beeinflusst die Ausbildung Fokaler Adhäsionen unabhängig von der FAK-Src-Kaskade

Nachdem eine unmittelbare Bedeutung von EDI3 für die Aktivierung der beiden wichtigen Rho-GTPasen Rac1 und RhoA als mechanistischer Hintergrund für die beobachteten *Spreading*-Unterschiede ausgeschlossen werden konnte, sollte der Einfluss von EDI3 auf weitere möglicherweise involvierte Signalproteine untersucht werden. Aufgrund ihrer wichtigen Funktionen im Rahmen der Signalweiterleitung ausgehend von den Integrinen hin zum Aktin-Zytoskelett sollten beispielhaft die in der Literatur vielfältig beschriebenen Kinasen FAK und Src sowie das Adapterprotein Paxillin und, als direkter Verantwortlicher für die zur Fortbewegung von Zellen notwendige Aktin-Myosin-Kontraktion, die regulatorische leichte Kette des Myosins (MLC) analysiert werden. Da diese Signalproteine neben ihrer Lokalisierung insbesondere durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden, sollten eventuell nach EDI3-Modulation auftretende Unterschiede in ihrer Phosphorylierung anhand von Immunoblots aufgeklärt werden. Hierzu wurden MCF7- (Abb. 3.43A) und OVCAR3-Zellen (Abb. 3.43C) nach EDI3-Knockdown sowie EDI3-überexprimierende MCF7-Zellen (Abb. 3.43B) auf einer FN-Matrix replattiert und nach einer Adhäsionszeit von 60 bzw. 30 min Gesamt-Zelllysate hergestellt. Unerwarteterweise führten die Veränderungen der EDI3-Expression in keinem der verwendeten Zellmodelle zu signifikanten Unterschieden in der Phosphorylierung von FAK, Src, Paxillin oder MLC (Abb. 3.43). Obwohl kein Zusammenhang zwischen EDI3 und der Aktivität dieser verschiedenen Signalproteine zu bestehen schien, wurde zusätzlich die Ausbildung Fokaler Adhäsionen (FAs) im Rahmen des *Spreadings* mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen des FA-assoziierten Proteins Paxillin untersucht. Die entsprechenden konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigten einen deutlichen Einfluss von EDI3 auf die Ausbildung von FAs.

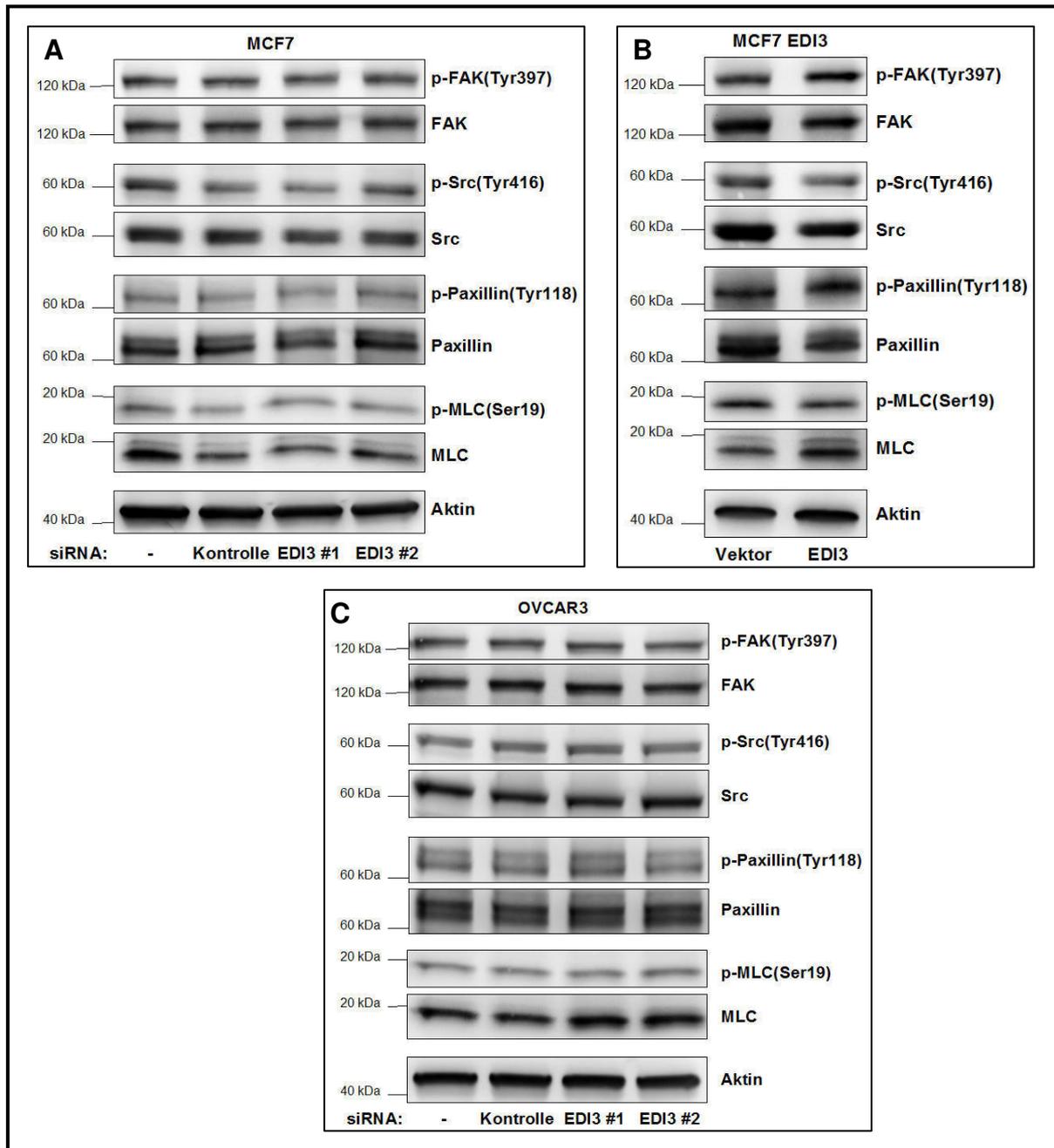


Abbildung 3.43: EDI3 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Signalproteine FAK, Src, Paxillin und MLC. Eine transiente Reduktion der EDI3-Expression mittels siRNA-Knockdown hat nach Replattieren auf einer FN-Matrix und einer Adhäsionszeit von 1 h weder in **A**) MCF7- noch in **C**) OVCAR3-Zellen einen Einfluss auf die Phosphorylierung von FAK, Src, Paxillin und MLC. **B**) Auch in EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen sind nach Replattieren auf einer FN-Matrix und einer Adhäsionszeit von 30 min keine Phosphorylierungs-Unterschiede dieser Signalproteine zu erkennen. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Western Blot-Analysen (Aktin dient als Ladungskontrolle).

Der siRNA-Knockdown von EDI3 hatte nach 1 h Adhäsionszeit auf einer FN-Matrix sowohl in MCF7- (Abb. 3.44) als auch in OVCAR3-Zellen (Abb. 3.45) eine deutliche Abnahme der Anzahl von FAs pro Zelle zur Folge; die vorhandenen FAs waren dagegen deutlich größer als in den jeweiligen Kontroll-Zellen.

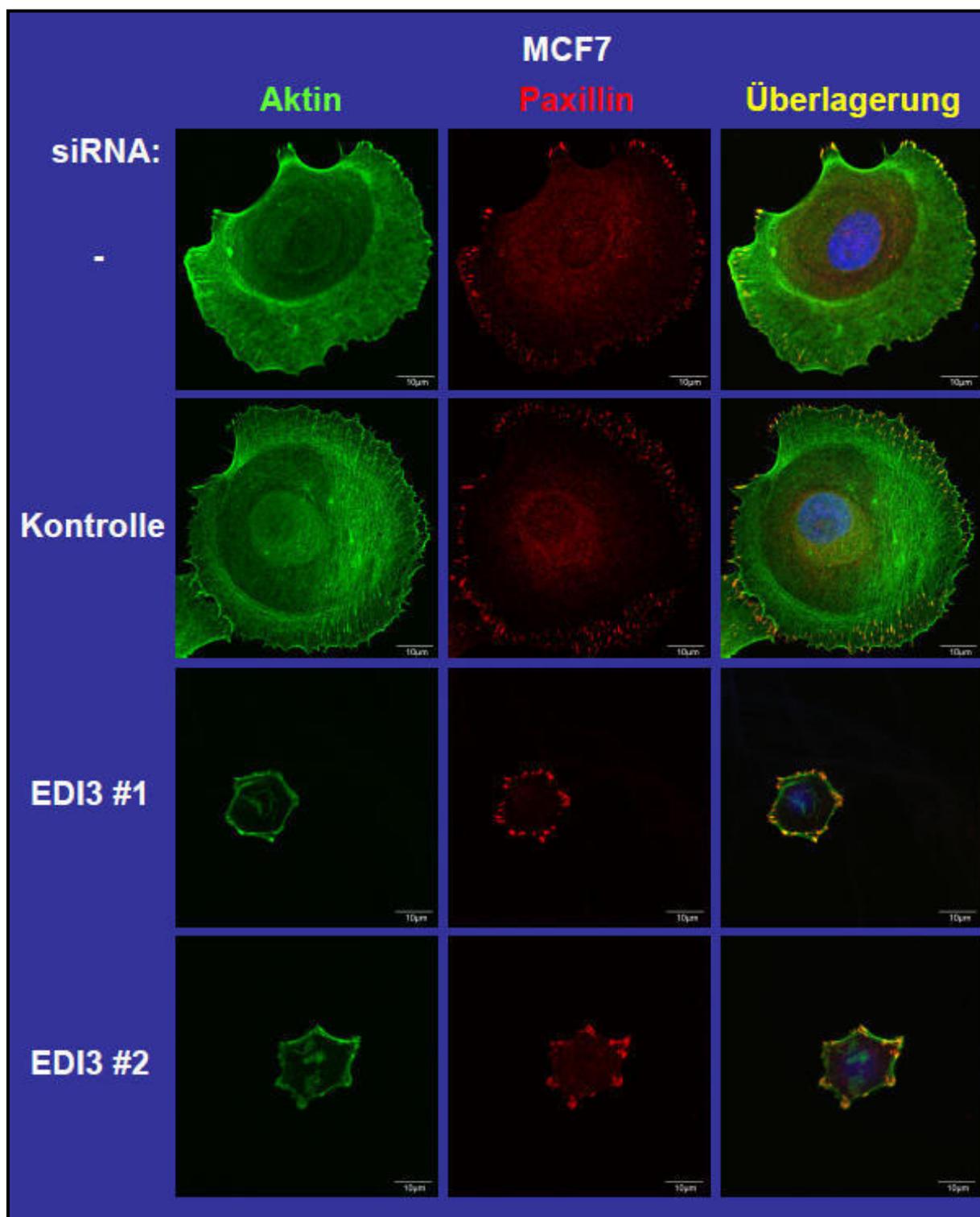


Abbildung 3.44: Der Knockdown von EDI3 führt in MCF7-Zellen zur Ausbildung weniger, dafür aber größerer Fokaler Adhäsionen. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von MCF7-Zellen, die nach Knockdown von EDI3 auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach 1 h Adhäsionszeit mit DAPI (Zellkerne, blau), Phalloidin-Alexa488 (Aktin, grün) und Paxillin-Alexa647 (Fokale Adhäsionen, rot) gefärbt worden sind (Messbalken: 10 µm).

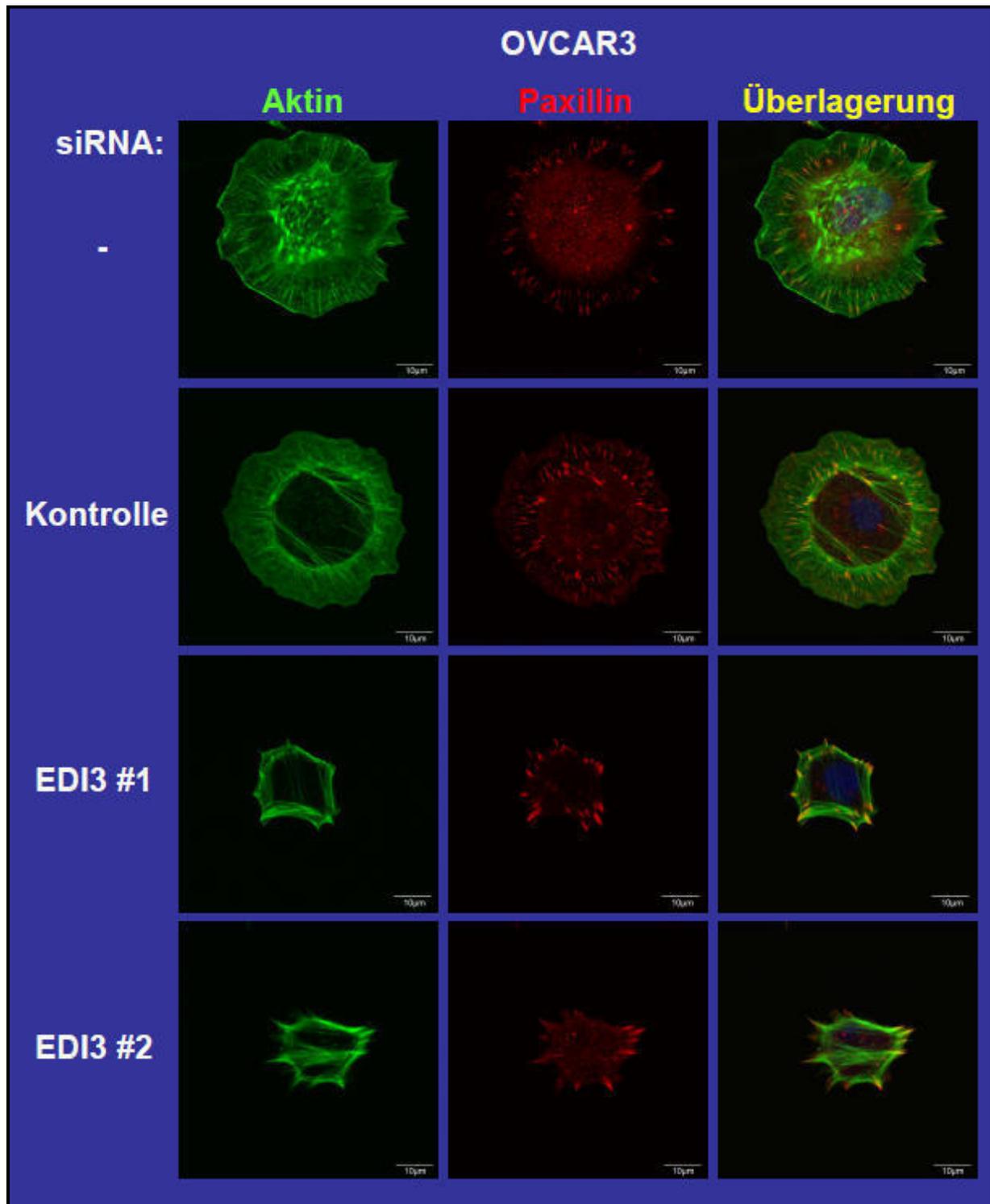


Abbildung 3.45: Der Knockdown von EDI3 führt in OVCAR3-Zellen zur Ausbildung weniger, dafür aber größerer Fokaler Adhäsionen. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von OVCAR3-Zellen, die nach Knockdown von EDI3 auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach 1 h Adhäsionszeit mit DAPI (Zellkerne, blau), Phalloidin-Alexa488 (Aktin, grün) und Paxillin-Alexa647 (Fokale Adhäsionen, rot) gefärbt worden sind (Messbalken: 10 µm).

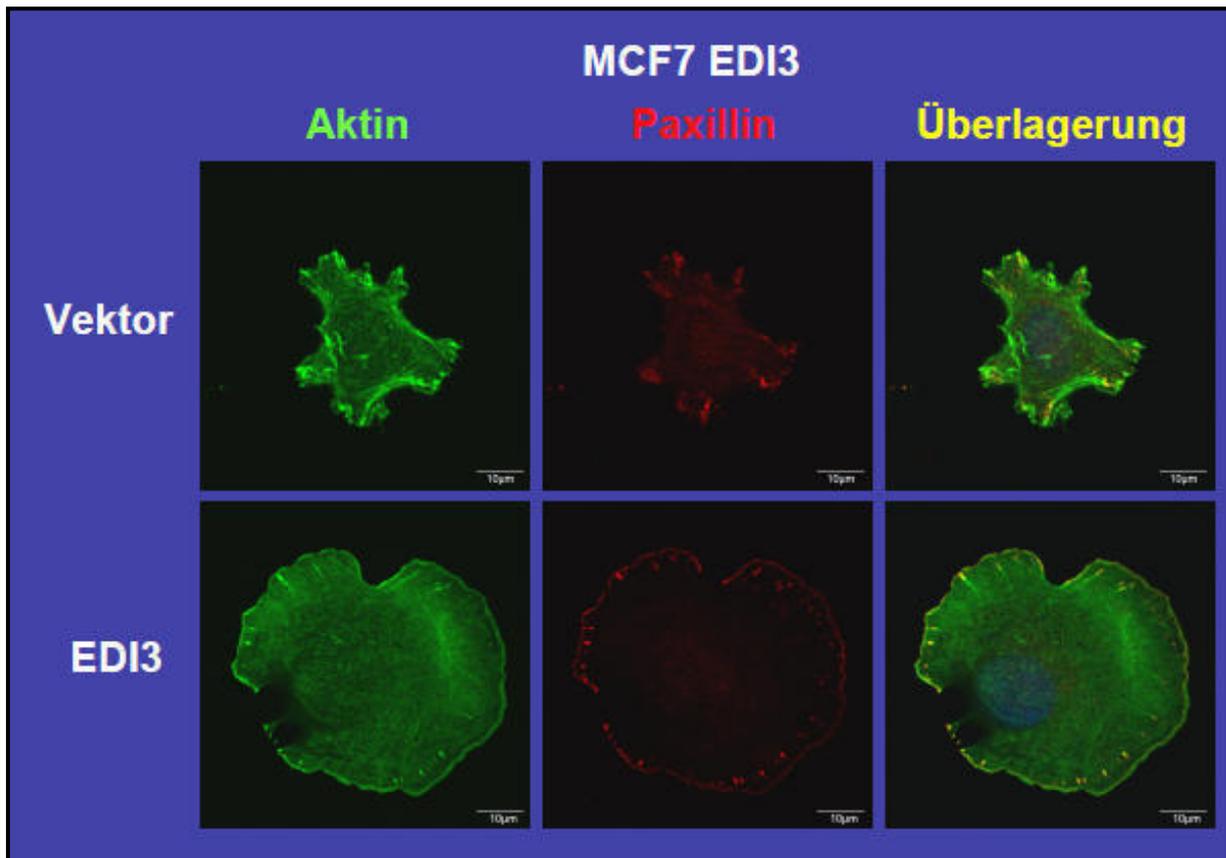


Abbildung 3.46: Die Überexpression von EDI3 führt in MCF7-Zellen zur Ausbildung vieler, dafür aber kleinerer Fokaler Adhäsionen. Dargestellt sind repräsentative konfokalmikroskopische Bilder von stabil transfizierten EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen, die auf einer FN-Matrix replattiert sowie nach 30 min Adhäsionszeit mit DAPI (Zellkerne, blau), Rhodamin-Phalloidin (Aktin, grün) und Paxillin-Alexa647 (Fokale Adhäsionen, rot) gefärbt worden sind (Messbalken: 10 µm).

Die Überexpression von EDI3 in stabil transfizierten MCF7-Zellen führte komplementär hierzu nach einer Adhäsionszeit von 30 min auf einer FN-Matrix zu einer Zunahme der Anzahl von FAs pro Zelle; die einzelnen FAs waren im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Kontroll-Zellen allerdings deutlich verkleinert (Abb. 3.46). Insgesamt deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass EDI3 seinen Einfluss auf das *Spreading* von Tumorzellen und die damit einhergehende Bildung von FAs unabhängig von der FAK-Src-Kaskade ausübt.

4. Diskussion

Glycerophosphodiesterasen können aufgrund der Diversität bezüglich der subzellulären Lokalisation sowie der Substratspezifität innerhalb dieser Enzymfamilie in die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse involviert sein. EDI3 als einziges zytosolisches Mitglied dieser Familie wurde als erste GDE mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht. Sowohl in Endometrium- als auch in Ovarialkarzinomen konnte eine Assoziation zwischen hoher Genexpression von *EDI3* und der Ausbildung von Metastasen und somit schlechter Prognose aufgezeigt werden [Staude, 2008; Stewart *et al.*, 2012]. Da die Einflussfaktoren der Metastasierung, welche auch heute noch das größte Problem in der Tumorthherapie und die häufigste Todesursache von Krebspatienten darstellt, von großem Interesse für die medizinische Forschung sind, werden im Rahmen dieser Arbeit die Metastasen-fördernden Eigenschaften des ansonsten weitgehend unbekanntes Proteins EDI3 näher charakterisiert. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen ein grundlegendes Verständnis für die biologische Bedeutung von EDI3 vermitteln und somit dazu beitragen, die Rolle dieser GDE im Rahmen der Karzinogenese aufzuklären.

4.1 EDI3 als wichtiges Enzym des zellulären Cholin-Metabolismus

Krebserkrankungen haben oft typische Veränderungen des zellulären Cholin-Metabolismus zur Folge [Übersicht in Marchan *et al.*, 2012]. Die maligne Transformation von Brustepithelzellen geht mit einem „GPC to PC switch“ einher, der insbesondere durch einen Anstieg der PC-Level zu einem erniedrigten GPC/PC-Verhältnis in Mammakarzinom-Zelllinien führt [Aboagye & Bhujwala, 1999; Eliyahu *et al.*, 2007]. Dieselben Veränderungen treten auch in Ovarialkarzinom-Zelllinien auf [Iorio *et al.*, 2005]. In Lebertumoren kann ebenfalls eine Erhöhung von PC sowie eine signifikante Reduktion von GPC nachgewiesen werden [Cox *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 1993]. In Prostatakrebs-Zelllinien bzw. fortgeschrittenen Prostatakarzinomen kommt es nicht zu solch einem Umschalten der beiden Cholin-Metabolite GPC und PC, sondern zu einer Zunahme beider Metabolite [Ackerstaff *et al.*, 2001; Swanson *et al.*, 2008; Keshari *et al.*, 2011]. Diese Unterschiede deuten darauf hin, dass Veränderungen des Cholin-Metabolismus und somit auch die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen in Abhängigkeit des Zelltyps variieren können. Dabei spielt die Aktivität der verschiedenen involvierten Enzyme eine ganz zentrale Rolle.

Während bisher in diesem Zusammenhang die mögliche Beteiligung der GDEs weitgehend in der Literatur vernachlässigt worden ist, wird im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass EDI3, ein Mitglied der GDE-Familie, welches GPC zu G3P und Cholin hydrolysieren kann, ein wichtiger Bestandteil des Cholin-Metabolismus ist. Eine transiente Reduktion der EDI3-Expression mittels RNA-Interferenz führt sowohl in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 als auch in der Endometriumkarzinom-Zelllinie AN3CA und in der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR3 zu einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären GPC/PC-Verhältnisses. Die Quantifizierung der einzelnen Cholin-Metabolite verdeutlicht, dass dies insbesondere mit einer Akkumulation von GPC nach Knockdown von EDI3 zusammenhängt. Trotz einer entsprechenden Abnahme der Cholin-Konzentration, also des direkten Reaktionsproduktes der EDI3-vermittelten GPC-Hydrolyse, und erkennbarer Tendenzen hat dies keinen signifikanten Einfluss auf die intrazellulären PC-Level. Somit scheint EDI3 maßgeblich durch den Umsatz seines direkten Substrates GPC an der Aufrechterhaltung des für viele Tumorzellen typischen niedrigen GPC/PC-Verhältnisses beteiligt zu sein. Die hohe EDI3-Expression in Tumorzellen ist gleichbedeutend mit einem hohen GPC-Verbrauch und die daraus resultierende geringe GPC-Konzentration schlägt sich in einem niedrigen GPC/PC-Verhältnis nieder.

Dieser Effekt von EDI3 stellt eine sinnvolle Ergänzung zu der bereits beschriebenen Überexpression von ChoK α , die in Tumorzellen verschiedenen Ursprungs auftritt [Ramirez de Molina *et al.*, 2002 a/b], dar. Durch die Phosphorylierung von Cholin zu PC kann diese Kinase u. a. in Mamma- oder Ovarialkarzinom-Zelllinien zu einem Anstieg der PC-Konzentration und somit ebenfalls zu einem erniedrigten GPC/PC-Verhältnis führen [Eliyahu *et al.*, 2007; Iorio *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2010]. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, geht der Übergang von nicht-malignen MCF12A-Zellen zu malignen MCF7- und stark metastasierenden MDAMB231-Brustkrebszellen mit einem „GPC to PC switch“ einher, der sowohl mit einer Zunahme der GDE2-Expression als auch mit zunehmender ChoK α -Expression assoziiert ist [Cao *et al.*, 2012]; die Expression von EDI3 ist in dieser Studie nicht untersucht worden. Auch GDE2 kann, wie EDI3, die Hydrolyse von GPC katalysieren; da die GDE-Domäne dieses Transmembran-Proteins allerdings extrazellulär liegt [Rao & Sockanathan, 2005], ist anzunehmen, dass der Einfluss des zytosolisch lokalisierten EDI3 auf die intrazellulären

Konzentrationen der Cholin-Metabolite von größerer Bedeutung ist. Dass EDI3 und GDE2 in Tumorzellen nicht unbedingt eine redundante Funktion erfüllen wird außerdem dadurch unterstützt, dass eine Modulation der EDI3-Expression in keinem der in dieser Arbeit verwendeten Zellmodelle durch Anpassungen der GDE2-Expression kompensiert wird. Somit scheint die Kombination aus der Überexpression von EDI3 und ChoK α eine naheliegende Erklärung für das insgesamt niedrige GPC/PC-Verhältnis in Tumorzellen zu sein, wobei EDI3 hauptsächlich für eine Abnahme von GPC sorgt, während ChoK α insbesondere die Zunahme von PC bedingt.

4.2 EDI3 als positiver Regulator der Metastasierung von Tumorzellen

Bekanntermaßen erwerben Zellen im Zuge der malignen Transformation verschiedene Eigenschaften, die den Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen ein besseres Überleben ermöglichen bzw. ihnen Wachstumsvorteile verschaffen [Hanahan & Weinberg, 2000 & 2011]. Die Fähigkeit zur Ausbildung von Metastasen ist eine solche Eigenschaft, die Tumorzellen erst relativ spät während der Karzinogenese entwickeln. Gerade deshalb stellt der Erwerb dieser Eigenschaft aber eine so wichtige Hürde und auch große Gefahr dar, weil bei Krebserkrankungen die Frage nach bereits gebildeten Metastasen für Patienten oft den Unterschied zwischen erfolgreicher Therapie und schlechter Prognose ausmacht. Durch Untersuchung der phänotypischen Auswirkungen in verschiedenen humanen Tumorzelllinien nach gezielter Modulation der EDI3-Expression kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Glycerophosphodiesterase EDI3 Tumorzellen verschiedene Fähigkeiten verleiht, die insgesamt deren Metastasierung begünstigen können.

4.2.1 EDI3 spielt eine Rolle bei der PKC α -vermittelten Migration

Die Migration, die vor allem im Zusammenhang mit der Metastasierung als eine essentielle zelluläre Eigenschaft angesehen werden muss, wird in dieser Studie umfassend analysiert. Ein positiver Einfluss von EDI3 auf die Migration von Tumorzellen wird dabei insbesondere anhand der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 herausgearbeitet. Mit Hilfe des klassischen *Scratch*-Assays kann in dieser Zelllinie gezeigt werden, dass eine Reduktion der EDI3-Expression mittels RNA-Interferenz zu einer signifikanten Verschlechterung und die Überexpression von EDI3 zu einer

entsprechenden Verbesserung der Migration führt. Auch in der Endometriumkarzinom-Zelllinie AN3CA wird die Migrationsfähigkeit durch den Knockdown von EDI3 stark beeinträchtigt. Zusammen mit ersten Ergebnissen vorangegangener Studien, bei denen in NIH3T3-Zellen mit starker EDI3-Überexpression eine deutliche Zunahme der Migration zu verzeichnen war [Lesjak, 2010], deutet dies darauf hin, dass die Regulation der zellulären Migration zu den zentralen biologischen Funktionen von EDI3 zählt. Das Ausbleiben von Migrationsunterschieden nach Knockdown von EDI3 in der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR3 gibt allerdings Anlass zu der Annahme, dass diese Funktion von EDI3 abhängig vom jeweiligen Zelltyp in unterschiedlichem Ausmaß erfüllt wird.

Da die durchgeführten Migrations-Assays in der Regel über mehrere Tage verlaufen, könnte argumentiert werden, dass es sich bei den beobachteten Unterschieden in der Geschwindigkeit des Wundschlusses nicht ausschließlich um Veränderungen der Migration handelt, sondern eventuell auch um Proliferationsunterschiede. Die unveränderte Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA in MCF7- und AN3CA-Zellen mit modulierter EDI3-Expression gibt einen ersten Hinweis darauf, dass ein möglicher Beitrag der Proliferation in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden kann. Dies unterstützt Ergebnisse unserer Gruppe aus vorangegangenen Studien, in denen wir anhand von Bromdesoxyuridin-behandelten MCF7-Zellen zeigen konnten, dass der siRNA-Knockdown von EDI3 keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation dieser Tumorzellen hat [Lesjak, 2010]. Bromdesoxyuridin wird als Thymidin-Analogon während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA replizierender Zellen eingebaut [Eidinoff *et al.*, 1959] und kann mit Hilfe spezifischer Antikörper durch Immunfluoreszenzfärbungen in den Nuklei proliferierender Zellen nachgewiesen werden. Auch bereits durchgeführte Zellzyklus-Analysen mittels Durchflusszytometrie hatten ergeben, dass die Reduktion der EDI3-Expression in MCF7-Zellen den Anteil der Zellen in der S-Phase nicht vermindert [Lesjak, 2010; Stewart *et al.*, 2012]. Somit kann tatsächlich davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beschriebenen Veränderungen um Migrationsunterschiede handelt.

Mechanistisch kann die Bedeutung von EDI3 für die zelluläre Migration anhand der vorliegenden Daten auf Veränderungen der PKC α -Expression zurückgeführt werden. Die Expression von Mitgliedern der PKC-Familie ist bei Krebserkrankungen häufig dereguliert; die Isoform PKC α wird beispielsweise in aggressiveren

Mammakarzinomen überexprimiert [O'Brian *et al.*, 1989; Lønne *et al.*, 2010] oder verstärkt aktiviert [Tan *et al.*, 2006]. Auch die Wirkung von PKCs als Regulatoren der Migration ist hinlänglich bekannt, wobei in diesem Zusammenhang z. B. in Mammakarzinom-Zelllinien insbesondere PKC α [Sun & Rotenberg, 1999; Lønne *et al.*, 2010] und PKC ϵ [Pan *et al.*, 2005; Gorin & Pan, 2009] als positive Regulatoren zu nennen sind, während PKC δ eher als Migrationssuppressor gilt [Jackson *et al.*, 2005]. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass in MCF7-Zellen sowohl eine spezifische Reduktion als auch eine Erhöhung der EDI3-Expression zu Veränderungen der PKC α -Expression auf RNA- und Protein-Ebene führt. Dies wird durch entsprechende Ergebnisse in AN3CA-Zellen bestätigt; auch in dieser Zelllinie ist die reduzierte EDI3-Expression nach siRNA-Knockdown mit einer verminderten RNA- sowie Proteinexpression von PKC α assoziiert. Normalerweise wird die Enzymaktivität von PKC α hauptsächlich posttranslational durch verschiedene Phosphorylierungen sowie ihre subzelluläre Lokalisation [Newton, 2003 & 2009], genauer gesagt ihre Translokation an die Plasmamembran, reguliert. Deshalb ist der beobachtete Einfluss von EDI3 auf die Transkription von PKC α eher ungewöhnlich. Allerdings beinhaltet die Promotorregion von PKC α Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie AP-2 und SP-1 [Clark *et al.*, 2002], so dass eine Rolle für EDI3 bei der Transkriptionskontrolle von PKC α nicht auszuschließen ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, gezieltere Untersuchungen zur Lokalisierung von EDI3 durchzuführen um herauszufinden, ob EDI3 in Abhängigkeit bestimmter Stimuli auch eine Funktion im Nukleus übernehmen kann.

Die zusätzliche Behandlung von MCF7-Zellen nach EDI3-Knockdown mit dem PKC-Aktivator TPA und dem PKC-Inhibitor Gö6976, welcher selektiv die klassischen Isozyme PKC $\alpha/\beta/\gamma$ hemmt [Martiny-Baron *et al.*, 1993], verdeutlicht den kausalen Zusammenhang zwischen den EDI3-vermittelten Veränderungen der PKC α -Expression und den beobachteten Migrationsunterschieden. Der Phorbolster TPA stimuliert *in vitro* die Migration von Tumorzellen [Platet *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Stensman & Larsson, 2008]. Der Einsatz von TPA im Rahmen der dargestellten *Scratch*-Assays kann die geringere Migrationsfähigkeit in Zellen mit EDI3-Knockdown ausgleichen bzw. auf das Niveau der Kontroll-Zellen verbessern. Dies kann durch eine verstärkte Stimulation der PKC-Aktivität erklärt werden, wodurch der Nachteil der reduzierten PKC α -Expression umgangen wird. Wenn man davon ausgeht, dass EDI3 eine Rolle bei der PKC-vermittelten Migration spielt, sollte

eine zusätzliche Hemmung von PKC α durch Gö6976 in den Zellen mit EDI3-Knockdown und somit ohnehin schon reduzierter PKC α -Expression keine weitere Verschlechterung herbeiführen. Falls EDI3 die Migration allerdings über einen anderen Signalweg beeinflusst, wäre in Kombination mit der PKC-Inhibierung das Auftreten eines kumulativen Effektes zu erwarten. Während die Migrationsfähigkeit normaler MCF7-Zellen durch Behandlung mit Gö6976 deutlich herabgesetzt wird, zeigt dieser Inhibitor keinen Effekt in Knockdown-Zellen, was dafür spricht, dass EDI3 in der Tat die PKC-abhängige Migration fördert. Dies wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass eine spezifische Reduktion von PKC α mittels RNA-Interferenz in EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen deren verbesserte Migrationsfähigkeit auf Normalniveau herabsetzt.

Während in MCF7- und AN3CA-Zellen sowohl Veränderungen der PKC α -Expression als auch Migrationsunterschiede nach Modulation der EDI3-Expression auftreten, bleibt in OVCAR3-Zellen beides aus. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die niedrigere Effizienz des EDI3-Knockdowns auf RNA- und Protein-Ebene in OVCAR3-Zellen (etwa 70%) im Vergleich zu den anderen beiden verwendeten Zelllinien (80-90%) sein. Es wäre durchaus plausibel, dass in OVCAR3-Zellen ein bestimmter Grenzwert von EDI3 nicht unterschritten wird, so dass ausreichend EDI3 vorhanden ist um die Transkription von PKC α entsprechend voranzutreiben. Der kritische Punkt scheint somit insgesamt die Kontrolle der PKC α -Expression zu sein. Sobald in Abhängigkeit von EDI3 Veränderungen der PKC α -Expression auftreten, sind auch entsprechende Migrationsunterschiede zu beobachten; bleiben diese Veränderungen des beteiligten Signalproteins dagegen aus, sind auch keine Effekte bezüglich des Migrations-Phänotyps zu beobachten.

4.2.2 EDI3 ist von Bedeutung für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion

Um sich fortbewegen zu können, müssen Zellen immer wieder neue Kontakte zu einem Substrat bzw. der ECM ausbilden und bestehende Kontakte lösen. In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass EDI3 auch von Bedeutung für diesen Prozess der Zelladhäsion ist. Eine Reduktion der EDI3-Expression in MCF7- und OVCAR3-Zellen beeinträchtigt insgesamt die initiale Zelladhäsion auf einer Fibronectin-Matrix, während die Überexpression von EDI3 die Adhäsion von MCF7-Zellen auf einer solchen Matrix deutlich beschleunigt. Nur der Einsatz von siRNA EDI3 #2 in OVCAR3-Zellen zeigt als einziger keinen Einfluss auf die Zelladhäsion.

Diese frühen Schritte der Zell-Matrix-Adhäsion werden maßgeblich durch die Aktivierung von Integrinen an der Zelloberfläche bestimmt [Hynes, 2002]. Der Fibronektin-Rezeptor Integrin $\alpha 5 \beta 1$ wird u. a. in Mammakarzinomen mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht [Mierke *et al.*, 2010]. Die Expression von Integrin $\alpha 5$ steigt in transformierten Brustepithelzellen im Zuge der EMT an [Maschler *et al.*, 2005] und ihre Modulation hat in verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien einen Einfluss auf deren Adhäsion und *Spreading* [Fang *et al.*, 2009]. Auch die Expression von Integrin $\beta 1$ wird in Mausmodellen als wichtig für die Entstehung und das Wachstum von Brusttumoren beschrieben [White *et al.*, 2004] und ist in Mammakarzinomen mit schlechter Prognose assoziiert [Yao *et al.*, 2007].

Mit Hilfe von RT-qPCR- sowie Western Blot-Analysen kann insbesondere eine Assoziation zwischen der Modulation der EDI3-Expression und Veränderungen der Expression der zentralen Integrin-Untereinheit $\beta 1$ auf RNA- und Protein-Ebene hergestellt werden; über den tatsächlichen Aktivierungszustand der Integrine an der Zelloberfläche kann anhand der vorliegenden Daten keine Aussage gemacht werden. Obwohl die Aktivität der Integrine in erster Linie posttranslational durch Konformationsänderungen reguliert wird [Xiong *et al.*, 2001 & 2002], kann ihre Expression auch längerfristig durch verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. SP-1 und AP-1 moduliert werden [Birkenmeier *et al.*, 1991; Cervella *et al.*, 1993; Kim & Yamada, 1997]. Dass EDI3 neben PKC α auch die RNA- und Proteinexpression von Integrinen beeinflussen kann und dabei dieselben Transkriptionsfaktoren involviert sein könnten, unterstreicht zum einen die potenzielle Funktion von EDI3 im Rahmen der Transkriptionskontrolle und zum anderen die Wahrscheinlichkeit der Beteiligung dieser speziellen Transkriptionsfaktoren.

Auch die Expression der Fibronektin-spezifischen Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ wird zumindest durch die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen stark erhöht; der siRNA-Knockdown in MCF7- und OVCAR3-Zellen führt nur unter Benutzung einer der beiden verwendeten siRNA-Spezies (EDI3 #1) zu einer entsprechend verringerten Expression von Integrin $\alpha 5$ auf RNA- und Protein-Ebene. Da die Effizienz des Knockdowns mit beiden siRNA-Spezies gleich gut ausfällt, ist die Ursache für diese unterschiedlichen Effekte bisher noch ungeklärt. Beim Einsatz von siRNAs muss allerdings auch das Risiko möglicher unspezifischer Effekte in Betracht gezogen werden. Um eine mögliche Fehlinterpretation der Ergebnisse aufgrund dieser Problematik weitgehend auszuschließen, werden in dieser Arbeit alle

zentralen Beobachtungen auch in stabil transfizierten EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen überprüft und können so in der Regel bestätigt werden.

Eine unterschiedliche Wirkung der beiden EDI3-spezifischen siRNAs tritt im Hinblick auf Integrin $\beta 1$ nur in einem Fall auf; in OVCAR3-Zellen führt der Einsatz von siRNA EDI3 #2 zumindest auf Protein-Ebene nicht zu einer signifikanten Abnahme der Expression von Integrin $\beta 1$ und beeinträchtigt hier auch nicht die Adhäsion. Diese differenzierten Beobachtungen deuten darauf hin, dass die EDI3-vermittelten Unterschiede bei der Zelladhäsion womöglich durch den direkten Einfluss auf die Expression von Integrin $\beta 1$ zu erklären sind. Bei dieser Interpretation darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass auch andere Integrin-Untereinheiten, die im Rahmen dieser Studie gar nicht untersucht worden sind, mit Fibronectin interagieren können, wie z. B. Integrin $\alpha V\beta 3$ [Charo *et al.*, 1990; Danen *et al.*, 2002]. Außerdem kann der Einfluss von EDI3 auf die Zelladhäsion in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie bzw. der gewählten Matrix variieren. In AN3CA-Zellen beispielsweise ist die RNA-Expression von Integrin $\beta 1$ nach EDI3-Knockdown ebenfalls signifikant erniedrigt, während die Expression von Integrin $\alpha 5$ gänzlich unverändert bleibt; in dieser Zelllinie kann dafür zumindest mit der siRNA-Spezies EDI3 #1 eine signifikante Abnahme der Expression der Kollagen-spezifischen Integrin-Untereinheit $\alpha 1$ erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Eine umfassendere Analyse unter Einbeziehung verschiedener Integrine sowie Matrizes könnte Aufschluss darüber geben, ob EDI3 die Zelladhäsion generell oder nur unter gewissen Bedingungen beeinflussen kann und welche Integrine hierbei eine Rolle spielen.

4.2.3 EDI3 hat Einfluss auf das *Spreading* von Tumorzellen

Im Anschluss an die initiale Adhäsion breiten sich Zellen auf einem Substrat unter Bildung Aktin-reicher Membranausstülpungen aus. Auch dieses *Spreading* ist eine notwendige Voraussetzung für die spätere Migration der Zellen. In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass EDI3 neben seiner Rolle bei der Migration und Adhäsion von Tumorzellen auch für diesen Prozess von Bedeutung ist. Eine Reduktion der EDI3-Expression in MCF7- und OVCAR3-Zellen verlangsamt das *Spreading* auf einer Fibronectin-Matrix, während die Überexpression von EDI3 das *Spreading* von MCF7-Zellen auf einer solchen Matrix deutlich beschleunigt. Nach einer Adhäsionszeit von 60 min im Fall des Knockdowns bzw. von 30 min im Fall der EDI3-Überexpression können mit Hilfe von konfokalmikroskopischen Aufnahmen

insbesondere in Bezug auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts dramatische morphologische Unterschiede der Fluoreszenz-gefärbten Zellen dargestellt werden. Die Quantifizierung der Zellgröße zu diesem Zeitpunkt ergibt ebenfalls signifikante Unterschiede; der Knockdown von EDI3 führt in beiden Zelllinien zu einer Abnahme der mittleren Zellgröße, während die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen das *Spreading* entsprechend verbessert, was sich in einer deutlich vergrößerten Zellfläche niederschlägt. Im Gegensatz zu dem hier beschriebenen positiven Einfluss von EDI3 auf das *Spreading* zeigt die Überexpression eines anderen Mitglieds der GDE-Familie, GDE3, in HEK293T-Zellen dagegen einen negativen Einfluss und führt zur Abrundung der Zellen [Yanaka *et al.*, 2003]. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Effekte eher mit der unterschiedlichen Substratspezifität oder der Lokalisierung dieser beiden GDEs zusammenhängen.

Als zentrale Regulatoren morphologischer Veränderungen, die mit der Reorganisation des Zytoskeletts einhergehen, gelten Rho-GTPasen [Etienne-Manneville & Hall, 2002]. Das *Spreading* von MCF7-Zellen zeichnet sich in den dargestellten Experimenten vor allem durch die Bildung von Lamellipodien aus, was allgemein für eine Aktivierung der Rho-GTPase Rac1 spricht; in OVCAR3-Zellen werden zusätzlich Stressfasern ausgebildet, was Rückschlüsse auf eine Aktivierung von RhoA zulässt [Ridley *et al.*, 1992 a&b; Nobes & Hall; 1995]. Die Aktivität dieser Rho-GTPasen wird insbesondere über ihre Beladung mit GTP reguliert. Mit Hilfe spezifischer Affinitäts-basierter Assays kann in dieser Arbeit allerdings kein Unterschied in der GTP-Beladung von Rac1 oder RhoA nach Modulation der EDI3-Expression und Inkubation auf einer Fibronectin-Matrix ausgemacht werden. Obwohl unter denselben Versuchsbedingungen Unterschiede im *Spreading* beobachtet werden können, wäre es möglich, dass Fibronectin allein als Stimulus nicht ausreicht, um in Lysaten als Durchschnitt über eine gesamte Zellpopulation Unterschiede in der Aktivierung der Rho-GTPasen in Abhängigkeit der EDI3-Modulation nachzuweisen. So führt beispielsweise in embryonalen Mausfibroblasten ein Knockout der Diacylglycerinkinase per se nicht zu einer Abnahme der basalen Menge an GTP-beladenem Rac1, während nach Stimulation mit PDGF auffällt, dass Rac1 in diesen Zellen gar nicht mehr richtig aktiviert werden kann [Abramovici *et al.*, 2009].

Für die vollständige Aktivierung der Rho-GTPasen ist neben ihrer GTP-Beladung auch ihre subzelluläre Lokalisierung von Bedeutung; im aktiven Zustand findet eine Translokation an die Plasmamembran statt. In OVCAR3-Zellen kann beispielsweise

Phosphatidsäure (PA) die Membrantranslokation von Rac1 induzieren, indem sie dieser Rho-GTPase als Membrananker dient. Eine Blockade der intrazellulären PA-Produktion hemmt zwar nicht die GTP-Beladung von Rac1, hat aber trotzdem einen negativen Einfluss auf die Rac1-Aktivierung und somit das *Spreading* der Zellen, weil Rac1 in diesem Fall schlechter an die Plasmamembran binden kann [Chae *et al.*, 2008]. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen sind allerdings nach Knockdown von EDI3 in subfraktionierten MCF7- und OVCAR3-Zelllysaten per Western Blot-Analyse auch keine Lokalisationsunterschiede von Rac1 oder RhoA zu verzeichnen. RhoA kann durch seinen Haupteffektor ROCK u. a. die Phosphorylierung und somit Aktivierung von MLC regulieren [Amano *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1996], was direkt mit der Aktomyosin-Kontraktilität zusammenhängt. Doch auch im Hinblick auf die Phosphorylierung von MLC sind weder nach EDI3-Knockdown in MCF7- oder OVCAR3-Zellen noch in den EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen Unterschiede zu beobachten. Somit muss an dieser Stelle davon ausgegangen werden, dass weder Rac1 noch RhoA eine große Rolle im Rahmen des EDI3-vermittelten *Spreadings* spielen. Da die koordinierte Aktivierung dieser beiden Rho-GTPasen u. a. auch durch wechselseitige Einflüsse kontrolliert wird [Guilluy *et al.*, 2011] und in dieser Arbeit immer nur Momentaufnahmen dargestellt werden können, wären weitergehende Untersuchungen mit verbesserter zeitlicher und räumlicher Auflösung nötig, um die mögliche Beteiligung von Rac1 oder RhoA doch noch nachzuweisen bzw. endgültig auszuschließen.

Im Zusammenhang mit *Spreading* und Migration von Zellen ist auch die Ausbildung von Fokalen Adhäsionen (FAs) von Bedeutung, die die ECM über einen Multiproteinkomplex aus Integrinen, Kinasen wie FAK und Src sowie Adapterproteinen wie Paxillin mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Auch diese Signalproteine werden neben ihrer Lokalisierung hauptsächlich durch Phosphorylierung reguliert [Schaller *et al.*, 1994; Bellis *et al.*, 1995]. Western Blot-Analysen von FAK, Src und Paxillin ergeben in keinem der verwendeten Zellmodelle mit modulierter EDI3-Expression Unterschiede in der Phosphorylierung und somit Aktivierung dieser Proteine. Obwohl sich die Phosphorylierung und Expression von Paxillin insgesamt nicht ändert, zeigen konfokalmikroskopische Aufnahmen entsprechender Immunfluoreszenzfärbungen klare Lokalisationsunterschiede des FA-assoziierten Paxillins. Der Knockdown von EDI3 in MCF7- und OVCAR3-Zellen führt zu einer Abnahme der Anzahl von FAs pro Zelle; die einzelnen FAs sind dafür größer als in Kontroll-Zellen.

Die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen führt dagegen zur vermehrten Bildung kleiner FAs. *Spreading* und Migration sind Prozesse, die von der Dynamik der FAs, also ihrer ständigen Neubildung sowie dem Lösen bestehender FAs, abhängen. Große, eher stabile FAs, wie sie z. B. auch in FAK-defizienten [Schober *et al.*, 2007] oder EBP50(Ezrin-Radixin-Moesin-bindendes Phosphoprotein 50)-defizienten Zellen [Song *et al.*, 2012] vorgefunden werden, charakterisieren dabei eher Zellen mit beeinträchtigten *Spreading*- und Migrationsfähigkeiten; diese Beschreibung passt auch im vorliegenden Fall zu den Beobachtungen nach EDI3-Knockdown. Viele kleine FAs wie sie in Kontroll-Zellen bzw. zu einem früheren Zeitpunkt in den EDI3-überexprimierenden MCF7-Zellen zu finden sind, sprechen dagegen für einen dynamischen Umsatz und sind *Spreading* und Migration entsprechend zuträglich. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass EDI3 sowohl das *Spreading* von Tumorzellen als auch die Bildung von FAs unabhängig von der FAK-Src-Kaskade beeinflusst. Ähnliches kann auch nach Aktivierung der Rho-GTPase Rap1 durch die cAMP-vermittelte Stimulierung des Rap1-spezifischen GEFs Epac beobachtet werden [Ross *et al.*, 2012]. Rap1 induziert dabei das *Spreading* von A549-Zellen auf einer Fibronectin-Matrix und fördert die Ausbildung von FAs, ohne dass Unterschiede in der Phosphorylierung von FAK, Src oder Paxillin auftreten. Selbst der Einsatz eines spezifischen Src-Inhibitors, der die FAK-Src-Kaskade komplett hemmt, verhindert das Rap1-induzierte *Spreading* nicht. Somit könnte Rap1, gerade auch in Anbetracht der bisher negativen Ergebnisse für die Beteiligung der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA, in weiterführenden Untersuchungen ein vielversprechender Kandidat als mechanistische Verbindung zwischen EDI3 und dem beschriebenen *Spreading*-Phänotyp sein.

Durch ihren Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett spielt PKC neben der zellulären Migration auch eine Rolle bei der Zelladhäsion sowie dem Integrin-vermittelten *Spreading* [Haller *et al.*, 1998; Disatnik *et al.*, 1999 & 2002] und der Bildung Fokaler Adhäsionen [Woods & Couchman, 1992]. Eines der wichtigsten PKC-Substrate mit Bedeutung für das *Spreading* ist MARCKS; dieses myristoylierte Protein ist normalerweise in der Plasmamembran verankert, wo es mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert, kann aber in Abhängigkeit der PKC-vermittelten Phosphorylierung bidirektional ins Zytosol und zurück zur Membran translozieren [Disatnik *et al.*, 2004]. Es gibt sogar Hinweise darauf, dass PKC direkt oder über das Adapterprotein RACK1 (Rezeptor für aktivierte C-Kinasen) mit Integrin β 1 interagieren kann [Besson

et al., 2002] und durch dessen Internalisierung das Recycling und somit die Verteilung an der Zelloberfläche beeinflussen kann [Ng *et al.*, 1999]. Im Rahmen dieser Arbeit wird zwar kein direkter Zusammenhang zwischen den Expressionsveränderungen von PKC α nach Modulation der EDI3-Expression und dem beobachteten Adhäsions- und *Spreading*-Phänotyp hergestellt, auch dies wäre aber ein interessanter Punkt für zukünftige Untersuchungen.

4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird EDI3 als eine GPC-hydrolysierende Glycerophosphodiesterase charakterisiert, die zum einen durch ihren direkten Einfluss auf den zellulären Cholin-Metabolismus das in Tumorzellen typischerweise erniedrigte GPC/PC-Verhältnis beeinflussen kann und zum anderen durch ihren Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Adhäsion, *Spreading* und Migration, die alle mit einer Reorganisation des Zytoskeletts einhergehen, die Metastasierung von Tumorzellen begünstigen kann. Derzeit ist allerdings noch unklar, ob zwischen der Enzymaktivität von EDI3 und den beobachteten zellbiologischen Veränderungen tatsächlich ein kausaler Zusammenhang besteht oder ob die Bedeutung von EDI3 für die genannten zellulären Prozesse unabhängig von der GDE-Aktivität ist, wie bereits für den Einfluss von Maus-EDI3 auf die Differenzierung von Myoblasten gezeigt werden konnte [Okazaki *et al.*, 2010]. Diese wichtige Fragestellung zu klären soll einer der Kernpunkte nachfolgender Untersuchungen sein. Die Herstellung katalytisch inaktiver Mutanten durch Einführen von Punktmutationen in die GDE-Domäne von EDI3 bzw. durch Teildeletionen sollte in diesem Zusammenhang wertvolle Informationen liefern. Doch auch zu diesem Zeitpunkt kann bereits spekuliert werden, wie EDI3 den Cholin-Metabolismus mit der intrazellulären Signalgebung verknüpfen und dadurch zu den beschriebenen Phänotypen führen könnte (Abb. 4.1).

Beide Reaktionsprodukte der EDI3-katalysierten GPC-Hydrolyse können durch nachfolgende Enzyme in Lipid-Metabolite umgewandelt werden. Cholin wird im ersten Schritt des Kennedy-Weges durch Cholinkinase phosphoryliert, was schließlich zur Synthese von Phosphatidylcholin (PtdCho), dem häufigsten Phospholipid in biologischen Membranen, führt. PtdCho kann wiederum entweder durch PLC zu Diacylglycerin (DAG) oder durch PLD zu Phosphatidsäure (PA) umgesetzt werden. Auch Glycerin-3-phosphat kann in einem zweiten Reaktionsweg durch die Acyltransferase GPAM in die Lipide LPA und PA umgewandelt werden.

Erste massenspektrometrische Untersuchungen der Lipid-Metabolite in EDI3-defizienten MCF7-Zellen geben Hinweise darauf, dass insbesondere die Konzentrationen von LPA und PA durch EDI3 beeinflusst werden können [Stewart *et al.*, 2012]. Vor diesem Hintergrund scheint die Annahme eines möglichen Einflusses von EDI3 auf diese Lipid-Metabolite und somit die intrazelluläre Signalgebung durchaus berechtigt zu sein. Mit PKC kann im Rahmen dieser Arbeit ein erstes Signalmolekül identifiziert werden, dessen Expression in Abhängigkeit von EDI3 verändert wird, das in direkten Zusammenhang mit dem beobachteten Migrations-Phänotyp gebracht werden kann und dessen Aktivität zusätzlich durch Veränderungen der Lipidkonzentration von DAG beeinflusst werden könnte. Der beobachtete *Spreading*-Phänotyp nach Modulation von EDI3 hängt vermutlich mit der Aktivierung von Rho-GTPasen zusammen, auch wenn bisher noch kein verantwortlicher Vertreter dieser Enzymfamilie identifiziert werden konnte; dies könnte unter Umständen mit lokalen Veränderungen der PA-Konzentration in der Plasmamembran zusammenhängen. Noch ausstehende umfassendere Analysen der Cholin- sowie Lipid-Metabolite nach Modulation der EDI3-Expression in verschiedenen Zelllinien sollen der Überprüfung dieses Konzeptes dienen.

Zusammenfassend scheint die Glycerophosphodiesterase EDI3 aufgrund der komplexen Einflussmöglichkeiten auf den zellulären Metabolismus sowie der zentralen Bedeutung als Regulator verschiedener biologischer Prozesse, die insgesamt die Metastasierung von Tumorzellen vorantreiben können, ein für die Tumorforschung interessantes Protein zu sein, dessen Potenzial als mögliche Zielstruktur therapeutischer Interventionen noch zu beurteilen bleibt.

5. Zusammenfassung

Die Ausbildung von Metastasen stellt die häufigste Todesursache von Krebspatienten und das größte Problem der Tumorthherapie dar. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die EDI3-Expression in metastasierenden Endometrium- und Ovarialkarzinomen stark erhöht ist. Außerdem wurde in beiden Krebstypen eine Assoziation zwischen hoher EDI3-Expression und verkürzter tumorfreier Überlebensdauer der Patienten und somit schlechter Prognose beschrieben. In der vorliegenden Studie konnte EDI3 als Glycerophosphodiesterase charakterisiert werden, welche die Hydrolyse von Glycerophosphocholin zu Glycerin-3-phosphat und Cholin katalysiert. Um einen Überblick über die mögliche Bedeutung von EDI3 und insbesondere die Metastasen-fördernden Eigenschaften zu erhalten, wurde die Expression von EDI3 in verschiedenen humanen Tumorzelllinien verändert. Eine Reduktion der EDI3-Expression in MCF7-, AN3CA- und OVCAR3-Zellen konnte das für diese Zellen typische niedrige GPC/PC-Verhältnis insbesondere durch die Erhöhung der intrazellulären GPC-Konzentration korrigieren. Untersuchungen mit Hilfe des traditionellen *Scratch*-Assays zeigten, dass EDI3 die PKC α -vermittelte Migration von MCF7- sowie AN3CA-Zellen beeinflussen kann. Die Modulation der EDI3-Expression führte in diesen Zelllinien zu Veränderungen der PKC α -Expression auf RNA- und Protein-Ebene, was auf eine mögliche Funktion von EDI3 im Rahmen der Transkriptionskontrolle hindeutet. Weitere Untersuchungen in MCF7- und OVCAR3-Zellen ließen auch einen Einfluss von EDI3 auf die Zelladhäsion sowie das *Spreading* erkennen, zweier Prozesse, die eng mit der Migration zusammenhängen. Der Verlust der zentralen Integrin-Untereinheit β 1 nach EDI3-Knockdown ging mit einer Verschlechterung von Adhäsion und *Spreading* auf einer Fibronectin-Matrix sowie der verspäteten Ausbildung von Membranausstülpungen einher. Die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen führte entsprechend zu einer Zunahme der Integrin β 1-Expression auf RNA- und Protein-Ebene und war mit einer Verbesserung von Adhäsion und *Spreading* assoziiert. Die zugrunde liegenden Mechanismen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden; erste Ergebnisse ließen allerdings vermuten, dass EDI3 die Reorganisation des Zytoskeletts und die Ausbildung Fokaler Adhäsionen unabhängig von der FAK/Src-Kaskade sowie den Rho-GTPasen Rac1 und RhoA beeinflusst. Insgesamt gewährt diese Arbeit einen grundlegenden Einblick in die biologische Funktion des ansonsten kaum charakterisierten Enzyms EDI3. Dies ist die erste umfassendere Studie, in der

ein Mitglied der GDE-Familie mit der Karzinogenese in Zusammenhang gebracht wird und auch die erste Analyse von EDI3 in humanen Zellen. Die Beobachtungen, dass EDI3 eine Rolle bei der Zelladhäsion, dem *Spreading* und der Migration spielt, bilden den Grundstein für das genauere Verständnis, auf welche Weise EDI3 zur Metastasierung von Tumorzellen beitragen kann.

6. Abstract

Metastasis from primary tumours is the leading cause of death in cancer patients and remains a major therapeutic challenge. Previously, EDI3 (Endometrial carcinoma differential 3) had been shown to be highly expressed in both primary endometrial and ovarian carcinomas that went on to develop metastasis. In addition, high EDI3 expression significantly reduced tumour-free survival time in patients and thus was predictive of worse prognosis in both cancer types. In this study, EDI3 could be characterised as a glycerophosphodiesterase that cleaves glycerophosphocholine to generate glycerol-3-phosphate and choline. In an attempt to achieve an overview of EDI3's possible role in the cell and especially its prometastatic functions, EDI3 expression levels were altered in different human cancer cell lines. Silencing of EDI3 in MCF7, AN3CA, and OVCAR3 cells corrected the low GPC/PC ratio typical for these tumour cells mainly by increasing intracellular GPC levels. Investigations using classic scratch assays showed that EDI3 has a major impact on cellular migration in both MCF7 and AN3CA cells, most likely via its direct influence on PKC α signalling. The modulation of EDI3 in these cell lines caused alterations of PKC α expression on the RNA and protein level, implying a possible role of EDI3 in transcriptional regulation. Further investigations using MCF7 and OVCAR3 cells revealed an influence of EDI3 on both attachment and integrin-mediated cell spreading, two processes that are intimately tied to cellular migration. Loss of the key integrin subunit β 1 upon EDI3 knockdown led to decreased cell attachment and spreading on a fibronectin matrix, which was accompanied by delayed formation of membrane protrusions. Accordingly, stable overexpression of EDI3 in MCF7 cells led to an increase in integrin β 1 RNA and protein expression and was associated with both enhanced cell attachment and spreading. The underlying mechanisms remain to be elucidated; however, initial results suggest that EDI3 influences the reorganisation of the actin cytoskeleton and the formation of focal adhesions in a FAK/Src-independent manner without affecting the Rho GTPases Rac1 or RhoA. Overall, the present study provides some insight into the biological function of the poorly characterised enzyme EDI3. It is the first study to implicate a member of the GDE family in tumourigenesis, and the first one to investigate EDI3 in a human system. The observations that EDI3 is associated with cell attachment, spreading, and migration are initial steps to understanding how EDI3 can contribute to the metastatic process.

7. Literaturverzeichnis

- Aboagye EO, Bhujwala ZM (1999). Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **59**, 80-84.
- Abramovici H, Mojtabaie P, Parks RJ, Zhong XP, Koretzky GA, Topham MK, Gee SH (2009). Diacylglycerol kinase ζ regulates actin cytoskeleton reorganization through dissociation of Rac1 from RhoGDI. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2049-2059.
- Ackerstaff E, Pflug BR, Nelson JB, Bhujwala ZM (2001). Detection of increased choline compounds with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy subsequent to malignant transformation of human prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* **61**, 3599-3603.
- Ahmed SM, Theriault BL, Uppalapati M, Chiu CWN, Gallie BL, Sidhu SS, Angers S (2010). KIF14 negatively regulates Rap1a-Radil signalling during breast cancer progression. *J. Cell Biol.* **199(6)**, 951-967.
- Ali AS, Ali S, El-Rayes BF, Philip PA, Sarkar FH (2009). Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy. *Cancer Treatment Rev.* **35**, 1-8.
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* **271**, 20246-20249.
- Bailey CL, Kelly P, Casey PJ (2009). Activation of Rap1 promotes prostate cancer metastasis. *Cancer Res.* **69(12)**, 4962-4968.
- Bamburg JR, McGough A, Ono S (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol.* **9(9)**, 364-370.
- Bell JD, Cox IJ, Sargentoni J, Peden CJ, Menon DK, Foster CS, Watanapa P, Iles RA, Urenjak J (1993). A ^{31}P and ^1H -NMR investigation in vitro of normal and abnormal human liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1225**, 71-77.

- Bellis SL, Zhang Y, Turner CE (1995). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 17437-17441.
- Besson A, Wilson TL, Yong VW (2002). The anchoring protein RACK1 links protein kinase C ϵ to integrin β chains. *J. Biol. Chem.* **277**, 22073-22084.
- Birkenmeier TM, MCQuillan JJ, Boedeker ED, Argraves WS, Ruoshlati E, Dean DC (1991). The alpha 5 beta 1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter. *J. Biol. Chem.* **266**, 20544-20549.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37(8)**, 911-917.
- Bos JL, de Bruyn K, Enserink J, Kuiperij B, Rangarajan S, Rehmann H, Riedl J, de Rooij J, van Mansfeld F, Zwartkruis F (2003). The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 83-86.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-877.
- Cai H, Smola U, Wixler V, Eisenmann-Tappe I, Diaz-Meco MT, Moscat J, Rapp U, Cooper GM (1997). Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17(2)**, 732-741.
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 954-963.
- Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH (1999). The talin head domain binds to integrin β subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 28071-28074.

- Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2417-2423.
- Cao MD, Döpkins M, Krishnamachary B, Vesuna F, Gadiya MM, Lenning PE, Bhujwalla ZM, Gribbestad IS, Glunde K (2012). Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5 (GDPD5) expression correlates with malignant choline phospholipid metabolite profiles in human breast cancer. *NMR Biomed.* **25(9)**, 1033-1042.
- Cary LA, Chang JF, Guan JL (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J. Cell Sc.* **109(7)**, 1787-1794.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **257(13)**, 7847-7851.
- Cervella P, Silengo L, Pastore C, Altruda F (1993). Human beta-1 integrin gene expression is regulated by two promoter regions. *J. Biol. Chem.* **268**, 5148-5155.
- Chae YC, Kim JH, Kim KL, Kim HW, Lee HY, Heo WD, Meyer T, Suh PG, Ryu SH (2008). Phospholipase D activity regulates integrin-mediated cell spreading and migration by inducing GTP-Rac translocation to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3111-3123.
- Charo IF, Nannizzi L, Smith JW, Cheresh DA (1990). The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin. *J. Cell. Biol.* **111(6)**, 2795-2800.
- Chen X, Rotenberg SA (2010). PhosphoMARCKS drives motility of mouse melanoma cells. *Cell. Signal.* **22**, 1097-1103.

- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Clark JH, Haridasse V, Glazer RI (2002) Modulation of the human protein kinase C alpha gene promoter by activator protein 2. *Biochemistry* **41(39)**, 11847-11856.
- Clem BF, Clem AL, Yalcin A, Goswami U, Arumugam S, Telang S, Trent JO (2011). A novel small molecule antagonist of choline kinase- α that simultaneously suppresses MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene* **30(30)**, 3370-3380.
- Consonni SV, Gloerich M, Spanjaard E, Bos JL (2012). Camp regulates DEP domain-mediated binding of the guanine exchange factor Epac1 to phosphatidic acid at the plasma membrane. *PNAS* **109**, 3814-3819.
- Corda D, Kudo T, Zizza P, Iurisci C, Kawai E, Kato N, Yanaka N, Mariggio S (2009 a). The developmentally regulated osteoblast phosphodiesterase GDE3 is glycerophosphoinositol-specific and modulates cell growth. *J. Biol. Chem.* **284**, 24848-24856.
- Corda D, Zizza P, Varone A, Filippi BM, Mariggio S (2009 b). The glycerophosphoinositols: cellular metabolism and biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3449-3467.
- Cory GO, Ridley AJ (2002). Cell motility: breaking WAVES. *Nature* **418**, 732-733.
- Cox IJ, Bell JD, Peden CJ, Iles RA, Foster CS, Watanapa P, Willimason RC (1992). In vivo and in vitro ^{31}P magnetic resonance spectroscopy of focal hepatic malignancies. *NMR Biomed.* **5**, 114-120.
- Danen EH, Sonneveld P, Brakebusch C, Fassler R, Sonnenberg A (2002). The fibronectin-binding integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell. Biol.* **159(6)**, 1071-1086.

- Davenport RW, Dou P, Rehder V, Kater SB (1993). A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* **361**, 721-724.
- Dawe CJ, Banfield WG, Morgan WD, Slatick MS, Curth HO (1964). Growth in continuous culture, and in hamsters, of cells from a neoplasm associated with acanthosis nigricans. *J. Natl. Cancer Inst.* **33**, 441-456.
- DerMardirossian C, Bokoch GM (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* **15(7)**, 356-363.
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol* **279(3)**, 429-438.
- DeRosier DJ, Edds KT (1980). Evidence for fascin crosslinks between the actin filaments in coelomocyte filopodia. *Exp. Cell Res.* **126**, 490-494.
- De Vries L, Farquhar MG (1999). RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. *Trends Cell Biol.* **9**, 138-143.
- Disatnik MH, Rando TA (1999). Integrin-mediated muscle cell spreading. *J. Biol. Chem.* **274(45)**, 32486-32492.
- Disatnik MH, Boutet SC, Lee CH, Mochly-Rosen D, Rando TA (2002). Sequential activation of individual PKC isozymes in integrin-mediated muscle cell spreading: a role for MARCKS in an integrin signalling pathway. *J. Cell Sci.* **115**, 2151-2163.
- Disatnik MH, Boutet SC, Pacio W, Chan AY, Ross LB, Lee CH, Rando TA (2004). The bi-directional translocation of MARCKS between membrane and cytosol regulates integrin-mediated muscle cell spreading. *J. Cell Sci.* **117**, 4469-4479.
- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac1/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* **1**, 253-259.

- Eidinoff ML, Cheong L, Rich MA (1959). Incorporation of unnatural pyrimidine bases into deoxyribonucleic acid of mammalian cells. *Science* **129(3362)**, 1550-1551.
- Eliyahu G, Kreizman T, Degani H (2007). Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: Molecular and biochemical studies. *Int. J. Cancer* **120**, 1721-1730.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Fang Z, Yao W, Xiong Y, Zhang J, Liu L, Li J, Zhang C, Wan J (2009). Functional elucidation and methylation-mediated downregulation of ITGA5 gene in breast cancer cell line MDA-MB-468. *J. Cell. Biochem.* **110**, 1130-1141.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *PNAS* **84**, 7413-7417.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Friedl P, Wolf K (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 362-374.
- Fritz G, Just I, Kaina B (1999). Rho GTPases are overexpressed in human tumors. *Int. J. Cancer* **81**, 682-687.
- Gallazzini M, Ferraris JD, Burg MB (2008). GDPD5 is a glycerophosphocholine phosphodiesterase that osmotically regulates the osmoprotective organic osmolyte GPC. *PNAS* **105(31)**, 11026-11031.
- Gao T, Brognard J, Newton AC (2008). The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **283(10)**, 6300-6311.

- Geiger TR, Peeper DS (2009). Metastasis mechanisms. *BBA* **1796**, 293-308.
- Glenney JR, Kaulfus P, Weber K (1981). F-actin assembly modulated by villin: Ca²⁺-dependent nucleation and capping of the barbed end. *Cell* **24**, 471-480.
- Glunde K, Ackerstaff E, Mori N, Jycobs MA, Bhujwalla ZM (2006). Choline phospholipid metabolism in cancer: Consequences for molecular pharmaceutical interventions. *Mol. Pharm.* **3(5)**, 496-506.
- Glunde K, Artemov D, Penet MF, Jacobs MA, Bhujwalla ZM (2010). Magnetic resonance spectroscopy in metabolic and molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chem. Rev.* **110**, 3043-3059.
- Glunde K, Jiang L, Moestue SA, Gribbestad IS (2011 a). MRS and MRSI guidance in molecular medicine: targeting and monitoring of choline and glucose metabolism in cancer. *NMR Biomed.* **24**, 673-690.
- Glunde K, Bhujwalla ZM, Ronen SM (2011 b). Choline metabolism in malignant transformation. *Nat. Rev. Canc.* **11**, 835-848.
- Gorin MA, Pan Q (2009). Protein kinase C ϵ : an oncogene and emerging tumor biomarker. *Mol. Cancer* **8**, 9-16.
- Guilluy C, Garcia-Mata R, Burridge K (2011). Rho protein crosstalk: another social network? *Trend Cell Biol.* **21(12)**, 718-726.
- Haller H, Lindschau C, Maasch C, Olthoff H, Kurscheid D, Luft FC (1998). Integrin-mediated protein kinase C α and C ϵ translocation to focal adhesion mediates vascular smooth muscle cell spreading. *Circ. Res.* **82**, 157-165.
- Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF (1983). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res.* **43**, 5379-5389.

- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646-674.
- Hemmings L, Rees DJ, Ohanian V, Bolton SJ, Gilmore AP, Patel B, Priddle H, Trevithick JE, Hynes RO, Critchley DR (1996). Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J. Cell Sci.* **109(11)**, 2715-2726.
- Hernandez-Alcoceba R, Saniger L, Campos J, Nunez MC, Khaless F, Gallo MA, Espinosa A, Lacal JC (1997). Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* **15**, 2289-2301.
- Hernandez-Alcoceba R, Fernandez F, Lacal JC (1999). In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anti-cancer drug discovery. *Cancer Res.* **59**, 3112-3118.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**, 1026-1030.
- Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T, Konishi I (2003). Upregulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab. Invest.* **83**, 861-870.
- Hotulainen P, Lappalainen P (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* **173**, 383-394.
- Hynes RO (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Hynes RO (2002). Integrins: bi-directional, allosteric signalling machines. *Cell* **110**, 673-687.

- Iliina O, Friedl P (2009). Mechanisms of collective cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3203-3208.
- Iorio E, Mezzanzanica D, Alberti P, Spadaro F, Ramoni C, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dolo V, Canevari S, Podo F (2005). Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res.* **65**, 9369-9376.
- Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, Castellano G, Di Vito M, Venturini E, Glunde K, Bhujwala ZM, Mezzanzanica D, Canevari S, Podo F (2010). Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 2126-2135.
- Jackson D, Zheng Y, Lyo D, Shen Y, Nakayama K, Nakayama KI, Humphries MJ, Reyland ME, Foster DA (2005). Suppression of cell migration by protein kinase C δ . *Oncogene* **24**, 3067-3072.
- Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, Dickson RB (1999). Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF-7 breast cancer cell invasiveness. *Exp. Cell. Res.* **247**, 105-113.
- Katz-Brull R, Lavin PT, Lenkinski RE (2002). Clinical utility of proton magnetic resonance spectroscopy in characterizing breast lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1197-1203.
- Kennedy EP (1957). Metabolism of lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **26**, 119-148.
- Keshari KR, Tsachres H, Iman R, Delos Santos L, Tabatabai ZL, Shinohara K, Vigneron DB, Kurhanewicz J (2011). Correlation of phospholipid metabolites with prostate cancer pathologic grade, proliferation status and surgical stage – impact of tissue environment. *NMR Biomed.* **24**, 691-699.

- Khalili P, Arakelian A, Chen G, Plunkett ML, Beck I, Parry GC, Donate F, Shaw DE, Mazar AP, Rabbani SA (2006). A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2271-2280.
- Kim LT, Yamada KM (1997). The regulation of expression of integrin receptors. *PSEBM* **214**, 123-131.
- Kim H, McCulloch CA (2011). Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS Lett.* **585**, 18-22.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng JH, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248.
- Kolch W, Heidecker G, Koch G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR (1993). Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**, 249-252.
- Kopp F, Komatsu T, Nomura DK, Trauger SA, Thomas JR, Siuzdak G, Simon GM, Cravatt BF (2010). The glycerophospho-metabolome and its influence on amino acid homeostasis revealed by brain metabolomics of GDE1(-/-) mice. *Chem. Biol.* **17(8)**, 831-840.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L (1995). The Ras-related protein Cdc42KS and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **15(4)**, 1942-1952.
- Krause M, Dent EW, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 541-564.

- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**, 680-685.
- Lark AL, Livasy CA, Dressler L, Moore DT, Millikan RC, Geradts J, Iacocca M, Cowan D, Little D, Craven RJ, Cance W (2005). High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype. *Mod. Pathol.* **18**, 1289-1294.
- Larson TJ, Ehrmann M, Boos W (1983). Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *Escherichia coli*, a new enzyme of the *glp* regulon. *J. Biol. Chem.* **258(9)**, 5428-5432.
- Larsson C (2006). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell. Signal.* **18**, 276-284.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-369.
- Legate KR, Montanez E, Kudlacek O, Fässler R (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 20-31.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK-1. *Science* **281(5385)**, 2042-2045.
- Lesjak MS (2010). The role of Edi-3 (KIAA1434) in prometastatic cell signalling. *Masterarbeit an der Fakultät für Chemie und Biochemie der Ruhr-Universität Bochum.*
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**, 402-408.

- Lønne GK, Cornmark L, Omanovic Zahirovic I, Landberg G, Jirström K, Larsson C (2010). PKC α expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Mol. Cancer* **9**, 76-89.
- Luo M, Guan JL (2010). Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett.* **289(2)**, 127-139.
- Machesky LM, Reeves E, Wientjes F, Mattheyse FJ, Grogan A, Totty NF, Burlingame AL, Hsuan JJ, Segal AW (1997). Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionary conserved proteins. *Biochem. J.* **328**, 105-112.
- Marchan R, Lesjak MS, Stewart JD, Winter R, Seeliger J, Hengstler JG (2012). Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 links tumor metabolome to signaling network activities. *Cell Cycle* **11(24)**, 4499-4506.
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö6976. *J. Biol. Chem.* **268(13)**, 9194-9197.
- Maschler S, Wirl G, Spring H, Bredow DV, Sordat I, Beug H, Reichmann E (2005). Tumour cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* **24**, 2032-2041.
- Mattila PK, Lappalainen P (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 446-454.
- Maung K, Easty DJ, Hill SP, Bennett DC (1999). Requirement for focal adhesion kinase in tumor cell adhesion. *Oncogene* **18**, 6824-6828.
- McGrath JL (2007). Cell spreading: the power to simplify. *Curr. Biol.* **17(10)**, 357-358.
- Memon AR (2004). The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *BBA* **1664**, 9-30.

- Mierke CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B (2010). Integrin $\alpha 5\beta 1$ facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J. Cell Sci.* **124**, 369-383.
- Mills GB, Moolenaar WH (2003). The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 582-591.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**, 954-962.
- Newton AC (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* **370**, 361-371.
- Newton AC (2009). Lipid activation of protein kinases. *J. Lipid Res.* **50**, 266-271.
- Ng T, Shima D, Squire A, Bastiaens PIH, Gschmeissner S, Humphries MJ, Paper PJ (1999). PKC α regulates $\beta 1$ integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *EMBO J.* **189(14)**, 3909-3923.
- Nobes CD, Hall A (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81(1)**, 53-62.
- Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Park IA, Kim JH, Soh PG, Ryu SH, Lee KH, Han JS (2000). Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues. *Canc. Lett.* **161**, 207-214.
- O'Brian C, Vogel VG, Singletary SE, Ward NE (1989). Elevated protein kinase C expression in human breast tumor biopsies relative to normal breast tissue. *Cancer Res.* **49**, 3215-3217.

- Okazaki Y, Ohshima N, Yoshizawa I, Kamei Y, Mariggio S, Okamoto K, Maeda M, Nogusa Y, Fujioka Y, Izumi T, Ogawa Y, Shiro Y, Wada M, Kato N, Corda D, Yanaka N (2010). A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase, GDE5, controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. *J. Biol. Chem.* **285(36)**, 27652-27663.
- Olofsson B (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* **11**, 545-554.
- Olson MF, Sahai E (2009). The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 273-287.
- Orr JW, Keranen LM, Newton AC (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **267(22)**, 15263-15266.
- Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4806-4818.
- Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG (1995). Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.* **55(13)**, 2752-2755.
- Pan Q, Bao LW, Teknos TN, Merajver SD (2005). Targeted disruption of protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. *Cancer Res.* **65(18)**, 8366-8371.
- Park S, Lee C, Sabharwal P, Zhang M, Freel Meyers CL, Sockanathan S (2013). GDE2 promotes neurogenesis by glycosylphosphatidylinositol-anchor cleavage of RECK. *Science* **339**, 324-328.

Pellegrin S, Mellor H (2007). Actin stress fibres. *J. Cell Sc.* **120(20)**, 3491-3499.

Peng X, Ueda H, Zhou H, Stokol T, Shen TL, Alcaraz A, Nagy T, Vassalli JD, Guan JL (2004). Overexpression of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells promotes angiogenesis in transgenic mice. *Cardiovasc. Res.* **64**, 421-430.

Platet N, Prevostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M (1998). Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int. J. Cancer* **75**, 750-756.

Podo F, Canevari S, Canese R, Pisanu ME, Ricci A, Iorio E (2011). *NMR Biomed.* **24**, 648-672.

Pollard TD, Borisy GG (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465.

Ramirez de Molina A, Gutierrez R, Ramos MA, Silva JM, Silva J, Bonilla F, Sanchez JJ, Lacal JC (2002 a). Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene* **21**, 4317-4322.

Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Gutierrez R, Martinez-Pineiro L, Sanchez J, Bonilla F, Rosell R, Lacal JC (2002 b). Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296(3)**, 580-583.

Ramirez de Molina A, Banez-Coronel M, Gutierrez R, Rodriguez-Gonzalez A, Olmeda D, Megias D, Lacal JC (2004). Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. *Cancer Res.* **64**, 6732-6739.

- Rao M, Sockanathan S (2005). Transmembrane protein GDE2 induces motor neuron differentiation in vivo. *Science* **309**, 2212-2215.
- Ricard AD, Tolcher AW, Liu G, Holen K, Schwartz G, Albertini M, Weiss G, Yazji S, Ng C, Wilding G (2008). Volociximab, a chimeric monoclonal antibody that specifically binds alpha5beta1 integrin: a phase I, pharmacokinetic, and biological correlative study. *Clin Cancer Res.* **14**, 7924-7929.
- Ridley AJ, Hall A (1992 a). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992 b). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.
- Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, Cox AD, Wilson O, Kirschmeier P, Der CJ (2008). Rho family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J. Biol. Chem.* **283(37)**, 25150-25163.
- Rodriguez M, Choi J, Sockanathan S (2012). GDE2 regulates cortical neuronal identity by controlling the timing of cortical progenitor differentiation. *Development* **139**, 3870-3879.
- Ross SH, Spanjaard E, Post A, Vliem MJ, Kristyanto H, Bos JL, de Rooij J (2012). Rap1 can bypass the FAK-Src-Paxillin cascade to induce cell spreading and focal adhesion formation. *PLOS ONE* **7(11)**, e50072.
- Sabharwal P, Lee C, Rao M, Sockanathan S (2011). GDE2 regulates subtype-specific motor neuron generation through inhibition of Notch signalling. *Neuron* **71**, 1058-1070.

- Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT (1992). pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *PNAS* **89(11)**, 5192-5196.
- Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JZ (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1680-1688.
- Schaller MD (2001). Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* **20**, 6459-6472.
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D (2004). Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *BBA* **1692**, 77-102.
- Schmidt A, Hall A (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587-1609.
- Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, Dehne K, Gerhard M, Graeff H, Harbeck N, Schmitt M, Lengyel E (2000). Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**, 3013-3020.
- Schober M, Raghavan S, Nikolova M, Polak L, Pasolli HA, Beggs HE, Reichardt LF, Fuchs E (2007). Focal adhesion kinase modulates tension signalling to control actin and focal adhesion dynamics. *J. Cell. Biol.* **176(5)**, 667-680.
- Scott SA, Selvy PE, Buck JR, Cho HP, Criswell TL, Thomas AL, Armstrong MD, Arteaga CL, Lindsley CW, Brown HA (2009). Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness. *Nat. Chem. Biol.* **5(2)**, 108-117.

- Shah T, Wildes F, Penet MF, Winnard PT, Glunde K, Artemov D, Ackerstaff E, Gimi B, Kakkad S, Raman V, Bhujwala ZM (2010). Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells. *NMR Biomed.* **23**, 633-642.
- Shen TL, Park AY, Alcaraz A, Peng X, Jang I, Koni P, Flavell RA, Gu H, Guan JL (2005). Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *J. Cell Biol.* **169**, 941-952.
- Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sc.* **112(16)**, 2677-2691.
- Sledge GW, Gokmen-Polar Y (2006). Protein kinase C-beta as a therapeutic target in breast cancer. *Semin. Oncol.* **33**, 15-18.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51(5)**, 1409-1416.
- Small JV, Stradal T, Vignat E, Rottner K (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* **12(3)**, 112-120.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt. Biochem.* **150**, 76-85.
- Song GJ, Leslie KL, Barrick S, Bougoin S, Taboas JM, Bisello A (2012). EBP50 promotes focal adhesion turnover and vascular smooth muscle cells migration. *J. Mol. Cell. Card.* **53**, 809-819.
- Staude H (2008). Unterschiedliche Genexpression in metastasierenden und nicht metastasierenden Endometriumkarzinomen. *Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum.*

- Stensman H, Larsson C (2008). Protein kinase Cepsilon is important for migration of neuroblastoma cells. *BMC Cancer* **8**, 365-377.
- Stewart JD, Marchan R, Lesjak MS, Lambert J, Hergenröder R, Ellis JK, Lau CH, Keun HC, Schmitz G, Schiller J, Eibisch M, Hedberg C, Waldmann H, Lausch E, Tanner B, Sehouli J, Sagemüller J, Staude H, Steiner E, Hengstler JG (2012). Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 links the tumor metabolome to signaling network activities. *PNAS* **109(21)**, 8155-8160.
- Su W, Yeku O, Olepu S, Genna A, Park JS, Ren H, Du G, Gelb MH, Morris AJ, Frohman MA (2009). 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis. *Mol. Pharmacol.* **75**, 437-446.
- Sun HQ, Kwiatkowska K, Yin HL (1995). Actin monomer binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7(1)**, 102-110.
- Sun XG, Rotenberg SA (1999). Overexpression of protein kinase C α in MCF-10A human breast cells engenders dramatic alterations in morphology, proliferation, and motility. *Cell Growth & Diff.* **10**, 343-352.
- Swanson MG, Keshari KR, Tabatabai ZL, Simko JP, Shinohara K, Carroll PR, Zektzer AS, Kurhanewicz J (2008). Quantification of choline- and ethanolamine-containing metabolites in human prostate tissues using ^1H HR-MAS total correlation spectroscopy. *Magn Reson Med* **60**, 33-40.
- Tachado SD, Mayhew MW, Wescott GG, Foreman TL, Goodwin CD, McJilton MA, Terrian DM (2002). Regulation of tumor invasion and metastasis in protein kinase C epsilon-transformed NIH3T3 fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* **85(4)**, 785-797.
- Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA (2003). Talin binding to integrin β tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**, 103-106.

- Tan M, Li P, Sun M, Yin G, Yu D (2006). Upregulation and activation of PKC α by ErbB2 through Src promotes breast cancer cell invasion that can be blocked by combined treatment with PKC α and Src inhibitors. *Oncogene* **25**, 3286-3295.
- Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A (1991). Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351(6324)**, 320-322.
- Tommassen J, Eiglmeier K, Cole ST, Overduin P, Larson TJ, Boos W (1991). Characterization of two genes, *glpQ* and *ugpQ*, encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterases of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 321-327.
- Topanurak S, Ferraris JD, Li J, Izumi Y, Williams CK, Gucek M, Wang G, Zhou X, Burg MB (2013). High NaCl- and urea-induced posttranslational modifications that increase glycerophosphocholine by inhibiting GDPD5 phosphodiesterase. *PNAS* **110(18)**, 7482-7487.
- Uchida N, Okamura S, Nagamachi Y, Yamashita S (1997). Increased phospholipase D activity in human breast cancer. *J. Canc. Res. Clin. Oncol.* **123(5)**, 280-285.
- Weis K (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-451.
- Wennerberg L, Rossman KL, Der CJ (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci.* **118**, 843-846.
- Wessel D, Flügge UI (1984). A method for the quantitative recovery of protein in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138(1)**, 141-143.
- White DE, Kurpios NA, Zuo D, Hassell JA, Blaess S, Mueller U, Muller WJ (2004). Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell* **6**, 159-170.

- Woods A, Couchman JR (1992). Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* **101**, 277-290.
- Wu C, Asokan SB, Berginski ME, Haynes EM, Sharpless NE, Griffith JD, Gomez SM, Bear JE (2012). Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell* **148**, 973-987.
- Wulf E, Deboen A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland TH (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *PNAS* **76**, 4498-4502.
- Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$. *Science* **294**, 339-345.
- Xiong JP, Stehlt T, Zhang R, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA (2002). Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**, 151-155.
- Yanaka N, Imai Y, Kawai E, Akatsuka H, Wakimoto K, Nogusa Y, Kato N, Chiba H, Kotani E, Omori K, Sakurai N (2003). Novel membrane protein containing glycerophosphodiester phosphodiesterase motif is transiently expressed during osteoblast differentiation. *J. Bio. Chem.* **278(44)**, 43595-43602.
- Yanaka N (2007 a). Mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1811-1818.
- Yanaka N, Nogusa Y, Fujioka Y, Yamashita Y, Kato N (2007 b). Involvement of membrane protein GDE2 in retinoic acid-induced formation in Neuro2A cells. *FEBS Lett.* **581**, 712-718.
- Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393(6687)**, 809-812.

Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C (2007). Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res.* **67**, 659-664.

Zerial M, McBride H (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117.

Zhao JH, Resike H, Guan JL (1998). Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* **143**, 1997-2008.

Zheng B, Chen D, Farquhar MG (2000). MIR16, a putative membrane glycerophosphodiester phosphodiesterase, interacts with RGS16. *PNAS* **97(8)**, 3999-4004.

Zheng B, Berrie CP, Corda D, Farquhar MG (2003). GDE1/MIR16 is a glycerophosphoinositol phosphodiesterase regulated by stimulation of G protein-coupled receptors. *PNAS* **100(4)**, 1745-1750.

8. Anhang**8.1 Abkürzungsverzeichnis**

APS	Ammoniumpersulfat
<i>aqua dest.</i>	Millipore-Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Cho	Cholin
ChoK α	Cholinkinase α
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA/RNA	Desoxyribonukleinsäure / Ribonukleinsäure
DTT	2,3-Dihydroxy-1,4-dithiobutan
ECM	Extrazelluläre Matrix
ED13	Endometriumkarzinom Differenziell-3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER ^{+/-}	Östrogenrezeptor-positiv/negativ
<i>et al.</i>	und andere
FA	Fokale Adhäsion
FAK	Fokale Adhäsions-Kinase
FCS	Fötale Kälberserum
FN	Fibronectin
g/mg/ μ g/ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
G3P	Glycerin-3-phosphat
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDE	Glycerophosphodiesterase
GDI	GTPase-Dissoziations-Inhibitor
GDP/GTP	Guanosindiphosphat/Guanosintriphosphat
GEF	Guanosinnukleotid-Austauschfaktor
GPC	Glycerophosphocholin

h	Stunde(n)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
l/ml/ μ l	Liter/Milliliter/Mikroliter
M/mM/ μ M	molar, millimolar, mikromolar
min	Minute(n)
MLC	Regulatorische Leichte Kette von Myosin
mm/ μ m/nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PA	Phosphatidsäure
PC	Phosphocholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PLA/C/D	Phospholipase A/C/D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdCho	Phosphatidylcholin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
v/v, w/v	Volumen pro Volumen, Gewicht pro Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung
z. B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Typische Fähigkeiten von Tumorzellen _____	1
Abbildung 1.2: Domänenstruktur der GDE-Familie _____	2
Abbildung 1.3: Abbau von Glycerophosphoinositol durch GDE und GDE3 _____	5
Abbildung 1.4: EDI3 als potenzieller prognostischer Faktor für die Metastasierung von Endometriumkarzinomen _____	6
Abbildung 1.5: Typische 1H-MRS-Spektren der Cholin-Metabolite _____	7
Abbildung 1.6: Die wichtigsten Enzyme des Cholin-Metabolismus _____	8
Abbildung 1.7: Die Familie der Integrin-Rezeptoren _____	10
Abbildung 1.8: Biogenese Fokaler Adhäsionen _____	11
Abbildung 1.9: Organisation von Aktinfilamenten in Lamellipodien und Filopodien _____	13
Abbildung 1.10: Struktur von Aktin-Stressfasern _____	14
Abbildung 1.11: Die Aktivierung konventioneller PKCs _____	18
Abbildung 3.1: Putative Enzymreaktion von EDI3 _____	45
Abbildung 3.2: EDI3 hydrolysiert GPC unter Bildung von G3P _____	46
Abbildung 3.3: EDI3 hydrolysiert GPC unter Bildung von Cholin _____	47
Abbildung 3.4: Konzentrations- und zeitabhängige EDI3-Aktivität in NIH3T3- Zelllysaten _____	48
Abbildung 3.5: EDI3-Knockdown in MCF7-Zellen _____	50
Abbildung 3.6: EDI3-Knockdown in AN3CA-Zellen _____	51
Abbildung 3.7: EDI3-Knockdown in OVCAR3-Zellen _____	52
Abbildung 3.8: EDI3-Überexpression in MCF7-Zellen _____	53
Abbildung 3.9: Veränderungen der EDI3-Level beeinflussen nicht die Expression von GDE2 _____	54
Abbildung 3.10: Der Knockdown von EDI3 in MCF7-Zellen verändert die intrazellulären Metabolit-Konzentrationen von GPC und PC _____	56
Abbildung 3.11: Der Knockdown von EDI3 in AN3CA-Zellen erhöht die intrazelluläre GPC-Konzentration _____	57
Abbildung 3.12: Der Knockdown von EDI3 führt intrazellulär zu einer Erhöhung Der GPC- sowie zu einer Abnahme der Cholin-Konzentration _____	58
Abbildung 3.13: Der Knockdown von EDI3 beeinträchtigt die Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen _____	60

Abbildung 3.14: Der Knockdown von EDI3 führt zu einer Reduktion der PKC α -Expression in MCF7-Zellen _____	61
Abbildung 3.15: Analyse der Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen nach kombinierter EDI3- und PKC-Modulation _____	62
Abbildung 3.16: Die Überexpression von EDI3 verbessert die Migration von MCF7-Zellen und ist assoziiert mit einer Zunahme der PKC α -Expression _____	64
Abbildung 3.17: Analyse der Migrationsfähigkeit von MCF7-Zellen nach kombinierter EDI3-Überexpression und PKC α -Knockdown _____	65
Abbildung 3.18: Der Knockdown von EDI3 verschlechtert die Migrationsfähigkeit von AN3CA-Zellen _____	66
Abbildung 3.19: Der Knockdown von EDI3 in AN3CA-Zellen ist assoziiert mit verminderter Expression von PKC α _____	67
Abbildung 3.20: Der Knockdown von EDI3 hat in OVCAR3-Zellen keinen Einfluss auf die PKC α -vermittelte Migration _____	68
Abbildung 3.21: Schritte zur Verbesserung der Adhäsion von OVCAR3-Zellen auf Fibronektin _____	70
Abbildung 3.22: Einfluss der FN-Konzentration auf die Adhäsion von OVCAR3-Zellen _____	71
Abbildung 3.23: Adhäsions-Zeitreihen mit unbehandelten MCF7- OVCAR3- und AN3CA-Zellen _____	72
Abbildung 3.24: Der Knockdown von EDI3 verschlechtert die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen _____	74
Abbildung 3.25: Die Überexpression von EDI3 verbessert die Adhäsion von MCF7-Zellen _____	75
Abbildung 3.26: Der Knockdown von EDI3 führt zu reduzierter Expression des FN-Rezeptors Integrin $\alpha 5\beta 1$ in MCF7-Zellen _____	76
Abbildung 3.27: Der Knockdown von EDI3 kann in OVCAR3-Zellen die Expression des FN-Rezeptors Integrin $\alpha 5\beta 1$ reduzieren _____	77
Abbildung 3.28: Die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen erhöht die Expression des FN-Rezeptors Integrin $\alpha 5\beta 1$ _____	78
Abbildung 3.29: Der Knockdown von EDI3 verlangsamt das <i>Spreading</i> von MCF7-Zellen auf FN _____	80

Abbildung 3.30: Der Knockdown von EDI3 verlangsamt das <i>Spreading</i> von OVCAR3-Zellen auf FN _____	81
Abbildung 3.31: Die Überexpression von EDI3 beschleunigt das <i>Spreading</i> von MCF7-Zellen auf FN _____	82
Abbildung 3.32: Der Knockdown von EDI3 beeinträchtigt das <i>Spreading</i> von Tumorzellen _____	84
Abbildung 3.33: z-Stack einer MCF7-Kontroll-Zelle _____	85
Abbildung 3.34: z-Stack einer MCF7- Zelle mit EDI3-Knockdown _____	86
Abbildung 3.35: Verschiedene Darstellungsweisen von MCF7-Zellen während des <i>Spreadings</i> _____	87
Abbildung 3.36: Der Knockdown von EDI3 in MCF7-Zellen führt zu verminderter Zellgröße während des <i>Spreadings</i> _____	88
Abbildung 3.37: Der Knockdown von EDI3 in OVCAR3-Zellen führt zu verminderter Zellgröße während des <i>Spreadings</i> _____	89
Abbildung 3.38: Die Überexpression von EDI3 verbessert das <i>Spreading</i> von Tumorzellen _____	90
Abbildung 3.39: Die Überexpression von EDI3 in MCF7-Zellen führt zu einer Vergrößerung der Zellfläche während des <i>Spreadings</i> _____	91
Abbildung 3.40: Der Knockdown von EDI3 hat keinen Einfluss auf die GTP-Beladung der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA _____	92
Abbildung 3.41: Die Überexpression von EDI3 hat keinen Einfluss auf die GTP-Beladung der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA _____	93
Abbildung 3.42: Der Knockdown von EDI3 hat keinen Einfluss auf die Membran-Translokation der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA _____	94
Abbildung 3.43: EDI3 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Signalproteine FAK, Src, Paxillin und MLC _____	96
Abbildung 3.44: Der Knockdown von EDI3 führt in MCF7-Zellen zur Ausbildung weniger, dafür aber größerer Fokaler Adhäsionen _____	97
Abbildung 3.45: Der Knockdown von EDI3 führt in OVCAR3-Zellen zur Ausbildung weniger, dafür aber größerer Fokaler Adhäsionen _____	98
Abbildung 3.46: Die Überexpression von EDI3 führt in MCF7-Zellen zur Ausbildung vieler, dafür aber kleinerer Fokaler Adhäsionen _____	99
Abbildung 4.1: Hypothetische Verbindung zwischen Cholin-Metabolismus und intrazellulärer Signalgebung _____	112

8.3 Lebenslauf

Name: Lesjak
 Vorname: Michaela Silvia
 Geburtsdatum: 09.05.1986
 Geburtsort: Essen, NRW
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

1992-1996 Grundschule an der Gathestraße, Mülheim an der Ruhr
 1996-2005 Städtisches Gymnasium Heißen, Mülheim an der Ruhr
 Juni 2005 Abschluss: Abitur (Gesamtnote 1,4)

Hochschulausbildung:

WS 2005/2006 Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum im
 Studiengang Biochemie
 Juli 2008 Abschluss: *Bachelor of Science* (Gesamtnote 1,2)
 Schwerpunkt: Molekulare Medizin
 Titel der Bachelorarbeit:
 „Mutagenese des cTnI-Gens und Etablierung der Myosin-
 präparation aus Herzgewebe“
 Mai 2010 Abschluss: *Master of Science* (Gesamtnote 1,0)
 Schwerpunkt: Molekulare Medizin
 Titel der Masterarbeit:
 „*The role of EDI3 (KIAA1434) in prometastatic cell signalling*“
 (Preis der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie
 für die jahrgangsbeste Masterarbeit)
 seit WS 2010/2011 Promotionsstudiengang an der Fakultät für Chemie und
 Chemische Biologie der TU Dortmund

Beruflicher Werdegang:

seit Juli 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für
 Arbeitsphysiologie an der Technischen Universität Dortmund
 in der Arbeitsgruppe Systemtoxikologie (Prof. Jan G. Hengstler)

Wissenschaftliche Publikationen:

Stewart JD, Marchan R, **Lesjak MS**, Lambert J, Hergenröder R, Ellis JK, Lau CH, Keun HC, Schmitz G, Schiller J, Eibisch M, Hedberg C, Waldmann H, Lausch E, Tanner B, Sehouli J, Sagemüller J, Staude H, Steiner E, Hengstler JG (2012). Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. *PNAS* 109(21), 8155-8160.

Marchan R, **Lesjak MS**, Stewart JD, Winter R, Seeliger J, Hengstler JG (2012). Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 links the tumor metabolome to signaling network activities. *Cell Cycle* 11(24), 4499-4506.

Lesjak MS, Marchan R, Stewart JD, Rempel E, Rahnenführer J, Hengstler JG (2014). EDI3 links choline metabolism to integrin expression, cell adhesion and spreading.

MANUSKRIFT EINGEREICHT

8.4 Danksagung

Mein Dank gilt selbstverständlich Prof. Dr. Jan G. Hengstler für die interessante Themenstellung, die Betreuung und die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Frank Wehner danke ich für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich Dr. Rosemarie Marchan für die gemeinsamen Diskussionen und ihre Art der Betreuung „auf Augenhöhe“ danken.

Auch meiner ehemaligen Betreuerin Dr. Joanna D. Stewart möchte ich insbesondere für ihre Unterstützung in der Anfangszeit danken. I still miss your positive energy!

Georgia, meine Zeit am IfADo wäre nicht das Gleiche ohne dich! Du bist immer für mich da, egal was ich gerade am meisten brauche; ob als kompetente Kollegin, gute Freundin oder auch mal tröstende Ersatz-Mutti.

Auch bei den anderen Mitarbeitern des IfADo möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung und die nette Atmosphäre im Labor bedanken.

Meiner guten Freundin Kathrin möchte ich dafür danken, dass sie mich trotz der räumlichen Entfernung auch in den letzten Jahren mit ihren guten Ratschlägen begleitet hat. Obwohl sie selbst die Schattenseiten erlebt und nach unserem gemeinsamen Studium der Wissenschaft den Rücken zugekehrt hat, hat sie mich immer zum Weiterkämpfen motiviert. „Aber übertreib es nicht!“

Bastian, dir möchte ich nicht nur dafür danken, dass du mich so oft sicher, schnell und mit einem offenen Ohr nach Dortmund gebracht hast, sondern auch dafür, dass du es immer wieder schaffst mich zum Lachen zu bringen und mir so den Einstieg in den Tag erleichterst.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie! Ihr wisst, dass ihr die wichtigsten Menschen in meinem Leben seid und dass all das hier ohne euch überhaupt nicht möglich gewesen wäre. Ihr habt mir schon immer auf so viele Weisen geholfen und hättet in den letzten Jahren noch mehr getan, wenn ihr nur könntet. Ihr habt die schönen Momente übergücklich und voller Stolz mit mir geteilt, aber vor allem in den schwierigen Zeiten zu mir gehalten und meine Launen meistens mit Fassung ertragen. Ich bin so froh, dass ich euch habe. Liebhab! ☺ Chichi, der ist für dich. :-*

9. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt, außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln keine weiteren benutzt und alle Textstellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommen worden sind, als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Mülheim an der Ruhr, den 14.03.2014

M. Lesjak

(M. Lesjak)