

Steuerung der Zellmigration durch Kollaps-Faktoren und Collapsin Response Mediator Protein 4

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Lingsong Dai

aus

Liaoning, China

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent. PD. Dr. Joachim Kappler
2. Referent. Prof. Dr. Christa E. Müller

Tag der Promotion: 29.08.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2001 bis März 2005
am Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn, Nussallee 11
unter Leitung von PD Dr. Joachim Kappler durchgeführt.

Meinen lieben Eltern gewidmet

Veröffentlichungen:

Volker Rosslbroich, **Lingsong Dai**, Sebastian Franken, Marion Gehrke, Ulrich Junghans, Volkmar Gieselmann, and Joachim Kappler (2003). "Subcellular localization of collapsin response mediator proteins to lipid rafts." *Biochem Biophys Res Commun* **305**(2): 392-9.

Lingsong Dai, Wolfgang Alt, Karl Schilling, Volkmar Gieselmann, Thomas M Magin, Joachim Kappler (eingereicht). "A fast and robust quantitative time-lapse assay for cell migration."

Volker Rosslbroich*, **Lingsong Dai***, Stephan L. Baader, Angelika A. Noegel, Volkmar Gieselmann and Joachim Kappler (im Druck). "Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling." *Experimental Cell Research*

(*: gleicher Beitrag beider Autoren)

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen:	I
Inhaltsverzeichnis	II
Verzeichnis der Abkürzungen	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Molekulare Mechanismen der Zellmotilität.....	2
2.1.1 Zellmigration und Cytoskelett	2
2.1.2 Regulation des Actin-Cytoskletts und Zellmigration	3
2.2 Zelladhäsion, extrazelluläre Matrix und „guidance“-Moleküle	6
2.3 CRMP-4	8
2.4 Messung der Zellmigration.....	10
2.5 Problemstellung der Arbeit.....	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Verwendete Materialien, Medien, Organismen und Zellen.....	13
3.1.1 Geräte.....	13
3.1.1.1 Mikroskope.....	13
3.1.1.1.1 Fluoreszenz-Mikroskope	13
3.1.1.1.2 Lichtmikroskope invers.....	13
3.1.1.2 Inkubatoren.....	13
3.1.1.3 Geräte für Elektrophorese und Westernblot	14
3.1.1.4 Zentrifugen.....	14
3.1.2 Verwendete Zelllinien.....	14
3.1.3 Verwendete Bakterienstämme	15
3.1.4 Verwendete Puffer, Medien und Lösungen	15
3.1.5 Verwendete Vektoren	20
3.1.6 Membranen und Filme.....	22

INHALTSVERZEICHNIS

3.2	Zellbiologische Methoden.....	22
3.2.1	Reinigung von Deckgläsern mit HNO ₃	23
3.2.2	Trypsinieren von Zellen.....	23
3.2.3	Kryokonservierung von Zellen.....	23
3.2.4	Auftauen und Revitalisieren von Zellen.....	24
3.2.5	Transfektion von B35/HEK293 Zellen mit EXGEN500.....	24
3.2.6	Inhibierung der Genexpression durch siRNA-Oligonukleotide.....	25
3.2.7	Zellmigrationstest.....	26
3.2.7.1	Bildaufnahme.....	26
3.2.7.2	Auswertung.....	26
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.3.1	QIAquick Gel Extraktion.....	27
3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	28
3.3.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	28
3.3.3.1	Photometrische Analyse.....	28
3.3.3.2	Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarose-Gel.....	29
3.3.4	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	29
3.3.5	Ligation.....	29
3.3.6	Isolierung von DNA.....	30
3.3.6.1	Mini-Präparation von Plasmid DNA (Qiagen-Methode).....	30
3.3.6.2	Midi-Präparation von Plasmid DNA (Qiagen-Methode).....	31
3.3.6.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	32
3.3.6.3.1	Herstellung von kompetenten Bakterien für die klassische Transformation.....	32
3.3.6.4	Klassische Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	33
3.3.7	DNA-Amplifizierung über Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	34
3.3.8	DNA-Sequenzanalyse.....	35
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	36
3.4.1	Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen.....	36
3.4.2	Reinigung der rekombinanten Proteine.....	37
3.4.3	SDS-PAGE und Westernblot.....	37
3.4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37

3.4.3.2	Westernblot nach dem Semi Dry Verfahren	38
3.4.3.3	Färbungen von Polyacrylamid Gelen	39
3.4.3.3.1	Coomassie Färbung	39
3.4.3.3.2	Silberfärbung	39
3.4.4	Proteinbestimmungen	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Entwicklung eines Migrationstests	40
4.2	Zellmigration nach Überexpression von CRMP-4 und nach „Knockdown“ von CRMP-4	50
4.2.1	Überexpression von CRMP-4	50
4.2.2	„Knockdown“ von CRMP-4	59
4.3	Suche nach Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Zellmigration	65
5	Diskussion	80
5.1	Vorteile des etablierten Migrationstests	80
5.2	CRMP-4 und Zellmigration	82
5.3	Suche nach migrationshemmenden Substanzen	88
5.4	Ausblick	92
6	Literaturverzeichnis	93
7	Danksagung	101
8	Lebenslauf	102

Verzeichnis der Abkürzungen

ABD	Actinbindende Domäne
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp	Actin related protein
ATP	Adenosintriphosphat
b-img	binarized image
BPA	black pixel area
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CAI	Carboxyamidotriazol
CB	Cytochalasin B
CDNA	komplementäre DNA
CFP	Cyan fluorescent protein
CRAM	CRMP3-associated molecule
CRMP	Collapsin Response Mediator Protein
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DAPI	4,6-diamidino-2-Phenylindol
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCTP	Desoxycytidintriphosphat
DGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNTP	Mischung aus vier verschiedenen Desoxyribonucleosidtriphosphaten
DRP	Dihydropyrimidinase Related Protein
DTT	Dithiothreitol
DTTP	Desoxythymidintriphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
GBD	Cdc42/Rac-GTPase-bindende Domäne
GFP	Green fluorescent protein
GSK	glycogen synthase kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
His	Histidine
img	image
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranoside
Kb	Kilobasenpaare
K_D	Dissoziations-Konstante
KDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
MAP	Mikrotubuli assoziierten Proteine
MIM	Missing in Metastasis
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MW	Molecular Weight
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

ABKÜRZUNGEN

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyde
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethyldisulphonylfluoride
Prj	Projection
RDI	relative displacement index (=relativer Migrations-Index)
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Electrophorese
siRNA	short interfering RNA
Std	Stunde(n)
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS/T	Tris Buffer Saline/Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TOAD	Turned On After Division
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Tris/Cl	Tris(hydroxymethyl) aminomethane chloride
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate
U	Unit
Ulip	Unc-33 like Phosphoprotein
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
v/v	Volumenverhältnis

WASp

Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

w/v

Gewicht zu Volumen

1 Zusammenfassung

1. In dieser Arbeit wurde ein allgemeiner methodischer Ansatz zur schnellen Quantifizierung der Migration von Zellpopulationen entwickelt und angewendet. Die Methode basiert auf der Idee, die Migration der Zellen durch die kumulative Zunahme der von den Zellen im Lauf der Zeit gebildeten Migrationspfade zu repräsentieren.

2. Der Migrationstest wurde eingesetzt, um das actinbündelnde Protein CRMP-4 funktionell zu charakterisieren. CRMP-4 kolokalisiert in B35 Neuroblastomzellen mit F-Actin in bündelartigen Strukturen innerhalb von Lamellipodien. Die Konzentration von CRMP-4 im Cytosol dieser Zellen betrug ca. 1.7 μM und war größer als die Dissoziationskonstante der Interaktion mit F-Actin. Überexpression von CRMP-4 führte zu einer leichten, aber signifikanten Hemmung der Migration von B35 Neuroblastomzellen, während ein siRNA-vermittelter „Knockdown“ zu einer Steigerung der Zellmigration führte. Morphologisch war nach dem CRMP-4 „Knockdown“ eine ungeordnete F-Actin-Struktur in Lamellipodien auffällig. Somit ist CRMP-4 ein actinbündelndes Protein, das die Zellmigration negativ reguliert.

3. Mit Hilfe des Migrationstests wurde nach migrationshemmenden Substanzen gesucht. In einem klein angelegten Screening haben wir eine Substanz entdeckt, die eine stark hemmende Wirkung auf die Migration von B35 Neuroblastomzellen besaß (Substanz A). Substanz A besaß eine starke Wirkung auf die Organisation des Actin-Cytoskeletts und/oder die Migration von glialen und neuronalen Vorläuferzellen und C6-Gliom-Zellen. Diese Wirkung ist teilweise auf eine Hemmung der Zelladhäsion zurückzuführen. Andererseits bewirkte die Substanz A einen Kollaps des Actin-Cytoskeletts.

2 Einleitung

2.1 Molekulare Mechanismen der Zellmotilität

2.1.1 Zellmigration und Cytoskelett

Die Zellmigration spielt bei zahlreichen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Unter Migration versteht man die aktive Fortbewegung von Zellen. Viele verschiedene Vorgänge in Organismen hängen von der Migration ab: z.B. die Wanderung von Neuronen während der Entwicklung, von Keratinozyten während der Wundheilung oder von Immunzellen während der Immunantwort (Übersicht bei *Pollard et al. 2000*). An der Zellmigration sind vier verschiedene Mechanismen beteiligt: (1) Verlängerung der Lamellipodien, (2) Bildung neuer Adhäsionskontakte, (3) Kontraktion des Zellkörpers und (4) Ablösen des hinteren Zellendes (*Lauffenburger and Horwitz 1996*). Lamellipodien sind blattartige Strukturen, die ein Netzwerk an Actin-Filamenten beinhalten. Filopodien sind fingerartige Strukturen, die parallele dünne Bündel aus Actin-Filamenten aufweisen. Beide Strukturen werden am sogenannten „leading edge“ bzw. dem Leitsaum der Zelle gebildet, der in die Richtung weist, in die sich die Zelle bewegt.

Für aktive Bewegungen der Zelle als Ganzes, für Bewegungen und Transporte innerhalb der Zelle, als auch für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihrer äußeren Form, ist das Cytoskelett verantwortlich. Das Cytoskelett ist ein aus Proteinen aufgebautes Skelett oder Gerüst im Cytoplasma jeder Zelle. Es besteht aus dynamisch auf- und abbaubaren Filamenten. Das Cytoskelett setzt sich aus drei Haupttypen von Proteinfilamenten zusammen, den Actin-Filamenten, den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten.

Actin ist das häufigste intrazelluläre Protein eukaryotischer Zellen. Die globulären Actin-Monomere (G-Actin) lagern sich zu polaren Filamenten (F-Actin) zusammen, die ihrerseits wieder in unterschiedlichen Strukturen organisiert sind. Diese Filamente sind dynamisch. Sie werden an beiden Enden kontinuierlich auf- und abgebaut. Es bilden sich ein sogenanntes Plus-Ende mit höherer und ein Minus-Ende mit geringerer Polymerisierungsrate aus.

Mikrotubuli sind lange, steife Polymere aus Tubulin-Molekülen. Es sind mindestens sechs Formen von α - und β -Tubulin bekannt, die jeweils von einem eigenen Gen codiert werden.

Strukturell stellen Mikrotubuli zylinderförmige Gebilde dar, in denen die Tubulin-Heterodimere um einen zentralen Raum herum angeordnet sind. Es werden 13 gestreckte Protofilamente aus sich abwechselnd angeordneten α - und β -Tubulin-Molekülen aufgebaut. Diese Filamente lagern sich zu Mikrotubuli zusammen, so dass der ganze Mikrotubulus polar ist. Wie bei Actin liegen auch hier ein schnell wachsendes Plus- und ein langsam wachsendes Minus-Ende vor. Eine weitere Parallele zu Actin ist die Koordination mit assoziierten Proteinen; in diesem Fall sind es die sogenannten MAP, „Mikrotubuli assoziierten Proteine“, die die labilen Mikrotubuli vor dem Zerfall schützen und die Wechselwirkung mit weiteren Zellbestandteilen vermitteln. Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli ist wichtig für ihre Aufgabenerfüllung und wird durch GTP-Hydrolyse gewährleistet. Mikrotubuli erstrecken sich über das Cytoplasma und steuern die Lage der Membran-umhüllten Organellen und auch anderer Zellbestandteile (*Alberts et al. 1999*).

Der Aufbau der Intermediärfilamente stellt sich durch einen aminoterminalen Kopf, einen carboxyterminalen Schwanz und einer stabförmigen Domäne in der Mitte dar, wobei diese Mitte durch die Struktur einer α -Helix charakterisiert ist. Diese Proteine bilden Dimere, die zu Filamenten ohne Polarität zusammentreten. Intermediärfilamente sind widerstandsfähige, langlebige Proteinfasern, die bei fast allen tierischen Zellen im Cytoplasma vorliegen (*Alberts et al. 1999*). Sie stellen ein dynamisches, strukturelles Netzwerk in eukaryotischen Zellen dar. Durch ihre Anordnung verleihen sie den Zellen und Geweben mechanische Stabilität.

Für die Zellmigration ist das Actin von besonderer Bedeutung, da die Polymerisation der Mikrofilamente der Bewegung der „leading edge“ zugrunde liegt. Darüber hinaus ist aber auch die Koordination der Mikrofilamente miteinander und der drei verschiedenen Proteinsysteme des Cytoskeletts untereinander von entscheidender Bedeutung für die Zellmigration.

2.1.2 Regulation des Actin-Cytoskletts und Zellmigration

Substanzen, die Actin-Filamente stabilisieren oder destabilisieren, sind wichtige Werkzeuge zur Untersuchung dynamischer Zellprozesse. Cytochalasine sind Pilzprodukte, die durch Bindung an das Plus-Ende Polymerisation verhindern („leading edge“ zieht sich schnell zurück). Phalloidine sind Toxine (Knollenblätterpilz), die Actin-Filamente durch seitliches Anlagern gegen Depolymerisation stabilisieren. Fluoreszenz-markiertes Phalloidin wird auch

zur cytochemischen Darstellung des F-Actins verwendet. Nach Behandlung mit actinstabilisierenden oder -destabilisierenden Substanzen ist die Zellmigration völlig aufgehoben, da keine Lamellipodien mehr ausgebildet werden können (*Cooper 1987*). Im Extremfall kommt es zum Zusammenbruch des Actin-Cytoskelettes. Man spricht vom Cytoskelett-Kollaps. Substanzen, die einen solchen Kollaps auslösen können, nennen wir Kollaps-Faktoren.

Innerhalb der Zelle wird die Polymerisation und Depolymerisation der Mikrofilamente durch eine Vielzahl actinbindender Proteine kontrolliert. In Lamellipodien von Fibroblasten ist der Arp2/3-Komplex ein wichtiger Regulator der Actin-Polymerisation am Plus-Ende der Filamente. Der Arp2/3-Komplex ist ein stabiler Proteinkomplex, der aus sieben Untereinheiten besteht: zwei "Actin Related Proteins" (actinverwandte Proteine) Arp2 und Arp3 und fünf neuen Proteinen (*Machesky et al. 1994*; Übersicht bei *Mullins and Pollard 1999*). Der Arp2/3-Komplex ist der effektivste bekannte Actin-Nukleator, er ist aber im Grundzustand inaktiv (*Welch et al. 1998*). Erst eine Aktivierung des Komplexes durch Proteine der WASP/Scar-Familie kann die Bildung von neuen Actin-Filamenten signifikant erhöhen (siehe unten) (*Machesky and Gould 1999*; *Rohatgi et al. 1999*). Aktivierter Arp2/3-Komplex ist sowohl für die Neu-Nukleation als auch die Nukleation von der Seite bereits bestehender Filamente von großer Bedeutung. Letztere ist ein Prozess, der als "branching" (Verzweigen) bezeichnet wird. Dabei bindet der Arp2/3-Komplex an die Seite bestehender Filamente und führt so zu einer Verzweigung der Filamente in einem Winkel von 70°. Diese typischen Verzweigungspunkte können elektronenmikroskopisch an der „leading edge“ nachgewiesen werden. Man spricht vom "Dendritic Nucleation Model" (*Blanchoin et al. 2000*). Bindet der Arp2/3-Komplex an Filamente, so führt dies zu einer weiteren Aktivierung des Moleküls (*Higgs and Pollard 1999*; *Pantaloni et al. 2000*). *In vivo* kommt es so zur Ausbildung eines komplexen Actin-Netzwerkes, das eine sehr hohe mechanische Stabilität besitzt (*Amann and Pollard 2001*) und daher geeignet ist, eine propulsive Kraft bei der Ausbildung von Pseudopodien auszuüben. Damit in Einklang steht die Beobachtung, dass der Arp2/3-Komplex am „leading edge“ der migrierenden Zelle lokalisiert ist (*Machesky et al. 1997*).

Die Proteine der WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) -Familie sind als Aktivatoren des Arp2/3-Komplexes auch übergeordnete Regulatoren der zellulären Actin-Nukleation (*Machesky and Gould 1999*). Durch die beschriebenen Regulationsmechanismen ist es der Zelle möglich, die Actin-Nukleation schnell und zuverlässig an ihre wechselnden Bedürfnisse

anzupassen. Die Hauptaufgabe der WASP-Familie besteht darin, Signale auf das Cytoskelett zu übertragen (*Mullins 2000*). Der zuerst beschriebene Vertreter dieser Protein-Familie ist ein Multidomänen-Protein von 502 Aminosäuren. Zur schnellen und gerichteten Actin-Nukleation, und damit auch zur Ausbildung von Podosomen, Lamellipodien oder Filopodien ist eine Aktivierung der WASP-Proteine notwendig. Der Hauptmechanismus der Aktivierung verläuft bei WASP über eine Bindung der kleinen Rho-GTPase Cdc42 an die GBD-Domäne (*Miki and Takenawa 1998; Takenawa and Miki 2001*) und gleichzeitig von PIP(2) an die N-terminal davon gelegene basische Region (*Higgs and Pollard 2000*).

Weitere actinbindende Proteine heften sich an Actin-Filamente und beeinflussen so ihre Eigenschaften und Funktionen. So existieren beispielsweise Proteine, die das Plus-Ende von Mikrofilamenten „cappen“ und eine weitere Polymerisierung verhindern und Proteine, die den Abbau von F-Actin am Minus-Ende fördern („severing proteins“). Eine besondere Gruppe von Proteinen besitzt zwei oder mehr Actin-Bindungsstellen und kann deshalb Mikrofilamente quervernetzen. Quervernetzende Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften organisieren bestimmte Actin-Anordnungen. Man unterscheidet hier Bündelungsproteine, wie Fascin und α -Actinin sowie gelbildende Proteine, wie Filamin (*Revenu et al. 2004*). Bündelungsproteine koppeln die Actin-Filamente in Parallelanordnung, so dass parallele Bündel entstehen, wie sie in Filopodien (bestehen aus langen parallelen Actin-Filamenten, die eng zusammengelagerte Bündel bilden) und Stressfasern vorkommen. Solche Bündel sind besonders stabil und an der Bildung von Zell-Ausstülpungen bzw. -Invaginationen beteiligt. Daher sind sie in fokalen Adhäsionspunkten bzw. Podosomen stark angereichert. Filamin dagegen ist beispielsweise ein längeres Vernetzungsprotein und verknüpft Filamente zu einem feinen Geflecht, wie sie in Lamellipodien vorkommen. Weiterhin sind sie an Strukturen beteiligt, die die generelle Zellform, Teilung, Adhäsion, Bewegung und sogar Signaltransduktion beeinflussen (*Bartles 2000; Volkmann et al. 2001*). Vor kurzem wurde CRMP-4, Collapsin Response Mediator Protein-4 von unserer Arbeitsgruppe als actinbündelndes Protein beschrieben (siehe unten; Rosslbroich et al, eingereicht; V. Rosslbroich, Dissertation).

Die kleinen Rho-GTPasen sind zentrale Regulatoren des Cytoskeletts (*Nobes and Hall 1995*). Zu dieser Proteinfamilie mit einem Molekular Gewicht von 20 bis 40 kDa zählt neben RhoA und cdc42 auch Rac. Diese GTPasen spielen bei der Zellmigration eine wichtige Rolle. Dabei ist die Cdc42 essentiell für die Ausbildung von Actin-Strukturen wie Filopodien, mit denen z.B. Makrophagen chemoattraktive Gradienten wahrnehmen (*Allen et al. 1998; Cory et al.*

2002). Über Aktivierung der kleinen GTPase Rac werden actinhaltige Lamellipodien induziert (Ridley *et al.* 1992; Ridley and Hall 1992; Miki *et al.* 2000), während die Kontraktion des nachwandernden Zellteils durch die GTPase Rho gesteuert wird (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996). Dabei beeinflussen die GTPasen nicht nur das Actin-Cytoskelett. Auch Mikrotubuli werden von Cdc42, Rac und Rho in ihrer Stabilität beeinflusst (Palazzo *et al.* 2001; Daub *et al.* 2001; Etienne-Manneville and Hall 2001). An Fibroblasten bewirkt Rac1 die Bildung des flachen Actin-Netzwerks von Lamellipodien. Actinbündel in Filopodien entstehen aufgrund von Cdc42 und Stressfasern werden durch RhoA-Aktivität induziert. Das Lamellipodium gilt als der Entstehungsort der Actin-Filamente einer Zelle (Small *et al.* 1998). Hier wird die Actin-Polymerisation durch Rac1 induziert und die entstehenden kleinen Filamente bilden den Ausgangspunkt für den Aufbau der höheren Actin-Strukturen, d.h. der Stressfasern und feinen Actin-Geflechte. Das Zusammenspiel der drei GTPasen bedingt die unterschiedlichen Actin-Organisationsmuster innerhalb einer Zelle. Aber auch die Integrin-vermittelten Signale aus der Zellumgebung spielen eine Rolle. Die Actin-Organisation in Zellen variiert, je nachdem auf welchem Substrat sie wachsen.

2.2 Zelladhäsion, extrazelluläre Matrix und „guidance“-Moleküle

Die Zelladhäsion ist eine wichtige Voraussetzung der Zellmigration. Zelladhäsion ist ein Mechanismus, mit dessen Hilfe Zellen an angrenzende Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) und/oder an die umgebende extrazelluläre Matrix (ECM) (Zell-Matrix-Adhäsion) binden. Sie ist die Voraussetzung für die Ausbildung und Entwicklung multizellulärer Organismen. Vorgänge der Zelladhäsion sind für die Zellmorphogenese und die Entstehung von Geweben von Bedeutung. Durch Adhäsion werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die zur Umstrukturierung des Cytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden führen können. Die Zelladhäsion wird durch spezielle Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren wirken nicht nur als einfache Ankerpunkte, sondern übertragen durch die Interaktion mit anderen Molekülen Signale in das Zellinnere. Über die Zellmembran hinweg treten Zelladhäsionsmoleküle mit anderen zellulären Komponenten wie dem Cytoskelett oder mit Signal- oder Botenmolekülen in Wechselwirkung. Wichtige Zelladhäsions-Rezeptoren sind die Integrine. Die Integrine sind Transmembranrezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, die intrazelluläre Actin-Filamente über assoziierte Proteine mit extrazellulären Matrixproteinen verbinden. Sie bestehen aus zwei nicht-kovalent verbundenen

Transmembran-Glykoproteinen, nämlich der α - und β -Untereinheit. (*Friedl et al. 1998*). Die am „leading edge“ gelegenen Pseudopodien sind integrin- und cytoskelettabhängig an den Untergrund gebunden, so dass eine Polymerisation des Actinfilamentsystems zu einer Kraftübertragung über diese Verankerungspunkte auf das Substrat führt. Veränderungen des Cytoskeletts bewirken zusätzlich eine Ablösung des Zellhinterendes vom Substrat und ermöglichen damit eine Vorwärtsbewegung der Zelle. Durch zyklische Wiederholungen dieses Vorgangs gelingt es den Zellen, über Oberflächen zu migrieren. Obwohl sie hauptsächlich die Anbindung an die ECM vermitteln, können einige Integrine auch eine Zell/Zell-Bindung eingehen. Interaktion mit den Signalleitungsmolekülen Netrin und Semaphorin kontrollieren Integrin-vermittelte Zelladhäsion und Migration und konvergieren dadurch mit den Signalwegen der axonalen Lenkungsmoleküle (*Nakamoto et al. 2004*).

Die extrazelluläre Matrix befindet sich im Zellaußenraum. Sie stellt ein komplexes Protein-Netzwerk dar, das den Zusammenhalt der Zellen eines Gewebes bedingt. Sie spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Steuerung von zellulärem Wachstum, zellulärer Wanderung und Differenzierung. Die extrazelluläre Matrix ist aus drei Hauptkomponenten zusammengesetzt:

(1) Proteoglykane: Sie sind stark glykosylierte Proteine mit einem Polypeptide-Kern, der von zahlreichen Glykanen umgeben ist. Die Zuckerreste sind hauptsächlich Glykosaminoglykane (GAG's). Diese enthalten Uronsäuren und Hexosamine, häufig mit Sulfatresten. Dadurch entsteht eine stark negative Ladung und Hydrophilie.

(2) Kollagene: Kollagene sind die Hauptproteine der extrazellulären Matrix. Es sind mindestens 16 verschiedene Typen bekannt. Typ I, II und III bilden lange Fibrillen, Typ IV bildet Netzstrukturen. Kollagen verleiht durch seine Struktur vielen Geweben wie z.B. Haut, Sehnen, Knorpel etc. Stärke und Spannkraft.

(3) Multiadhäsionsmatrixproteine: Die Bindung der Zellen an die Bestandteile der extrazellulären Matrix wird durch verschiedene Proteine vermittelt. Zu diesen Proteinen gehören Fibronectin, Vitronectin und Laminin.

Die drei Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix treten in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Verteilungen auf, wodurch die Festigkeit variiert und den entsprechenden Erfordernissen angepasst werden kann. So kann die ECM z.B. Sehnen die erforderliche Festigkeit verleihen, aber auch Blutgefäßen eine gewisse Flexibilität. Die ECM hat nicht nur passive, stabilisierende Funktionen, sondern steht auch mit den Zellen über

Signaltransduktionsprozesse in Kontakt. So sind zum einen mechanische, aber auch chemische Wechselwirkungen mittels Hormonen, Wachstumsfaktoren etc., die in der ECM gespeichert werden, für viele Zellen essentiell, und bilden häufig erst die Basis zu deren vollständigen Differenzierung und Funktionsfähigkeit. Innerhalb der ECM diffundierende Glykoproteine können Gradienten bilden und den Zellen Richtungsinformationen übermitteln.

2.3 CRMP-4

Man bezeichnet die gerichtete Bewegung von Neuronen, ihren Fortsätzen und ihrer Vorläuferzellen als neuronale Navigation. Die Motilität von Nervenzellen wird über eine Vielzahl von substratgebundenen und diffusiblen Signalmolekülen gesteuert. Durch diese Moleküle werden zum Beispiel Axone mit hoher Präzision zu ihren Zielgebieten gelenkt. Hierbei sind unter anderem die Semaphorine beteiligt. Semaphorine sind Signalmoleküle, welche u.a. die Ausbildung neuronaler Schaltkreise im Rückenmark von Mäusen während der embryonalen Entwicklung steuern. Sie leiten die periphere sensorische Innervation, beeinflussen die Richtung des axonalen Wachstums durch Attraktion oder Repulsion und steuern dadurch die Ausbildung geordneter Projektionen. Bisher wurden insgesamt 18 verschiedene Semaphorine in Wirbeltieren identifiziert, die sich in 4 Klassen gliedern und sowohl sezernierte (Klasse 3) als auch membranständige Mitglieder (Klasse 4, 5 und 6) umfassen (*Puschel 1996*). Das erste heute als Semaphorin 3A bezeichnete Protein dieser wichtigen Gruppe wurde früher Collapsin genannt, da es einen Zusammenbruch von Wachstumskegeln sensorischer Neurone durch Kollaps des Actin-Cytoskeletts bewirkt (*Luo et al. 1993*). Die Collapsin Response Mediator Proteine (CRMPs) bilden eine Familie von Proteinen, die in die Signalvermittlung des Semaphorin 3A involviert sind. Diese Familie beinhaltet zunächst vier Mitglieder, die in der Nomenklatur unter den Bezeichnungen CRMP-1 bis CRMP-4 bekannt sind. Zusätzlich existiert CRAM (CRMP-3 associated Protein/CRMP-5) als weiteres verwandtes Protein (*Inatome et al. 2000*). Collapsin Response Mediator Protein 2 wurde initial als cytosolisches Protein beschrieben, das für die Vermittlung Collapsin/Semaphorin3A-abhängiger Signaltransduktionsprozesse in sensorischen Neuronen essentiell ist (zur Übersicht siehe *Quinn et al. 1999*). Außerdem wurde CRMP-2 als ein frühes Markerprotein postmitotischer Neurone des Großhirns unter dem Namen TOAD64, „Turned On After Division“, beschrieben (*Minturn et al. 1995*). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten bezeichnet man die CRMPs auch als „Unc-33-like

Phosphoproteins (Ulip)“ (*Byk et al. 1996; Byk et al. 1998*) oder „Dihydropyrimidinase-related Proteins (DRPs)“ (*Hamajima et al. 1996*), ohne dass aber bei diesen Proteinen eine entsprechende Enzymaktivität nachweisbar war. Eine weitere Heterogenität der CRMPs infolge von alternativem Splicing der ersten codierenden Exons, welche die Sequenzen der N-Termini betrifft, wurde beschrieben (*Yuasa-Kawada et al. 2003; Quinn et al. 2003*). Da die Mitglieder dieser Familie unabhängig voneinander in verschiedenen Labors entdeckt wurden, sind Homologe zu diesen Proteinen aus anderen Spezies auch unter anderen Namen in die Literatur eingegangen und es existieren sogar unterschiedliche Bezeichnungen für die gleiche Spezies (*Quinn et al. 1999*). Die geläufigste und am weitesten verbreitete Bezeichnung ist allerdings die als CRMPs. In der Tabelle 1 sind alle Bezeichnungen und Spezies aufgelistet (*modifiziert nach Quinn et al. 1999*).

Tabelle 1: Alle Bezeichnungen und Spezies von CRMPs

Bezeichnungen					Spezies
CRMP-1	CRMP-2	CRMP-3	CRMP-4	CRMP-5	Ratte, Xenopus, Human, Rind
—	CRMP-62	—	—	—	Huhn
Ulip-3	Ulip-2	Ulip-4	Ulip-1	Ulip-6	Maus, Human, Ratte
DRP-1	DRP-2	—	DRP-3	DRP-5	Human, Maus
—	TOAD-64	—	Ab-25 Antigen	CRAM	Ratte

Die CRMPs besitzen eine Reihe verschiedener Interaktionspartner im Cytosol. Beispiele hierfür sind die Hetero-Oligomerisation (*Wang and Strittmatter 1997*), Phosphorylierung durch Fes (*Mitsui et al. 2002*) und Rho-Kinase (ROCK) (*Arimura et al. 2000*), die Bindung an Phospholipase D2 (*Lee et al. 2002a*), die Modulation von RhoA und Rac1 (*Hall et al. 2001*), die Bindung an Plexin A1 (*Mitsui et al. 2002; Deo et al. 2004*) und die Bindung an Intersectin (*Quinn et al. 2003*). Weiterhin binden CRMP1-4 an Tubulin und CRMP-2 fördert den Zusammenbau von Microtubuli (*Fukata et al. 2002*). Es ist bislang aber unbekannt, auf welche Weise sie am Zustandekommen des Cytoskelett-Kollaps beteiligt sind. Die Lokalisation des CRMP-4 zeigte sich innerhalb der Zelle konzentriert in den Bereichen, wo

die Zelle Lamellipodien ausbildet. Außerdem ist CRMP-4 ein actinbündelndes Protein (V. Rosslenbroich; Dissertation).

2.4 Messung der Zellmigration

In vitro kann die Migration heute in unterschiedlichen Modellen beobachtet werden.

(1) „*Scratch Assay*“. In sogenannten „*Scratch Assay*“ oder *in vitro* Wundheilungs-Test wird eine konfluente Zellschicht durch eine Pipettenspitze aufgekratzt und dann verfolgt, wie schnell die erzeugte Lücke wieder geschlossen wird. Bei diesem Assay wird aber das natürliche Zellmigrationsverhalten durch die Verwundung verändert.

(2) „*Boyden-Invasion Chambers*“ (*Transwell-Assay*) (Boyden 1962). Hierbei müssen die Zellen, chemotaktisch gesteuert, aktiv eine sogenannte Matrigel-Schicht (Mischung diverser ECM-Proteine) verdauen, durchwandern und eine poröse Membran passieren, um in ein nährstoffreiches Milieu zu gelangen. Hemmen dabei Reagenzien essentielle Oberflächenrezeptoren, matrixdegradierende Enzyme oder die Actin-Polymerisation, so verbleiben die Zellen auf der Matrigel-Schicht und damit auf der nährstoffarmen Seite.

(3) „*Agarose Tropfen*“ (Varani et al. 1978). Die Zellen und „low-melting“ Agarose werden bei niedriger Temperatur, bei der Agarose noch flüssig bleibt und die Zellen nicht beschädigt werden, zusammengemischt und auf eine Platte gebracht. Nach erfolgter Abkühlung wird das Medium zugeführt und nach einer bestimmten Zeit werden die Abstände gemessen, welche die Zellen zurückgelegt haben, die aus dem Agarose-Tropfen ausgewandert sind.

(4) „*under-agarose migration assay*“. Die Methode wurde von Culter und Munoz (Cutler and Munoz 1974) für polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) von Meerschweinchen entwickelt und von Nelson et al. (Nelson et al. 1975) im Humanbereich etabliert. Die Zellen können sowohl zu der zu untersuchenden Substanz, als auch von ihr weg migrieren. Erhitzte Agarose wird mit dem Medium vermischt und in eine Petrischale gegeben. Nach Erkalten und Verfestigung des Agarosemediums werden sternförmig sechs Reihen mit je drei Löchern in den Agar gestanzt, wobei die Löcher einer Reihe jeweils 2,4 mm Abstand zueinander haben. In die mittlere Vertiefung kommt die Zellsuspension, in die zwei äußeren Löcher werden chemotaktische oder Kontrolllösungen pipettiert. Ausgehend von der Vertiefung diffundiert die chemotaktische Lösung und baut somit einen chemotaktischen

Gradienten im Gel auf. Auf diesen Stimulus reagierende PMN wandern unter der Agarose auf die entsprechende Vertiefung zu. Nach einer zweistündigen Inkubation werden die Zellen mit einer Glutaraldehyd-Lösung fixiert, der Agar entfernt und die Zellen nach Antrocknung am Boden der Petrischale gefärbt (*Nelson et al. 1975*). Die Wanderungsstrecke, also der Abstand zwischen den migrierten PMN und dem mittleren Loch, kann mikroskopisch gemessen werden.

(5) „*phagokinetic Tracks*“. Bei der phagokinetischen Pfadmessung („*phagokinetic Tracks*“) wird die von den migrierenden Zellen durch Phagozytose von einem gecoateten Marker befreite Fläche gemessen (*Albrecht-Buehler 1977*).

(6) „*Time-lapse Video Mikroskopie*“ ist eine weitere Methode, um Zellmigration zu beobachten. Die Zellen werden mit einem bestimmten Zeitabstand fotografiert und nachher ausgewertet. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Vorbereitungen weniger aufwendig sind als bei anderen Methoden, und dass die Zellen unter normalen Zellkultur-Bedingung vermessen werden.

Insgesamt lässt sich durch Zeitraffer-Aufnahmen die Zellmigration am unmittelbarsten verfolgen. Ein Problem dieser zuletzt genannten Methode ist aber die quantitative Auswertung, die meistens mit Hilfe komplizierter sogenannter „Cell-Tracking-Programme“ vorgenommen werden muss.

2.5 Problemstellung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten folgende Probleme bearbeitet werden:

1. Es sollte ein quantitativer Zellmigrationstest auf der Grundlage der Zeitraffer-Videomikroskopie erarbeitet werden, der schnell durchführbar und unkompliziert auswertbar sein sollte.
2. Mit Hilfe dieses Tests sollte der Einfluss des actinbündelnden Proteins CRMP-4 auf das Actin-Cytoskelett und die Migration von B35 Neuroblastomzellen charakterisiert werden.
3. Der Migrationstest sollte außerdem dazu dienen, nach Inhibitoren der Zellmigration zu suchen, da solche Substanzen ein potentielles pharmakologisches Interesse zur Hemmung der Tumorinvasion besitzen.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien, Medien, Organismen und Zellen

3.1.1 Geräte

3.1.1.1 Mikroskope

3.1.1.1.1 Fluoreszenz-Mikroskope

Zeiss Axiovert 100M Epifluoreszenz Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland), ausgestattet mit einem Neofluar 40x1.3 Immersionsöl Objektiv und einer digitalen CCD Kamera (Axiocam, Zeiss). Die Aufnahmen wurden mit der Axiovision 4.3 (Zeiss) bearbeitet.

Zeiss Axiovert 200 Epifluoreszenz Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) ausgestattet mit einer digitalen CCD Kamera (Axiocam, Zeiss), einem motorisierten X-Y Tisch (Scan IM 120x100; Märzhäuser GmbH, Deutschland), einem automatischen Shutter und einer Inkubationskammer (Incubator XL-3, Pelon GmbH, Deutschland). Die Bilder wurden mit einem Achroplan 10x Objektiv (A-Plan 10x/0,25 Ph1, Zeiss) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit Axionvision 4.3 (Zeiss) beobachtet und mit NIH Image J Version 1.32 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) analysiert.

3.1.1.1.2 Lichtmikroskope invers

Zeiss Telaval 31

Zeiss Axiovert 25

3.1.1.2 Inkubatoren

Wassermantel Inkubator	Forma Scientific	3121
Bakterien Brutschrank	Function Line Heraeus	
Schüttel-Inkubatoren	Innova 4000 New Brunswick Scientific	
	Controlled Environment Incubator Shake	
	New Brunswick Scientific	

3.1.1.3 Geräte für Elektrophorese und Westernblot

Stromversorgung	Bio Rad Power Pac 200
Elektrophoresekammern	Bio Rad Mini Protean Cell
Semi Dry Westernblot Apparatur	Bio Rad Transblot SD Cell
DNA-Elektrophoresekammer	Amersham Pharmacia Biotech
UV-Transilluminator	INTAS
Odyssey Imaging System	LI-COR
Filmentwicklungsmaschine	CURIX 60 AGFA
Scanner	Powerlook III UMAX

3.1.1.4 Zentrifugen

Beckman Coulter	Optima TLX Ultrazentrifuge
Beckman Coulter	L7-65 Ultrazentrifuge
Eppendorf	Tischzentrifuge 5415 D
Heraeus	Labofuge 400 E

3.1.2 Verwendete Zelllinien

B35	Neuroblastom Zelllinie, Ratte
C6	Gliomazellen, Ratte
HEK293	Humane, embryonale Nierenzellen
N3EFL	Gliale Vorläuferzellen, Maus
N3FL	Neuronale Vorläuferzellen, Maus

3.1.3 Verwendete Bakterienstämme

E. coli BL21; Genotyp: F⁻ ompT, hsd SB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)

E. coli DH5α; Genotyp: F⁻/endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi 1recA1 gyrA (Nal^r)relA1Δ
(lacZYA-argF)_{U169} (m80lacZΔ M15)

3.1.4 Verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Luria-Bertani (LB) Medium zur Anzucht von Bakterien

Zutaten für 1 Liter Medium:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g Natriumchlorid

Die Bestandteile gut mischen, den pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und dann steril autoklavieren.

Tris gepufferte Salzlösung (TBS)

Zutaten für 1 Liter Puffer in 10-facher Konzentration (10x).

61 g Tris basisch

90 g Natriumchlorid

ad 1.000 ml H₂O

Den pH der Lösung mit konz. HCl auf 7,6 einstellen.

(Endkonzentration: 150 mM NaCl, 50mM Tris, pH 7,6)

Tris gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween 20 (TBS/T)

Zutaten für 1 Liter Puffer in 10-facher Konzentration (10x).

61 g Tris basisch

90 g Natriumchlorid

5 ml Tween 20

ad 1.000 ml H₂O

Medium für die Zellkultur

DMEM/F12 500 ml Gibco

FCS 50 ml PAN

Glutamin 1%

Penicillin/Streptomycin 1%

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Zutaten für 1 Liter Puffer in 10-facher Konzentration (10x) (Modifiziert nach Maniatis).

80 g Natriumchlorid

2 g Kaliumchlorid

14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat

2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat

Den pH der Lösung mit konz. HCl auf 7,4 einstellen.

Blocklösung für die Zellkultur

1x PBS mit 3% BSA

Permeabilisierungslösung für die Zellkultur

1x PBS mit 0,2% Triton X-100

Inkubationslösung für Antikörper in der Immunocytochemie

1x PBS mit 3% BSA und 0,05% Tween

10x Laufpuffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

250 mM	Tris	Biorad, Elektrophoresis Grade
1920 mM	Glycin	Biorad, Elektrophoresis Grade
1% (w/v)	SDS	Biorad, Elektrophoresis Grade

2x Probenpuffer (reduzierend)

2% (w/v)	SDS	Biorad, Elektrophoresis Grade
20% (v/v)	Glycerin	Biorad, Elektrophoresis Grade
250 mM	Tris/HCl (pH 6,8)	Biorad, Elektrophoresis Grade
(20 mM	DTT)	

Polyacrylamid (PAA)

40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth
-----------------------------------	------

Trenngelpuffer

1,5 M	Tris/HCl (pH 8,8)	Biorad, Elektrophoresis Grade
0,4% (w/v)	SDS	Biorad, Elektrophoresis Grade

Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris/HCl (pH 6,8)	Biorad, Elektrophoresis Grade
0,4% (w/v)	SDS	Biorad, Elektrophoresis Grade

Amoniumperoxodisulfat (APS)

10% (w/v)	rekristallisiertes Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O	Biorad, Elektrophoresis Grade
-----------	---	-------------------------------

Zusammensetzung eines 10%igen PAA Trenngels

Acrylamid-Lösung (ml)	7,5	Roth
Trenngelpuffer (ml)	15,3	Biorad, Elektrophoresis Grade
APS (μl)	100	Biorad, Elektrophoresis Grade
TEMED (μl)	15	Serva
H ₂ O (ml)	ad 30 ml	

Zusammensetzung eines Sammelgels (4% PAA)

Acrylamid-Lösung (ml)	1	Roth
Sammelgelpuffer (ml)	2,6	Biorad, Elektrophoresis Grade
APS (μl)	100	Biorad, Elektrophoresis Grade
TEMED (μl)	10	Serva
H ₂ O (ml)	6,29	

Puffer für Westernblot nach dem Semi-Dry Verfahren

48 mM	Tris	Biorad, Elektrophoresis Grade
39 mM	Glycin	Biorad, Elektrophoresis Grade
0,037% (w/v)	SDS	Biorad, Elektrophoresis Grade
20% (v/v)	Methanol	

Blocklösung für Westernblot

4% (w/v) Magermilchpulver in TBS/Tween (0,05%) (pH 7,0)

Kolloidale Coomassie-Lösung zur Färbung von PAA Gelen

1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 SERVA

40% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

50% (v/v) H₂O

Entfärbelösung für Coomassie

50% (v/v) Methanol

10% (v/v) Essigsäure

40% (v/v) H₂O

Fixierlösung für die Silberfärbung von PAA Gelen

10% (v/v) Eisessig

30% (v/v) Ethanol

70% (v/v) H₂O

Lösung A für die Silberfärbung

0,5 M Natriumacetat 3 H₂O

90 ml Ethanol

6 ml Glutaraldehyd

0,6 g Natriumthiosulfat

300 ml H₂O

Lösung B für die Silberfärbung

0,3 g	Silbernitrat
162 µl	Formaldehyd (37%)
300 ml	H ₂ O

Lösung C für Silberfärbung

7,5 g	Natriumcarbonat
90 µl	Formaldehyd (37%)
300 ml	H ₂ O

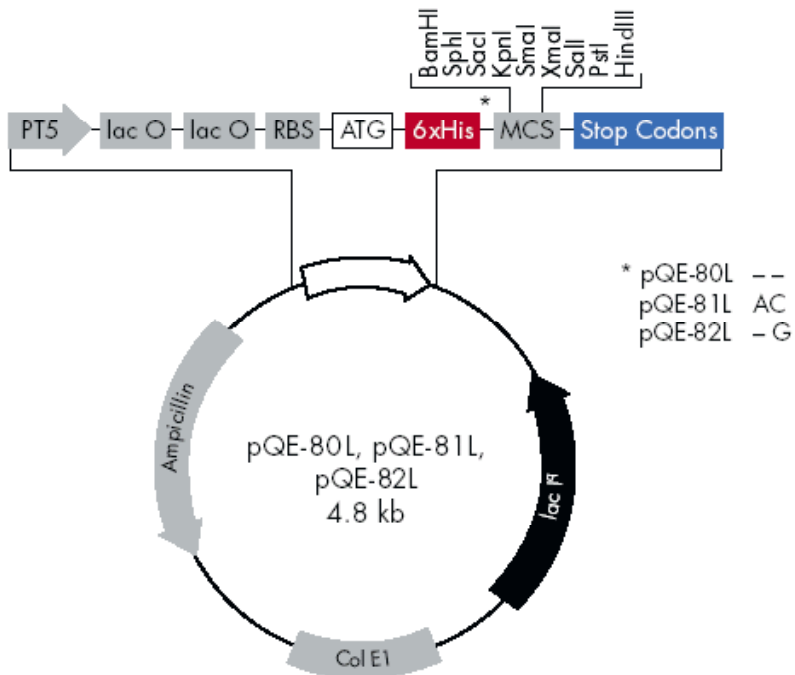
Lösung D für die Silberfärbung

5 g	Glycin
1,25 g	Na ₂ -EDTA
300 ml	H ₂ O

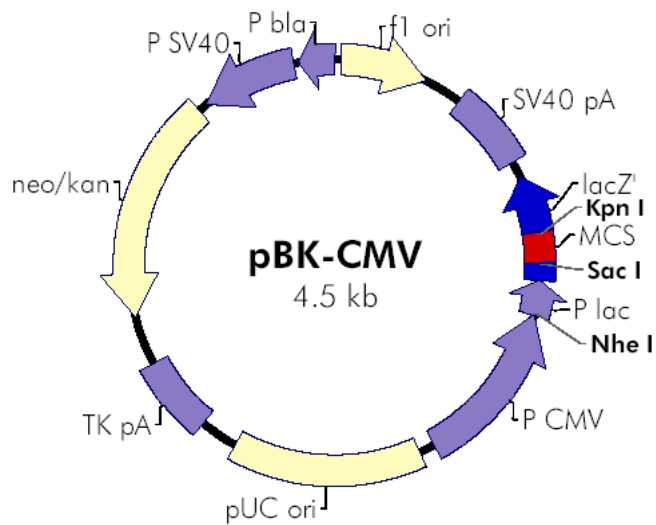
3.1.5 Verwendete Vektoren

Vektorbezeichnung	Verwendung	Hersteller
pQE80	bakterieller Expressionsvektor mit N-terminalem 6xHis-Tag	Qiagen
pBK-CMV	eukaryotischer Expressionsvektor	Stratagen
pEGFP-C1	Reportervektor mit dem Fusionsproteine hergestellt werden können	Clontech

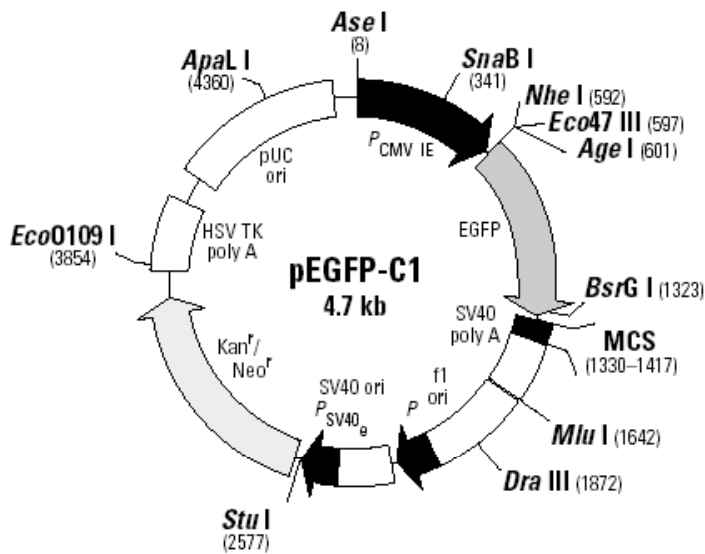
Vektorkarte von pQE-80



Vektorkarte von pBK-CMV



Vektorkarte von pEGFP-C1



3.1.6 Membranen und Filme

Nitrozellulose

Bioscience, Protran BA85

Filme

FujiFilm, Super RX

3.2 Zellbiologische Methoden

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt, wenn nicht anders angegeben. Im Allgemeinen erfolgte die Kultivierung der Zellen mit folgendem Medium:

DMEM/F12 + 10% FCS + 1 x Penicillin/Streptomycin

3.2.1 Reinigung von Deckgläsern mit HNO_3

Die Deckgläser (rund, 12 mm Durchmesser, Marienfeld GmbH, Deutschland) wurden in eine saubere Glasschale gegeben und 4x mit Millipore Wasser gewaschen. Dann wurden die Gläschen für 36 Std. in eine Glasflasche mit konzentrierter HNO_3 gegeben und inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Gläschen 2x 1 Std. und 2x eine halbe Std. in Millipore Wasser gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde das Wasser immer wieder erneuert. Die Gläschen wurden nach der letzten Wäsche in einem Trockenschrank getrocknet und dann über Nacht bei 180°C trocken sterilisiert.

3.2.2 Trypsinieren von Zellen

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05% (w/v) Trypsin

0,02% (w/v) EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung

Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen ca. 5 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C bis zur Abrundung der Zellen (ca. 2 Minuten) inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und die Zellzahl pro Milliliter mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in der gewünschten Dichte ausgesät oder zur weiteren Verarbeitung durch Zentrifugation pelletiert (1.000 rpm, 5 Minuten, Labofuge).

3.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium: 10% (v/v) DMSO im jeweiligen Zellkulturmedium

Die Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und in der Labofuge pelletiert (5 Minuten, 1.000 rpm). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium aufgenommen und in beschriftete, vorgekühlte Kryoröhrchen überführt.

Die Zellen wurden zunächst bei -80°C in einer Styropor-Schachtel eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem Stickstoff wurde es etwa 1 Minute bei RT erwärmt und anschließend bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde vorsichtig entnommen, in 5 ml kaltes Medium überführt und in der Labofuge 5 Minuten bei 1.000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.2.5 Transfektion von B35/HEK293 Zellen mit EXGEN500

Dieser Ansatz gilt für 100µl Gesamtansatz und reicht für vier 24er-Wells.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen/Well ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37°C/5% CO₂) inkubiert. Für jede Transfektion wurden 2µg an DNA transfiziert. Das Volumen für diese 2µg an DNA wurde mit 150 mM steriler NaCl-Lösung auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und es wurde gut gemischt. Jeweils 6,6 µl EXGEN500 (Fermentas) wurden zu 43,4 µl 150 mM steriler NaCl-Lösung gegeben und es wurde gut gemischt. Die EXGEN-Lösung wurde dann zur DNA-Lösung pipettiert (nicht umgekehrt), es wurde gut gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die 24-Well-Platte für die Transfektion vorbereitet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, um restliches FCS zu entfernen. Dann wurde in jedes Well 250µl serumfreies Medium gegeben, je 25µl des Transfektionsansatzes wurden in ein Well pipettiert (1/10 des Gesamtvolumens) und es wurde kurz gemischt. Die Platte wurde dann für 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Transfektion mit einem Milliliter Vollmedium (10% FCS) abgestoppt, und die Platte kam wieder in den Brutschrank.

3.2.6 Inhibierung der Genexpression durch siRNA-Oligonukleotide

Unter „RNA interference“ versteht man den Prozess einer sequenzspezifischen, postranskriptionellen Inhibierung der Genexpression, welche durch sogenannte doppelsträngige siRNAs (short interfering RNA) induziert wird, die zu einer Sequenz des auszuschalteten Gens homolog sind. Diese siRNAs führen zu einer mRNA-Degradation und somit einer spezifischen Unterdrückung der Genexpression. Im Idealfall führt dies zur starken Reduktion des entsprechenden Proteins in der Zelle. Man bezeichnet dies als „Knock down“.

Folgende siRNAs der Firma Ambion wurden verwendet:

Negative Kontrolle (Ambion) (Katalog Nr: 084R35A)

Silencer pre-designed siRNA (Ambion)

siRNA ID:	48738	48833
Kat. Nr:	16704	16704
Zielgen	CRMP-4	CRMP-4
Organism	Ratte	Ratte
„sense“ siRNA	GGGAGAAUCGUCAACGAUGtt	GGAUGGCUUGAUAAAGCAAtt
“antisense” siRNA	CAUCGUUGACGAUUCUCCtc	UUGC UUUAUCAAGCCAUCtc
Exon:	NM_012934: Exon 2	NM_012934: Exon 2.3

Die lyophilisierten siRNAs wurden durch Lösen in 1 ml RNase-freiem H₂O auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt. Der folgende Ansatz gilt für 400 µl Gesamtansatz und reicht für einen 24er-Well.

Die Transfektion von siRNAs in B35 Neuroblastomzellen erfolgte mit Transpass R1 (NEB) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion in 24-Well-Platten ausgesät, wobei die Zellzahl bezüglich der Transfektionseffizienz für die verwendeten Zellen zuvor optimiert worden war (am Tag der Transfektion 40-50% Konfluenz). In einem sterilen Eppendorfgefäß wurden 3 µl TransPass R1 siRNA Transfektion

Reagenz zu 50 μ l serumfreiem Medium (DMEM/F12) hinzugefügt, gevortext und 10-20 Minuten bei RT inkubiert. 4 μ l siRNA wurde hinzugefügt, gemischt und 10-20 Minuten bei RT inkubiert. Es wurde dann mit normalem Medium (10% FCS, DMEM/F12) auf 400 μ l aufgefüllt. Das Medium über den Zellen wurde vorsichtig abgenommen und der siRNA-Mix zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 5% CO₂. Am nächsten Tag wurde frisches Medium (10% FCS) zugegeben. Der Einfluss der Behandlung auf die Expression von CRMP-4 wurde nach 2-3 Tagen mittels Westernblot und Immuncytochemie untersucht.

3.2.7 Zellmigrationstest

3.2.7.1 Bildaufnahme

Es erfolgte eine mehrdimensionale Bildaufnahme mit dem Axiovert 200M Mikroskop. 2 Stunden vor Versuchsbeginn wird der Inkubator geheizt, das Mikroskop eingeschaltet und die CO₂-Flasche geöffnet. Die 24-Well Kulturschale wird auf dem Kreuztisch plaziert. Die Bildaufnahme erfolgt mit dem Axiovision Programm (Release 4.3). Für Bildsequenzen wird zur Kompression das „JPEG Standard“ Format gewählt. Die Mikroskop-Einstellungen im Registerkarten-Menü werden überprüft und gegebenenfalls geändert, ebenso die Kamera-Einstellungen. Die Positionen werden mit Hilfe des Live-Bildes angefahren, fokussiert und abgespeichert. Wenn das „Mark And Find“-Modul aktiviert ist, werden die jeweiligen Positionen (xyz) durch Anklicken eines Farbfeldes in die Liste übernommen. Die Positionen werden nochmals aufgerufen und gegebenenfalls korrigiert. Dann wird die Bildaufnahme gestartet. Bei allen Positionen einer Platte wird dieselbe Belichtungszeit gewählt. Der Zeitabstand zwischen den Bildern war immer 15 Minuten.

3.2.7.2 Auswertung

Die weitere Verarbeitung der Bildstapel erfolgte über Image J mit Hilfe des Befehls “File>Import>Image Sequence”. Die einzelnen Bilder (img) wurden durch Festsetzung eines konstanten Schwellenwertes in binäre Bilder umgewandelt (b-img; Befehl:

“Image>Adjust>Threshold”). Anschließend erschienen die fluoreszierenden Zellen als schwarze Flächen auf weißem Grund. Für jedes Bild wurde die Fläche schwarzer Pixel ermittelt mit dem Befehl: “Analyse>Histogram” und als „Black pixel area“ (BPA) gespeichert. Die BPA des Bildes i wurde bezeichnet als: $BPA[b\text{-img}(i)]$. Alle Bilder eines Stapels wurden in gleicher Weise ausgewertet, die Pixel-Anzahlen in einem MS Excel Spreadsheet gespeichert und über die Zeit geplottet, um die totale Zellfläche als Funktion der Zeit darzustellen.

Um die Flächen zu ermitteln, die durch die Zellpfade bedeckt wurden, wurden die Binärbilder als Z-Projektion überlagert mit dem Befehl: “z-projection; minimum intensity”. Die Anzahl schwarzer Pixel wurde wiederum bestimmt wie oben beschrieben. Die Projektion der Bilder $\text{img } 1$ bis i wird abgekürzt als $\text{Prj}(1\dots i)$. Dieses Vorgehen wurde wiederholt ausgeführt, was zu $\text{Prj}(1\dots i)$ für $1 \leq i \leq n$, führte (n war die Anzahl der Bilder in dem Stapel). Die BPAs der Projektionen wurden in einem MS Excel Spreadsheet abgespeichert. Der Plot von $BPA[\text{Prj}(1\dots i)]$ über $t = i \cdot \Delta t$ repräsentiert die kumulative Zellpfad-Fläche als Funktion der Zeit. Nach Normierung durch Division mit der initialen BPA ergab sich das „relative displacement“ nach der Formel: $RD[t=(i-1) \cdot \Delta t] = \{BPA[\text{Prj}(1\dots i)] - BPA[b\text{-img}1]\} / BPA[b\text{-img}1]$. Mathematische Kurvenanalysen wurden mit Hilfe von Origin 6.1 (OriginLab) vorgenommen. Als Modellfunktionen dienten $(y = a \cdot t)$ und $[y = a \cdot t + \sqrt{b \cdot t}]$.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 QIAquick Gel Extraktion

Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) können DNA-Fragmente, die kleiner als 10 kb sind, sehr schnell und einfach eluiert werden. Die Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarose-Gele verwendet. Die den Gelen zugrundeliegende Agarose-Konzentration richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente:

Agarose-Konzentration [% (w/v)]	Trennbereich (kb)
0,6	20
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

3.3.3.1 Photometrische Analyse

Die Photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm gegen TE oder H₂O in einer Quarzküvette.

Eine OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von:

50 µg/ml doppelsträngiger DNA

40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA

31 µg/ml Oligonukleotide

3.3.3.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenzmessung im Agarose-Gel

Für kleine DNA-Mengen empfiehlt sich diese Methode zur Konzentrationsbestimmung. Dabei werden auf einem 1 %igen Agarosegel (0,5 µg Ethidiumbromid pro ml) 1 µl der DNA-Probe und 400 ng Hind III gespaltene λ-DNA aufgetrennt. Die Fluoreszenzintensitäten der Probe und des Standards (die 2,3 kb Bande entspricht 20 ng) wurden auf einem UV-Transilluminator verglichen, um die ungefähre DNA-Konzentration der Probe zu bestimmen.

3.3.4 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-Phagen-DNA in einer Stunde vollständig an den vorhandenen Schnittstellen zu spalten.

Reaktionsansatz für die Spaltung

Von Plasmid-DNA:	x µg	DNA
	2 µl	10 x Puffer (nach Herstellerangabe)
	1 U	Restriktionsendonuklease
	ad	20 µl H ₂ O

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.3.5 Ligation

Reaktionsansatz:	1 µl	Vektor-DNA (20 ng)
	4 µl	5 x Puffer (0,25 M Tris pH 7.6, 50 mM DTT, 50 mM MgCl ₂ , 5 mM ATP)
	x µl	DNA-Fragment (20-100 ng)

1 μ l	T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)
ad15 μ l	H ₂ O

Die „Sticky-end“-Ligationen erfolgten über Nacht bei 16°C, „Blunt-end“-Ligationen erfolgten über Nacht bei RT.

3.3.6 Isolierung von DNA

3.3.6.1 Mini-Präparation von Plasmid DNA (Qiagen-Methode)

(Qiagen-Handbook)

Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers Qiagen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt.

5 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin wurden mit einer transformierten *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert. 4 ml der Bakteriensuspension wurden durch Zentrifugation bei 12.000 g für 5 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250 μ l eiskaltem P1 resuspendiert, mit 250 μ l P2 versetzt, gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 350 μ l N3 erfolgte eine 15 min Inkubation auf Eis und eine anschließende Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 g bei 4°C. Der Überstand wurde auf eine Minisäule gegeben und 1 Minute bei 12.000 g zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen, 750 μ l PE-Puffer auf die Säule gegeben und diese wieder für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchbruch wurde erneut verworfen und die Säule für 1 Minute zum Entfernen der Ethanol-Reste abzentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte mit 50 μ l H₂O bidest.

3.3.6.2 Midi-Präparation von Plasmid DNA (Qiagen-Methode)

(Qiagen-Handbook)

Plasmidpräparationen wurden nach Vorschrift des Herstellers Qiagen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Hierbei ist eine Überladung der Säule unbedingt zu vermeiden (kritischer Parameter).

P1:	50 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
P2:	0,2 M	NaOH
	1%	SDS
P3:	3 M	Kaliumacetat (pH 5.5)
QBT-Puffer:	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS (pH 7.0)
	15%	Ethanol
	0,15%	Triton X-100
QC-Puffer:	1 M	NaCl
	50 mM	MOPS (pH 7.0)
	15 %	Ethanol
QF-Puffer:	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris/HCl (pH 8.5)
	15 %	Ethanol

Es wurden 25 ml einer Bakterienkultur mit einer $OD_{600} > 1$ bei 8.500 g im JA 10-Rotor (8.000 rpm) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml P1-Puffer resuspendiert, in ein JA-20 Röhrchen überführt, mit 4 ml P2 versetzt, vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe und sofortiges Invertieren von 4 ml kaltem P3 wurde neutralisiert und anschließend 10-15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 30.000 g (18.000 rpm) im JA 20-Rotor zentrifugiert (4°C), der Überstand filtriert und auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Plasmid Prep. Tip 100-Säule aufgetragen. Die Plasmid-DNA bindet an das Silikatgel-Anionenaustauscher-Säulenmaterial.

Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen, die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert und in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde dann mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT gefällt und bei 4°C und 4.400 g für 45 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen H_2O aufgenommen.

3.3.6.3 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

3.3.6.3.1 Herstellung von kompetenten Bakterien für die klassische Transformation

(RbCl-Methode nach Hanahan 1985)

TfB1:	100 mM	RbCl
	50 mM	$\text{MnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	30 mM	KAc
	10 mM	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	15% (v/v)	Glycerol

Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit 0,2 M Essigsäure auf 5.8 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

TfB2:	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	15% (v/v)	Glycerol

Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit NaOH auf 7.0 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

Von einem gepickten Bakterienklon wurde in 5 ml LB-Medium eine über Nacht-Vorkultur angelegt. 200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml über Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Bei OD₅₅₀ = 0,6 wurde die Lösung für 30 Minuten auf Eis gestellt und in vorgekühlte GS 3-Röhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 5.000 rpm für 10 Minuten. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 60 ml kaltem TfB1 resuspendiert. Anschließend wurde die Mischung 30 Minuten auf Eis stehengelassen. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 8 ml kaltem TfB2 aufgenommen und in 150 µl Aliquots auf Eis abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.3.6.4 Klassische Transformation kompetenter *E. coli*

Ein Aliquot kompetente *E. coli* (150 µl) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 ng Vektor-DNA bzw. einem Ligationsansatz vorsichtig gemischt und weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 90 Sekunden auf 37°C erwärmt. Nach Zugabe von 1 ml vorgewärmtem LB-Medium wurde die Mischung für eine Stunde bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 10-500 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Ampicillin-Platte (Ampicillin-Endkonzentration: 100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit den am nächsten Tag gewachsenen Kolonien wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Diese Vorkulturen wurden für Plasmid-Präparationen verwendet.

3.3.7 DNA-Amplifizierung über Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(nach Saiki et al. 1986; Saiki et al. 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, um definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Die PCR basiert auf den drei Schritten, die für jede DNA-Synthese notwendig sind:

1. Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
2. Anlagerung = Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge
3. Verlängerung = Synthese der DNA, ausgehend von den gebundenen Primern.

Reaktionsansatz: 1 ng DNA
 5 µl 10 x PCR-Puffer
 (100 mM Tris/Cl, pH 8,8, 500 mM KCl, 0,8 % Nonidet P40,
 Fermentas)
 4 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas)
 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP,
 Fermentas)
 2 µl Primer A (20 pmol/µl)
 2 µl Primer B (20 pmol/µl)
 1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Fermentas)
 ad 50µl H₂O

PCR-Cycler: Biometra T3 Thermocycler

Reaktionsbeispiel:

- 1) 95°C 3 min
- 2) 95°C 1 min Denaturierung

- | | | |
|---------|-------|---------------------|
| 3) 55°C | 30 s | Primer-Anlagerung |
| 4) 72°C | 4 min | Primer-Verlängerung |
| 5) 72°C | 5 min | |
| 6) 4°C | Pause | |

Die Schritte Denaturierung, Primer-Anlagerung und Primer-Verlängerung wurden in der Regel 25 mal durchgeführt. Für jede spezifische Anwendung können die Zeiten und die Temperaturen modifiziert werden, um optimale Ausbeuten zu gewährleisten.

3.3.8 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde mit dem DNA-Sequenzierungsgerät ABI PRISM 310 Genetic Analyser der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Es wurde der „ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ angewandt. Dazu wurde ein „Terminator Premix“ eingesetzt, der unter anderem vier fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) und die DNA-abhängige DNA-Polymerase AmpliTaq beinhaltet.

Die zu untersuchende DNA wurde mit dem Terminator Premix sowie einem geeigneten Oligonukleotid-Primer versetzt. Die Lösung wurde dann einer asymmetrischen PCR unterzogen. Da die Fluoreszenzfarbstoffe nukleotidspezifisch sind, konnte die Reaktion in einem einzigen Gefäß stattfinden. Die asymmetrische PCR („Cycle Sequencing“) fand im Thermocycler „GeneAmp PCR System 2400“ der Firma Applied Biosystems statt. Die anschließende Auftrennung mittels Kapillar-Gelelektrophorese sowie die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgten ebenfalls automatisch.

Sequenzierungsreaktion:	0,7 µg	doppelsträngige DNA
	5 pmol	Oligonukleotid-Primer
	8 µl	Terminator Premix
	ad 20 µl	H ₂ O

Sequenzierungs-Zyklus:	10 Sek.	96°C (Denaturierung der DNA)
	5 Sek.	50°C Primeranlagerung
	4 Min.	60°C Synthese

Der Zyklus wurde 25 mal wiederholt und der Reaktionsansatz anschließend mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 4.8) versetzt und die DNA durch Zusatz von 2 Volumen Ethanol für 10 Minuten bei RT gefällt. Die Zentrifugation erfolgte bei RT und 14.000 rpm für weitere 10 Minuten. Schließlich wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wiedergewonnen. Die DNA wurde vollständig getrocknet und in 25 µl Auftragspuffer für die Kapillar-Gelelektrophorese („Template Suppression Reagent“) aufgenommen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen

Die CRMPs wurden in löslicher Form als N-terminale 6xHis-tagged Proteine in dem Bakterienstamm *E.coli* BL 21 exprimiert. Die Expression in den Bakterien wurde durch den Zusatz von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen wurden für 4 Stunden bei 20°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (4.000 g, 20 min) und die Pellets wurden in frischem Resuspensionspuffer (PBS pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,5 mg/ml Lysozym, 1,7 U/ml DNase, 300 mM NaCl, und 10 mM Imidazol) und in einem Verhältnis von 10 ml Puffer pro Gramm Pellet aufgenommen und eine Stunde auf Eis mit wiederholtem Vortexen und drei Zyklen von wiederholtem Auftauen und Einfrieren der Bakterien inkubiert. Das daraus entstehende Lysat der Bakterien wurde für 30 Minuten bei 47.000 g und 4°C zentrifugiert, um die entstandenen Zelltrümmer von den gelösten Proteinen zu trennen.

3.4.2 Reinigung der rekombinanten Proteine

HiTrap Chelating Säulen (1 ml; beladen mit NiSO₄, Amersham Pharmacia Biotech) wurden äquibriert mit PBS + 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0. Die Säulen wurden beladen mit 8 ml Bakterienlysate, dann gewaschen mit Äquibrierungspuffer und eluiert mit einem Stufengradienten von PBS-Puffer + 300 mM NaCl, 50 mM EDTA und 500 mM Imidazol pH 8,0. Die eluierten Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten wurden gegen einen 10 mM Tris Puffer pH 7,4 dialysiert oder weiterführend noch über eine Gelfiltration mit einer Superdex 200 Säule (Amersham Pharmacia Biotech) über einen Äkta-Purifier mit PBS als Laufpuffer aufgereinigt.

3.4.3 SDS-PAGE und Westernblot

3.4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophoresen der Proteine wurden in 10% SDS Polyacrylamid Gelen in Mini Protean Zellen (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt.

Das frisch gemischte Trenngel wurde zunächst entgast, anschließend zwischen Glasplatten gegossen und sofort mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach 1 Stunde Polymerisation bei RT wurde das n-Butanol abgegossen, die Trenngeloberfläche mit Wasser gespült, das Sammelgel eingegossen und der Probenkamm eingefügt. Nach 30 Minuten Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Probenaschen mit 1x Laufpuffer gespült und dann noch vorhandene Gelreste aus den Taschen entfernt. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer gemischt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und 2 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde in die Taschen aufgetragen und mit 1x Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte über 3-4 Stunden bei 50 mA und 4°C.

3.4.3.2 Westernblot nach dem Semi Dry Verfahren

Pro zu blottendem Gel wurden 6 Stück Whatman-Papier und ein Stück Nitrozellulose Membran (BioScience) auf die Größe des zu blottenden Gels zugeschnitten. Die Nitrozellulose Membran wurde in bidest. Wasser angefeuchtet und die Whatman Stücke in Blotpuffer getränkt. Dann erfolgte der Aufbau der einzelnen Schichten für den Blot. Auf die untere Platte der Apparatur (die Anode) wurden drei Lagen des in Blotpuffer getränkten Whatman-Papiers gelegt. Darauf legte man dann die Nitrozellulose Membran und darauf dann das zu blottende Gel. Dieses wurde dann wieder mit drei Lagen von getränktem Whatman-Papier bedeckt und die obere Platte der Apparatur (die Kathode) wurde aufgelegt. Die Blotzelle wurde dann an die Stromversorgungseinheit angeschlossen und es kann mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratzentimeter Gelfläche geblottet werden. Die Zeit für den Blot beträgt 90 Minuten.

Nach dem Blot mußten auf der Membran noch die unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper geblockt werden. Dazu wurde die geblottete Membran zwei Stunden lang bei RT in Blocklösung inkubiert.

Nach der Blockierung folgte die Inkubation der Membran mit entsprechenden Antikörpern. Die Primärantikörper wurden in Blocklösung verdünnt, und die Membran wurde zwei Stunden bei RT in dieser Lösung inkubiert. Danach wurde 4 x für jeweils 5 Minuten mit einer TBS/Tween Lösung gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde dann ebenfalls in Blocklösung verdünnt und dann für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde wieder 4 x für 5 Minuten mit TBS/Tween gewaschen.

Das Signal des Westernblots wurde über das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) (Pierce) wiedergegeben. Dazu wurden die beiden Komponenten der Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die beblottete Membran gegeben und dort wurde für 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach kann ein Negativ-Film mit der Membran belichtet und maschinell entwickelt werden, oder die Membran wurde mit „Odyssey Imaging System“ gescannt.

3.4.3.3 Färbungen von Polyacrylamid Gelen

3.4.3.3.1 Coomassie Färbung

Die Polyacrylamid Gele wurden 1-2 Stunden in der Färbelösung bei RT und unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Gele für mehrere Stunden in der Entfärbelösung entfärbt.

3.4.3.3.2 Silberfärbung

Die Gele wurden zunächst für eine Stunde in der Fixierlösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie in Lösung A gegeben, dort unter Schütteln für 30 Minuten inkubiert und danach 4 x für 20 Minuten mit bidest. Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Gele für 30 Minuten in Lösung B gelegt und danach 3-4 mal kurz mit bidest. Wasser gewaschen. Danach gab man die Gele in Lösung C und beobachtet den Färbevorgang. Hatte die Färbung die gewünschte Intensität erreicht, wurde Lösung C abgesaugt und der Färbevorgang mit Lösung D gestoppt. Danach wurden die Gele noch einmal gewaschen und konnten getrocknet und fotografiert werden.

3.4.4 Proteinbestimmungen

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Biorad Protein Assays mit BSA als Standard bestimmt. Die Bestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden 5 Verdünnungen von BSA-Standard von einer Konzentration von 0,05 mg/ml bis hin zu 0,5 mg/ml zur Erstellung einer Kalibrierkurve verwendet. Alle Werte wurden als 3fache Werte bestimmt.

10 µl des Standards sowie auch der Proben werden in ein Well gegeben und dann mit 200 µl des Reaktionsmixes gemischt. Das Gemisch wird dann 5 Minuten bei RT inkubiert und dann in einem Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines Migrationstests

Zunächst wurde ein automatisiertes Verfahren zur Quantifikation der Zellmigration in Zeitrafferaufnahmen auf der Basis eines sehr einfachen Rechenverfahrens entwickelt. Der Test beruht auf der Idee, den Zuwachs der im Laufe der Zeit von den Zellen überdeckten Fläche, der infolge von Änderungen der Zellposition eintritt, zu messen (Abb. 1). Dazu werden die Bilder einer Zeitrafferserie zu einem Bildstapel zusammengefaßt und übereinander projiziert. Man spricht von einer Z-Projektion. Ein Zuwachs der in Z-Projektionen von den Zellen überdeckten Fläche im Vergleich zur Ausgangsfläche kann entweder dadurch zustande kommen, dass die Zellen ihre Position und/oder Form ändern (Abb. 1, Mitte) oder dadurch, dass die von den Zellen überdeckte Gesamtfläche durch Zellteilung oder -wachstum zunimmt (Abb. 1, rechts). Bei ruhenden Zellen, deren Form und Position konstant sind, kann ein solcher Flächenzuwachs nicht auftreten (Abb. 1, links). Wenn eine auf Zellteilung oder -wachstum zurückzuführende Zunahme der totalen Zellfläche über die Zeit vernachlässigbar ist, sollte sich der migrationsbedingte Flächenzuwachs ermitteln lassen (Abb. 1, Mitte). Da diese Auswertung auch an Populationen mehrerer Zellen erfolgen kann, ist zu erwarten, dass auf diese Weise ein statistisch robustes Migrationsmaß ermittelt werden kann.

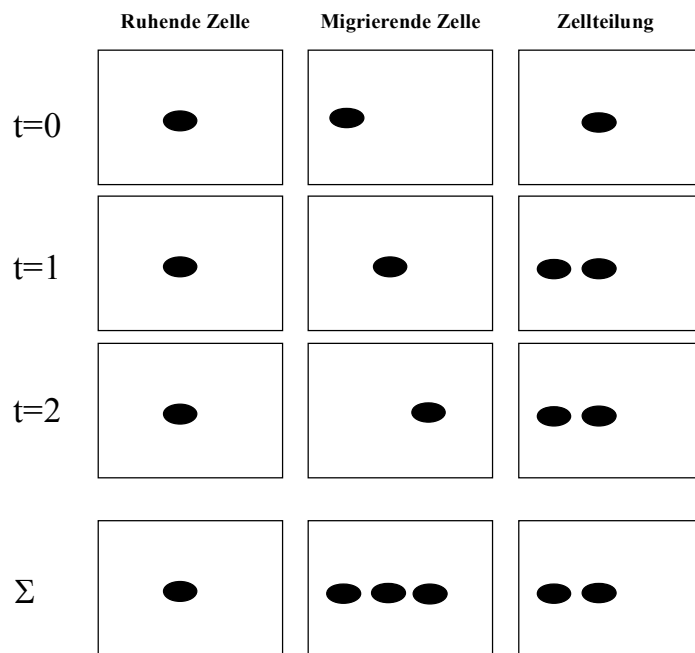


Abbildung 1: Prinzip des Migrationstests.

Die beschriebene Grundidee des Migrationstests wurde durch Experimente mit B35 Neuroblastomzellen überprüft. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Tumorzelllinie aus dem Gehirn der Ratte, die durch eine lebhaft spontane Motilität gekennzeichnet ist (*Schubert et al. 1974*). Um gut abgrenzbare Einzelzellen darzustellen, wurde in diesen Zellen transient GFP exprimiert. 24 Stunden nach der Transfektion mit dem GFP Expressionsplasmid waren die Zellen zu etwa 40% konfluent und rund 10-20% der Zellen zeigten eine Fluoreszenz nach Anregung mit 470 nm (Abb. 2A, 2B). In Übersichtsvergrößerung wurden Zeitrafferaufnahmen der fluoreszierenden Zellen in Gegenwart von 10% Fetalem Kälberserum (FCS) angefertigt. In Vorversuchen wurden die optimalen Aufnahmebedingungen ermittelt. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn jeweils in einem Abstand von 15 Minuten für insgesamt 6 Stunden Bilder aufgenommen wurden (je Position 25 Bilder). Unter Verwendung von Multiwell-Zellkulturschalen mit 24 Kavitäten werden in einer Sitzung parallel 72 Positionen beobachtet. Üblicherweise wurde jede Kulturbedingung doppelt angesetzt und es konnten je Kavität drei Zeitraffersequenzen gewonnen werden. Hierbei wurden die Belichtungszeiten für alle Bedingungen konstant gehalten. Um die von den fluoreszierenden Zellen überdeckte Fläche zu bestimmen, wurden die Rohbilder einer Schwellenwert-Prozedur unterworfen. Dabei wurde für alle Bilder des Experiments jeweils derselbe Schwellenwert verwendet (Abb. 2C). Abbildung 3 zeigt eine repräsentative Zeitrafferserie nach Umwandlung der Rohbilder in Binärbilder. Die Summe

der schwarzen Pixel dieser Binärbildes wurde als Maß für die von den fluoreszierenden Zellen bedeckte Fläche verwendet und wird von uns als totale Zellfläche bezeichnet. Die totale Zellfläche der B35 Neuroblastomzellen als Funktion der Zeit war ungefähr konstant oder nahm nur leicht um etwa das 1,4fache zu (Abb. 2F). Damit ist die Voraussetzung dafür gegeben, den Flächenzuwachs in Z-Projektionen der nach der Schwellenwert-Prozedur erhaltenen binären Bildsequenzen als Zunahme der Fläche der Migrationspfade der Zellen zu interpretieren. Die zeitabhängige Zunahme dieser Fläche wurde durch iterative Anwendung dieses Verfahrens bestimmt (Abb. 2E). Diese Plots nahmen ungefähr linear mit der Zeit zu (Abb. 2E), und im Beobachtungszeitraum von 6 Stunden nahm diese Fläche um etwa das 8fache zu (Abb. 2E). Da die beobachtete große Flächenzunahme nicht die Folge von Spreading, Wachstum oder Proliferation der Zellen war, stellte diese die kollektive Migration der fluoreszierenden Zellen im Beobachtungsfeld dar (eine detaillierte Beschreibung der Datengewinnung und -analyse ist unter Material und Methoden angegeben).

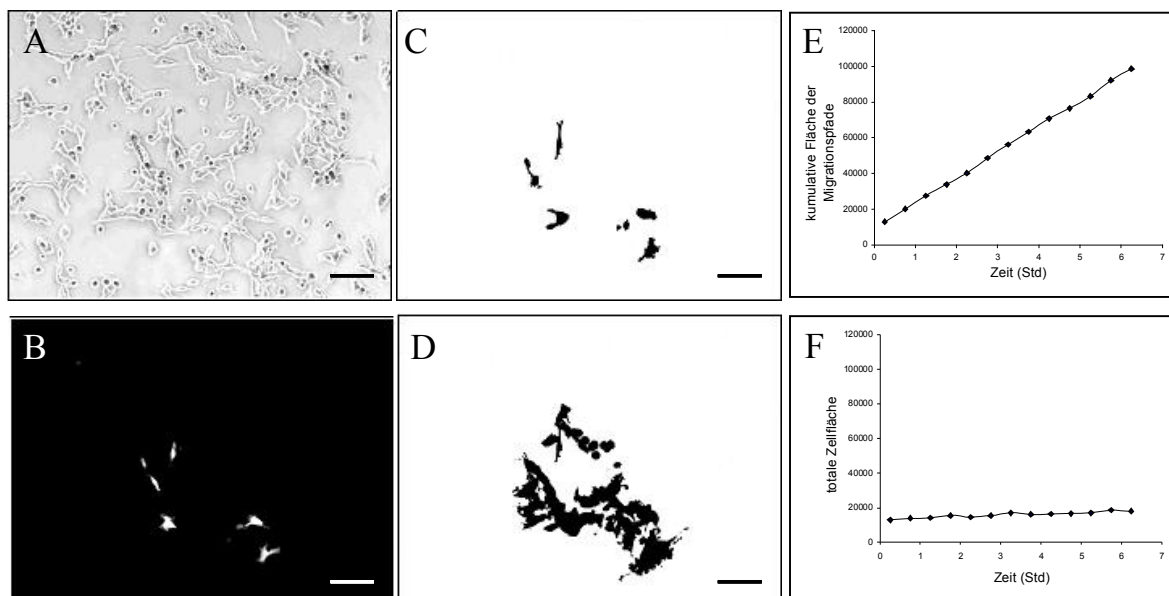


Abbildung 2: Migration von transient GFP exprimierenden B35 Neuroblastomzellen in Gegenwart von 10% FCS.

- A. Phasenkontrast-Bild der Kulturen
- B. Fluoreszenzbild desselben Areals
- C. Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
- D. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
- E. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
- F. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche

Maßstab: 100 µm

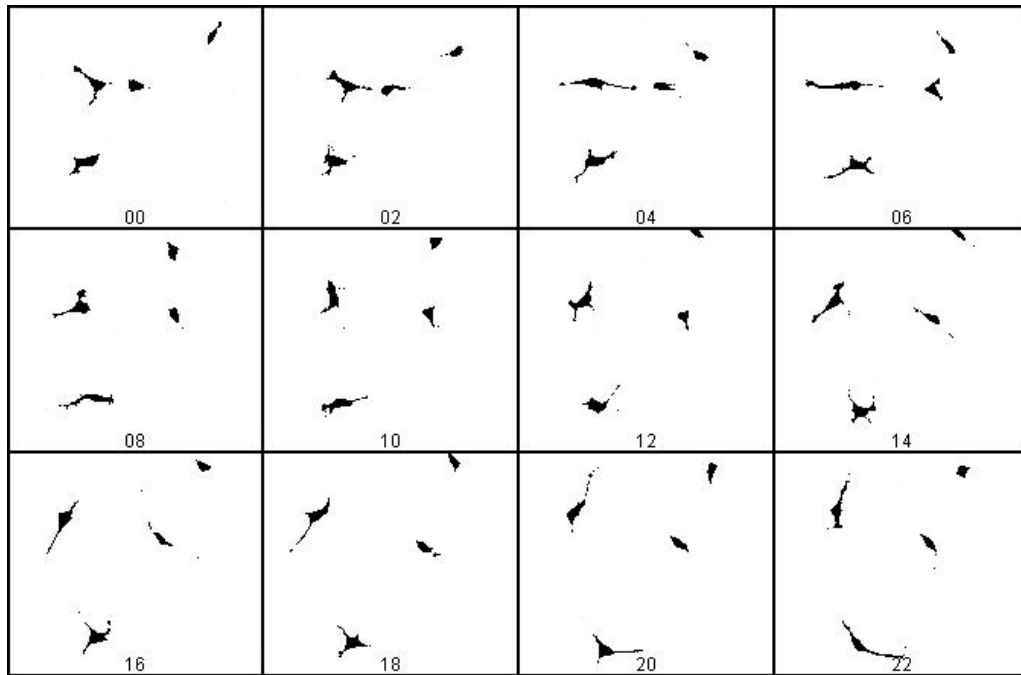


Abbildung 3: Migration von transient GFP exprimierenden B35 Neuroblastomzellen: Montage von binären Zeitrafferbildern im Zeitabstand von jeweils 30 Minuten.

Als nächstes haben wir untersucht, in welchem Maße die Zunahme der Fläche der Migrationspfade gehemmt wurde, wenn die Actin-Polymerisierung als molekulare Basis der Zellmigration inhibiert wurde. Deshalb führten wir Kontrollexperimente durch, in denen die Polymerisation von Actinfasern mit Cytochalasin B in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ gehemmt wurde (Abb. 4). Unter dieser Behandlung wurde die Motilität der B35 Neuroblastomzellen wie erwartet drastisch reduziert. Andererseits nahm auch unter dieser Behandlung die Fläche schwarzer Pixel mit der Zeit kontinuierlich leicht zu (um etwa das 1,6fache in 6 Stunden, Abb. 4F). Deshalb konnte ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit Cytochalasin B im Beobachtungszeitraum zum Tod der Zellen führte. Wiederum beobachteten wir eine zeitabhängige Zunahme der Fläche der Migrationspfade (Abb. 4E). Im Beobachtungszeitraum von 6 Stunden nahm diese Fläche um etwa das 3fache zu (Abb. 4E). Aus diesem Ergebnis schlossen wir, dass der von uns etablierte zellbiologische Test zur Messung der Zellmigration geeignet ist.

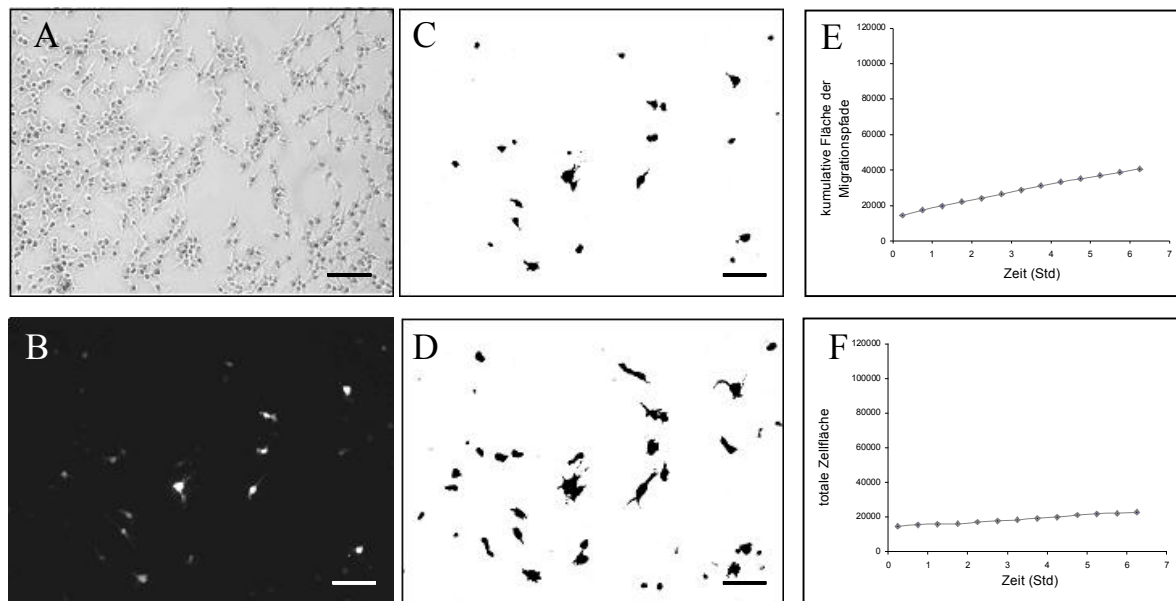


Abbildung 4: Migration von transient GFP exprimierenden B35 Neuroblastomzellen nach Behandlung mit 10 µg/ml Cytochalasin B.

- A. Phasenkontrast-Bild der Kulturen
 - B. Fluoreszenzbild desselben Areals
 - C. Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - D. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - E. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - F. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 µm

Da die Zunahme der Fläche der Zellpfade in Abhängigkeit von der Zeit näherungsweise linear erfolgte, haben wir einen Index für die Steilheit dieser Funktion konstruiert. Diesen Index nennen wir den relativen Migrations-Index, engl. relative displacement index (RDI). Dazu wurde die Flächenzunahme der Migrationspfade bezüglich der totalen Zellfläche im ersten Bild der Bildserie normiert und dann durch die Zeitdauer des Beobachtungsintervalls ΔT dividiert nach der Formel $RDI = \{BPA[Prj(1...25)] - BPA[b-img1]\} / BPA[b-img1] / \Delta T$. Ein Wert des RDI von 1 bedeutet dementsprechend, dass eine Zelle im Zeitraum ΔT im Durchschnitt ein zu ihrer anfänglichen Größe gleich großes Areal überdeckt.

Mit Hilfe des RDI wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen Cytochalasin B auf die Zellmigration verglichen (Abb. 5). Hierbei wurde der RDI mit einer klaren Dosis-Wirkungskurve gehemmt (Abb. 5). Eine maximale Hemmung der Zellmigration beobachteten

wir oberhalb von 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Die halbmaximale Hemmung der Migration wurde bei einer Cytochalasin-B-Konzentration von ungefähr 0.4 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet.

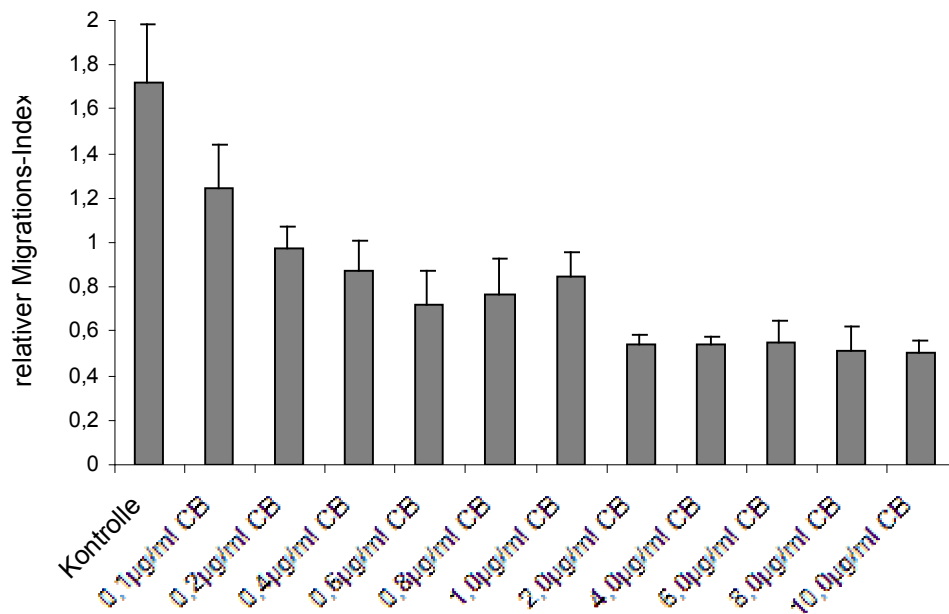


Abbildung 5: Dosis-Wirkungskurve der Hemmung der Migration von B35 Neuroblastomzellen durch Cytochalasin B.

Die Säulen repräsentieren Mittelwerte des relativen Migrations-Index (RDI). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=6).

Die Zellmigration ist von der Polarisierung der Zellen unter Ausbildung von sogenannten „leading and trailing edges“ abhängig (Lauffenburger and Horwitz 1996). Diese Polarisierung beinhaltet auch eine spezifische Verteilung von Mikrodomänen der Plasmamembran, die man auch als „lipid rafts“ bezeichnet (Manes et al. 1999). Da diese Mikrodomänen Cholesterin enthalten und da bekannt ist, dass die Extraktion von Cholesterin aus den Zellen die Struktur und Funktion dieser Mikrodomänen stört, haben wir untersucht, welche Veränderungen der Zellmigration mit Hilfe unseres Testes nach Extraktion zellulären Cholesterins mit Methyl- β -Cyclodextrin meßbar waren (Harder et al. 1998; Kilsdonk et al. 1995). Im Bildstapel einer repräsentativen Zeitraffer-Serie nach der Einstellung des Schwellenwertes (Abb. 6D) hatten die Migrationspfade deutlich kleinere Flächen im Vergleich zu den Migrationspfaden

unbehandelter Zellen (Abb. 2D). Außerdem wiesen diese Pfade oft keine Vorzugsrichtung auf. Die Fläche der Migrationspfade nahm im Beobachtungszeitraum etwa um das 4fache zu (Abb. 6E), während die totale Zellfläche mit der Zeit ungefähr konstant blieb (Abb. 6F). Daher war eine toxische Wirkung von Methyl- β -Cyclodextrin nicht nachweisbar. Interessanterweise zeigte die zeitabhängige Zunahme der Fläche der Migrationspfade eine leicht konvexe Krümmung (Abb. 6E).

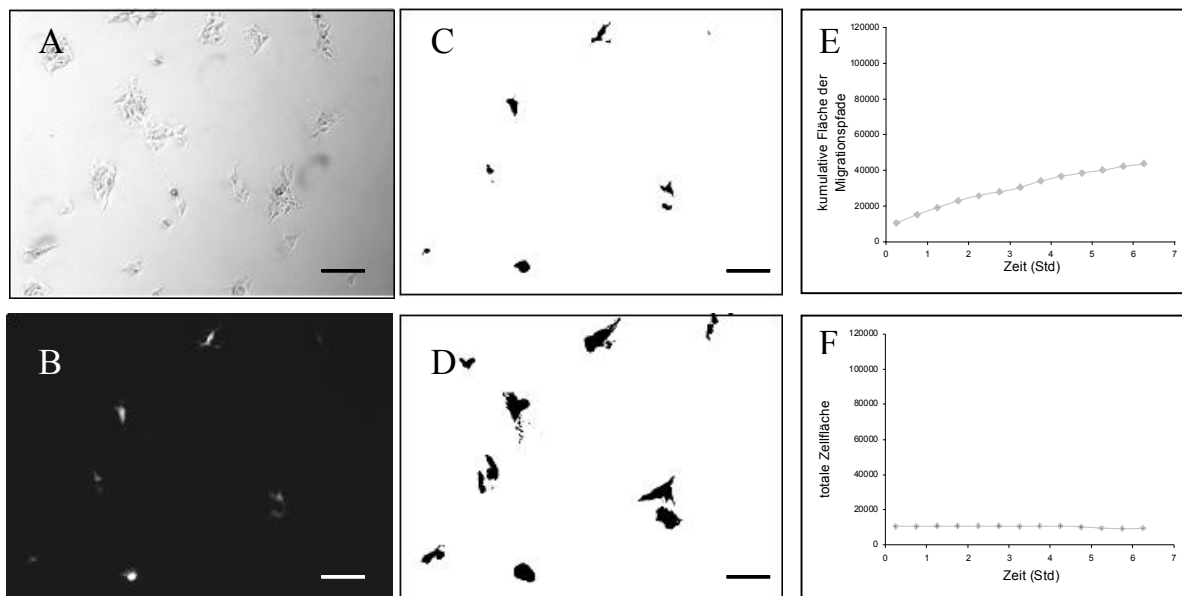


Abbildung 6: Migration von transient GFP exprimierenden B35 Neuroblastomzellen nach Extraktion des Cholesterols mit 2 mM Methyl- β -Cyclodextrin.

- A. Phasenkontrast-Bild der Kulturen
 - B. Fluoreszenzbild desselben Areal
 - C. Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - D. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - E. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - F. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 μ m

Um den Verlauf der zeitabhängigen Zunahme der Flächen der Migrationspfade unter den verschiedenen Bedingungen vergleichen zu können, wurden diese Funktionen normiert, indem die initiale totale Zellfläche subtrahiert und anschließend durch diese Fläche dividiert

wurde (Abb. 7A). Wir bezeichnen den normalisierten Plot als relative zeitabhängige Fläche des Migrationspfads. Die Analyse von 8 unabhängigen Zeitraffer-Serien für jede Bedingung zeigte wieder eine starke Hemmung der Zellmigration in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin und eine dazwischenliegende Hemmung nach Extraktion des Cholesterols mit 2 mM Methyl- β -Cyclodextrin (Abb. 7A, B).

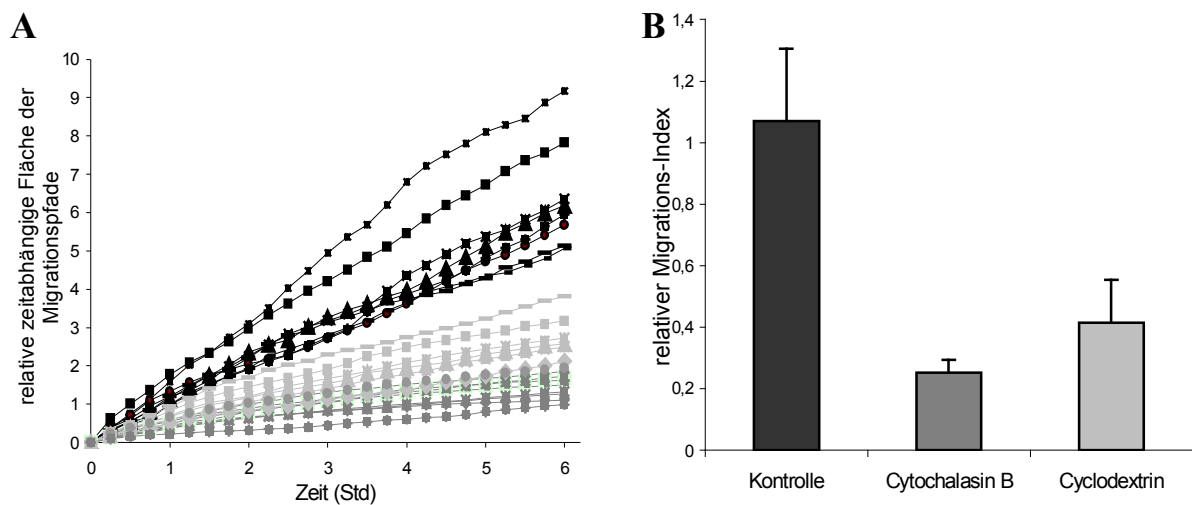


Abbildung 7: Vergleich der Migration von B35 Neuroblastomzell-Populationen nach Normierung.

- Normalisierte Kurven der Zunahme der Flächen der Migrationspfade von B35 Neuroblastomzellen: Vergleich von unbehandelten Zellen (schwarze Symbole), von mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen (2 mM) (hellgraue Symbole) und von mit Cytochalasin B behandelten Zellen (10 $\mu\text{g/ml}$) (dunkelgraue Symbole).
- Vergleich der RDI. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von 8 Analysen und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung für unbehandelte Zellen (schwarz), mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelte Zellen (hellgrau) und mit Cytochalasin B behandelte Zellen (dunkelgrau).

Beim Vergleich dieser Kurven war auffällig, dass häufig eine konvexe Krümmung vorlag (Abb. 4E, 6E). Dies sprach dafür, dass die Zunahme der Migrationspfadflächen in solchen Fällen nicht auf eine lineare Abhängigkeit reduziert werden konnte. Um die zugrundeliegenden mathematischen Abhängigkeiten zu eruieren, wurde eine mathematische Kurvenanpassung der experimentellen Daten durchgeführt unter Verwendung von zwei verschiedenen Modellen. Im Fall der unbehandelten Zellen erbrachte die Anpassung einer linearen Funktion $y = a \cdot t$ befriedigende Ergebnisse. Nach Auswertung von 8 unabhängigen

Datensätzen betrug das Quadrat des Chi-Wertes im Durchschnitt $\chi^2 = 0,04377$ und das Quadrat des Korrelationskoeffizienten war im Durchschnitt $R^2 = 0,98950$. Nach der Behandlung mit Cytochalasin B bzw. mit Methyl- β -Cyclodextrin betrug $\chi^2 = 0,02526$ für die mit Cytochalasin B behandelten Zellen und $\chi^2 = 0,02562$ für die mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen. Hierbei wurden wiederum die Mittelwerte von 8 unabhängigen Analysen angegeben. Die Korrelationskoeffizienten betragen $R^2 = 0,87496$ für die mit Cytochalasin B behandelten Zellen und $R^2 = 0,93002$ für die mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen (jeweils $n = 8$). Aus diesen Werten war zu entnehmen, dass vor allem bei den mit Cytochalasin B bzw. mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen eine lineare Funktion die experimentellen Daten nicht vollständig beschrieb. Ausgehend von der Vermutung, dass die Krümmung der gemessenen Plots dadurch bedingt war, dass die migrierenden Zellen in zufälliger Weise ihre Migrationsrichtung änderten, und es dadurch zu einer Selbstüberlappung der Migrationspfade kommen würde, ergänzten wir die Modellfunktion um einen Wurzelterm: $y = a*t + \text{sqrt}(b*t)$. Für den Extremfall einer rein zufälligen Migration, d.h. einer verschwindenden Rate der linearen Migration ($a = 0$) ergibt sich aus dieser Funktion die wohlbekannte Formel für das mittlere Verschiebungsquadrat der Brownschen Bewegung, die in unserem Fall lautet: $RD^2(t) = b*t$. Hierbei bezeichnet b die Rate der zufälligen Migration. Daher kann die Funktion $y = a*t + \text{sqrt}(b*t)$ als gewichtete Summe einer linearen und einer zufälligen Komponente verstanden werden. Eine Anpassung der Daten mit dieser Funktion (Abb. 8A) lieferte zum Teil deutlich kleinere χ^2 Werte. So erhielten wir für die unbehandelten Zellen $\chi^2 = 0,01561$, für die mit Cytochalasin B behandelten Zellen $\chi^2 = 0,00222$ und für die mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen $\chi^2 = 0,00144$ (jeweils Mittelwerte, $n = 8$ für alle Bedingungen). Damit ergab sich besonders in den letzten beiden Fällen eine deutlich verbesserte Kurvenanpassung. Für unbehandelte Zellen war die durchschnittliche Rate der linearen Migration etwa 5fache größer als die Rate der zufälligen Migration (Abb. 8B, C). Andererseits zeigten die mit Cytochalasin B oder Methyl- β -Cyclodextrin behandelten Zellen höhere Raten der zufälligen Migration im Vergleich zu den jeweiligen Raten der linearen Migration (Abb. 8B, C).

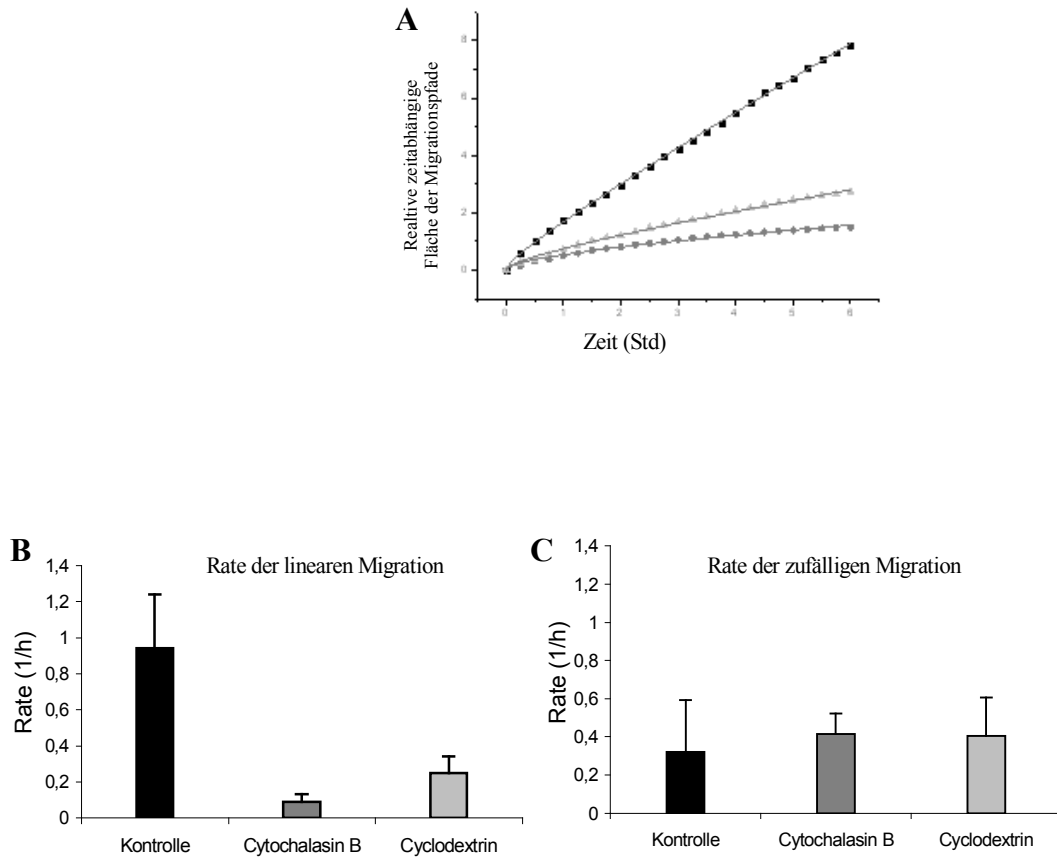


Abbildung 8: Kurvenanpassung der zeitabhängigen relativen Migrations-Plots.

- Kurvenanpassung mit der Funktion $y = a \cdot t + \sqrt{b \cdot t}$. Gezeigt werden ausgewählte Funktionen für unbehandelte Zellen (schwarze Symbole), mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelte Zellen (hellgraue Symbole) und mit Cytochalasin B behandelte Zellen (dunkelgraue Symbole).
- Vergleich der Raten der linearen Migration. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von 8 Analysen und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung für unbehandelte Zellen (schwarz), mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelte Zellen (hellgrau) und mit Cytochalasin B behandelte Zellen (dunkelgrau).
- Vergleich der Raten der zufälligen Migration. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von 8 Analysen und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung für unbehandelte Zellen (schwarz), mit Methyl- β -Cyclodextrin behandelte Zellen (hellgrau) und mit Cytochalasin B behandelte Zellen (dunkelgrau).

4.2 Zellmigration nach Überexpression von CRMP-4 und nach „Knockdown“ von CRMP-4

Nachdem der von uns entwickelte Zellmigrationstest gut geeignet war, die Wirkung von Substanzen mit definierter Wirkung auf das Actin-Cytoskelett bzw. auf die Membranzusammensetzung auf die Zellmigration zu messen, haben wir uns gefragt, ob unser Test auch in der Lage ist, Effekte einer veränderten Genexpression auf die Motilität von Zellen zu messen. In initialen Experimenten hatten wir festgestellt, dass die stabile genetische Modifikation von Zellen durch Transfektion und Selektion einzelner Klone hierbei problematisch war. Wir haben wiederholt beobachtet, dass verschiedene Klone derselben parentalen Zelllinie, die mit demselben cDNA Expressionskonstrukt transfiziert worden waren, sich in ihrem Migrationsverhalten zum Teil drastisch unterschieden (L. Dai, unveröffentlichte Beobachtungen sowie V. Roßlenbroich, persönliche Mitteilung). Diese Unterschiede sind wahrscheinlich die Folge von somatischen Mutationen, die während des Selektionsvorgangs fixiert werden. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, haben wir uns deshalb dafür entschieden, alle Experimente auf der Grundlage einer transienten Expression durchzuführen. Hierzu stellen die B35 Neuroblastomzellen ein gut geeignetes System dar, wie wir im vorangegangenen Abschnitt am Beispiel der Überexpression von GFP gezeigt haben. In Vorstudien (V. Roßlenbroich, Dissertation) wurde gezeigt, dass bei transienter Expression von zwei verschiedenen Expressionsplasmiden im Verhältnis 9:1, von denen das erste für DsRed und das zweite für GFP codierte, nur 23% der GFP-exprimierenden Zellen keine DsRed-Fluoreszenz zeigten. Deshalb ist anzunehmen, dass bei Kotransfektion eines beliebigen Expressionsplasmids mit pEGFP im genannten Verhältnis rund 80% der Zellen, die GFP-Fluoreszenz zeigen, auch die zweite kotransfizierte cDNA exprimieren.

4.2.1 Überexpression von CRMP-4

Da CRMP-4 ein actinbündelndes Protein ist, haben wir mit Hilfe des Migrationstests untersucht, ob dieses Protein einen funktionellen Einfluss auf die Dynamik des Actin-Cytoskeletts in lebenden Zellen besitzt. Als Kontrolle erfolgte zunächst die Kotransfektion von pBKCMV ohne Insert mit pEGFP-C1 (Abb. 9). Hierbei haben wir wiederum eine lebhafte spontane Migration der B35 Neuroblastomzellen beobachtet. Bei dem in der

Abbildung gezeigten typischen Experiment nahm im Beobachtungszeitraum von 6 Stunden die Fläche der Migrationspfade um das 7,4fache zu (Abb. 9C). Der Zeitverlauf der totalen Zellfläche gab keinen Anhalt für eine toxische Wirkung der Kotransfektion (Abb. 9D).

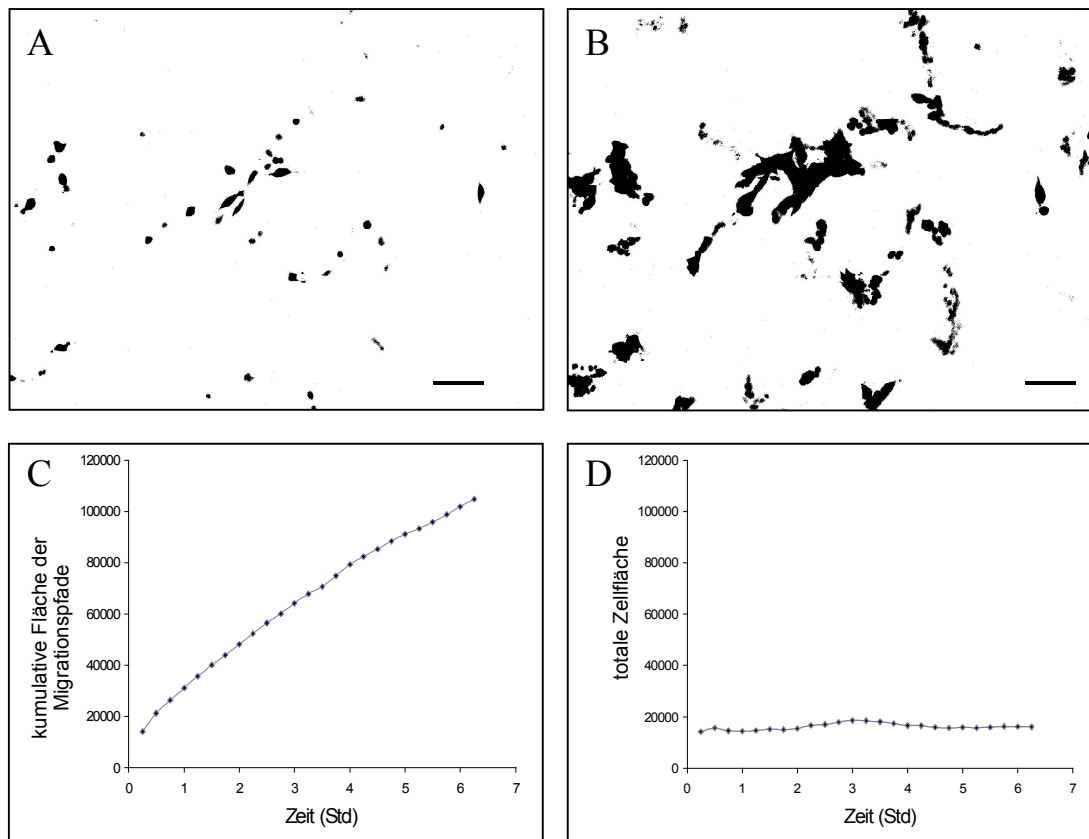


Abbildung 9: Die Zellmigration nach der transienten Kotransfektion von B35 Neuroblastomzellen mit pBK-CMV und pEGFP-C1.

- A. Initiales Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - B. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - C. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - D. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 µm

Als nächstes untersuchten wir den Effekt einer Überexpression von CRMP-4 auf die Zellmigration. Dazu wurde zunächst die Expression des endogenen CRMP-4 in B35 Neuroblastomzellen durch Immunocytochemie (Abb. 10) und Westernblot-Analyse (Abb. 11)

untersucht. In der Immunocytochemie sahen wir eine Lokalisation des endogenen CRMP-4 im Cytosol der B35 Neuroblastomzellen. Dabei bestand eine partielle Kolokalisation mit F-Actin vor allem in bündelartigen Strukturen, die innerhalb von Lamellipodien lokalisiert waren (Abb. 10A, B, C). In den ebenfalls Actin-Bündel enthaltenden Filopodien war die Kolokalisation hingegen geringer ausgeprägt. Nach Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B kam es zu einer Umverteilung des F-Actin Musters im Sinn eines Verlusts bündelartiger Strukturen und der Bildung von einer Vielzahl punktförmiger Anhäufungen. Eine Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin konnte nach Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B nicht mehr beobachtet werden (Abb. 10D, E, F).

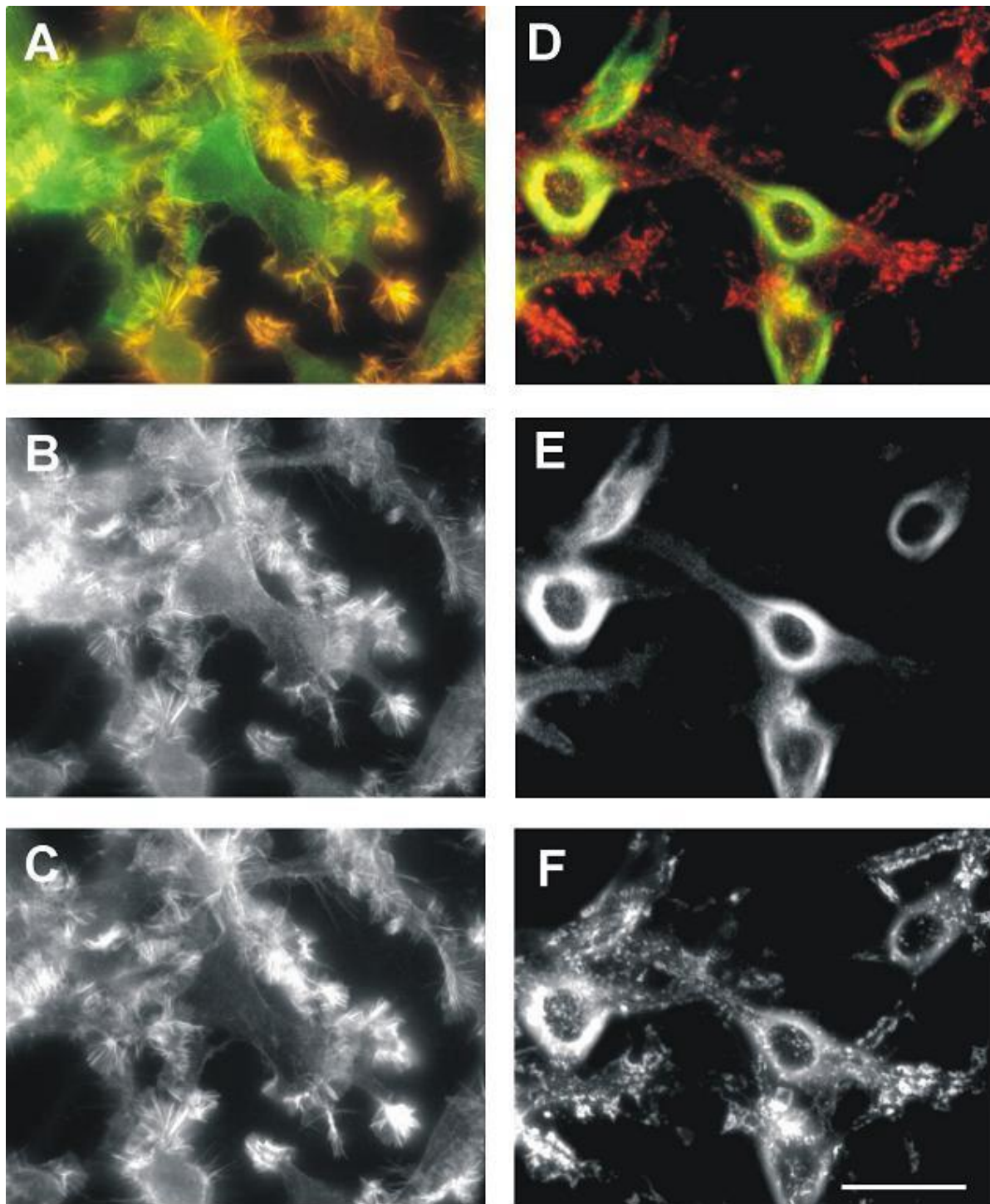


Abbildung 10: Immunocytochemischer Nachweis der Expression von CRMP-4 in B35 Neuroblastomzellen und Wirkung von Cytochalasin B auf seine Verteilung.

A und D: Überlagerung der Signale für CRMP-4 (grün) und F-Actin (rot).

B und E: Färbung von CRMP-4; C und F: Färbung des F-Actin.

A, B, C: unbehandelte Zellen; D, E, F: mit Cytochalasin B (10 µg/ml) behandelte Zellen.

Maßstab: 20µm

Um zu einer quantitativen Aussage über die Expression von CRMP-4 in B35 Neuroblastomzellen zu kommen, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Um diese Westernblots quantitativ zu kalibrieren, wurde rekombinantes N-terminal mit einem His-Tag versehenes CRMP-4 („His-CRMP-4“) verwendet. Dieses wurde nach Klonierung der CRMP-4 cDNA in den Vektor pQE80 in dem Bakterienstamm *E.coli* BL21 exprimiert und das rekombinante His-CRMP-4 wurde mit Hilfe des His-Tag über eine mit Nickel beladene Chelat-Affinitätsäule und anschließende Gelfiltration mit einer Superdex 200 Säule gereinigt (Abb. 11) und durch eine Proteinbestimmung quantifiziert. Dabei wurde ein Protein mit dem zu erwartenden Molekulargewicht von 65 kDa gewonnen (Abb. 11), dessen Identität durch Westernblot-Analysen mit dem Antikörper anti-CRMP-4 bestätigt werden konnte (Abb. 11). Zusätzlich entstand ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 55 kDa. Dieses Protein reagierte im Westernblot mit dem Antikörper anti-CRMP-Familie, nicht aber mit anti-CRMP-4 (Abb. 11B). Da anti-CRMP-Familie ein N-terminal gelegenes Epitop erkennt (Abb. 11A), während anti-CRMP-4 an ein C-terminal lokalisiertes Epitop bindet, ist aus diesen Ergebnissen zu schließen, dass es sich bei dem 55 kDa Protein um ein C-terminal verkürztes Bruchstück handeln musste. Die Analyse des gereinigten His-CRMP-4 durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließende Coomassie-Färbung zeigte, dass dieses Proteine eine Reinheit >95% besaß.

Legende zu Abbildung 11:

- A. Schematische Struktur des rekombinanten His-CRMP-4. Die Lage der durch anti-CRMP-4 und anti-CRMP-Familie erkannten Epitope ist durch Pfeile markiert.
- B. Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie von His-CRMP-4. Oben: Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE der Chromatographie-Fractionen entsprechend der Beschriftung oberhalb des Gels. Die Pfeile auf der rechten Seite markieren die Positionen von His-CRMP-4 (gefüllte Pfeilspitze) und des 55-kDa Proteins (offene Pfeilspitze). Unten: Westernblot-Analysen der Chromatographie-Fractionen mit anti-CRMP-4 und anti-CRMP-Familie.
- C. Gelfiltration von His-CRMP-4 mit Hilfe einer Superdex 200-Säule. Oben: Chromatogram. Unten: SDS-PAGE (10%) der Chromatographie-Fractionen.

Die mit Zahlen versehenen Markierungen auf der linken Seite der Gele repräsentieren die Mobilitäten von Markerproteinen mit bekanntem Molekulargewicht (in kDa).

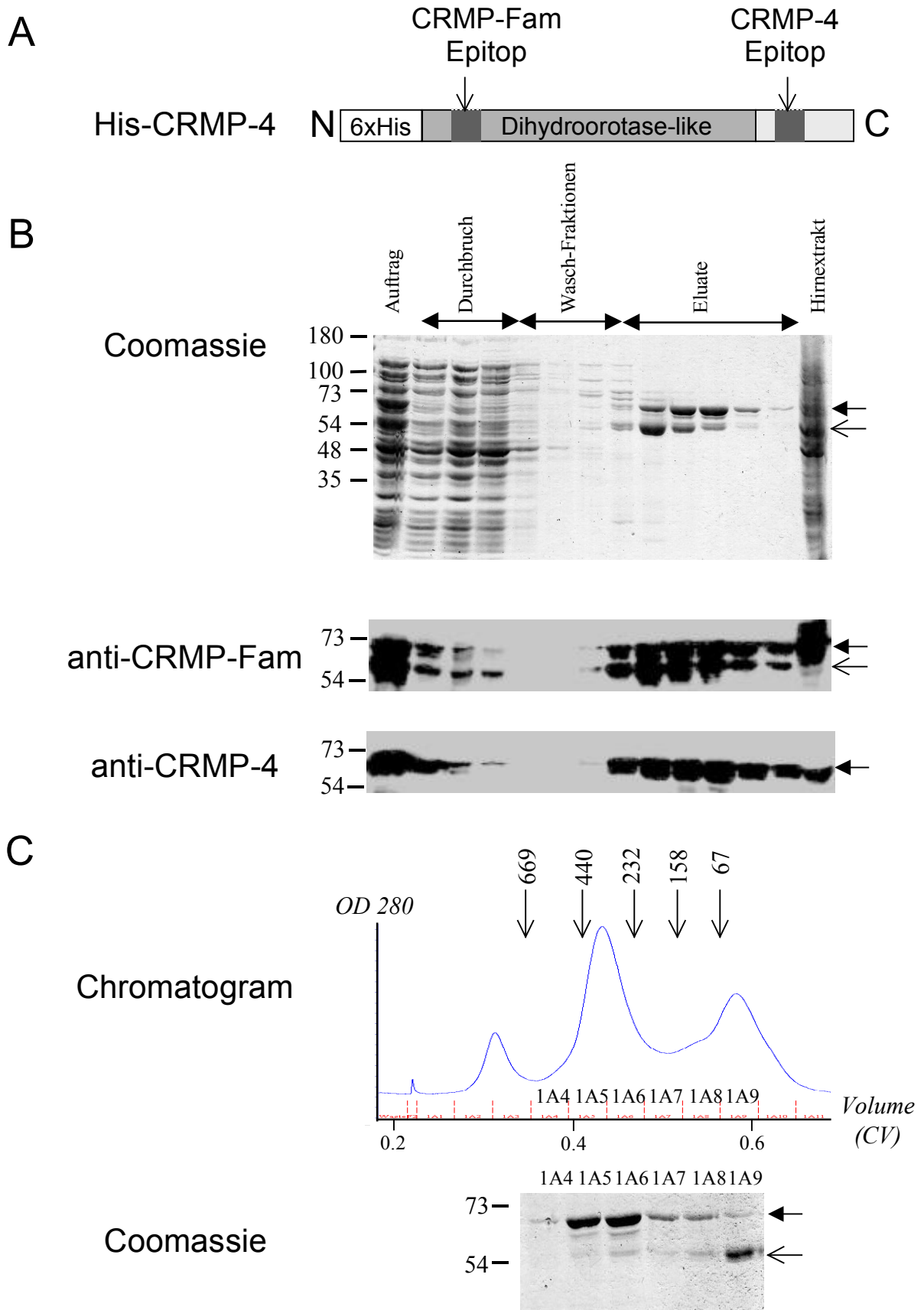


Abbildung 11: Reinigung von His-CRMP-4 durch Affinitätschromatographie.

Um die Menge des endogenen CRMP-4 zu messen, wurde eine Kultur mit B35 Neuroblastomzellen mit einem Feuchtgewicht von 5,7 mg aufgeschlossen, durch differentielle Zentrifugation bei 1.000 g und 100.000 g fraktioniert. Gleiche Aliquots dieser Fraktionen, die insgesamt einem Feuchtgewicht von 641,25 µg Feuchtgewicht entsprachen, wurden durch Westernblot untersucht und die Intensität der Signale densitometrisch mit der Intensität von Signalen definierter Mengen von rekombinantem His-CRMP-4 verglichen (Abb. 12). Hieraus errechnete sich eine Konzentration des endogenen löslichen CRMP-4 von 0,109 mg CRMP-4 pro g Feuchtgewicht. Nimmt man an, dass 1 g Gewebe höchstens 1 Volumen von 1 ml besitzt, ergibt sich daraus, dass die Konzentration des löslichen CRMP-4 im Cytosol größer als 1,68 µM sein muss. Es handelt sich somit beim CRMP-4 um ein stark exprimiertes Protein im Cytosol der B35 Neuroblastomzellen.

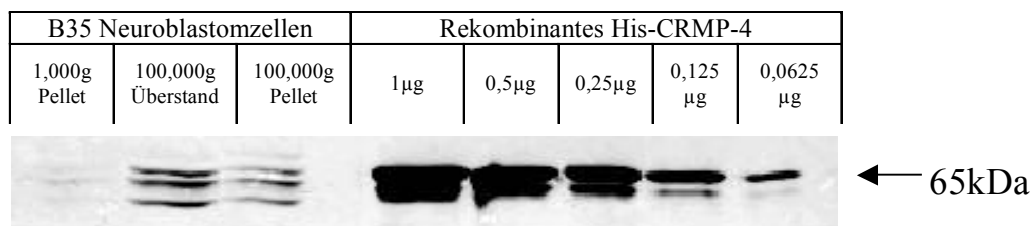


Abbildung 12: Quantitative Westernblot-Analyse der Expression von CRMP-4 in B35 Neuroblastomzellen.

Das Zellhomogenat wurde durch differentielle Zentrifugation fraktioniert. Gleiche Aliquots der über den Spuren angegebenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit anti-CRMP-4 analysiert. Auf der rechten Seite wurden rekombinantes His-CRMP-4 in den über den Spuren angegebenen Mengen aufgetrennt.

Wegen der starken endogenen Expression von CRMP-4 in B35 Neuroblastomzellen und weil HEK293 Zellen kein CRMP-4 besitzen, haben wir die Funktionalität des eukaryotischen CRMP-4-Expressionsplasmids mit Hilfe einer transienten Expression in HEK293 Zellen verifiziert (Abb. 13).

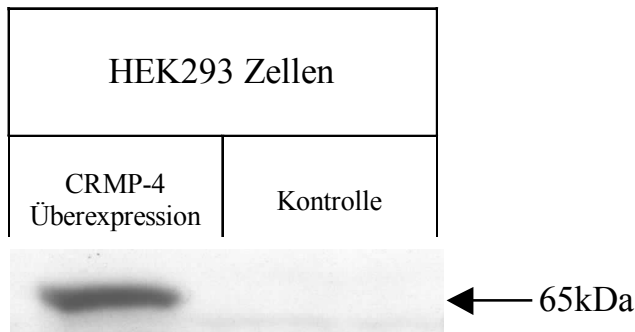


Abbildung 13: Westernblot-Analyse von HEK293 Zellen.

1 Tag nach der Transfektion mit pBKCMV-CRMP-4 wurden die Zellen geerntet und durch Westernblot mit anti-CRMP-4 analysiert.

Nachdem uns bekannt war, dass und wie viel CRMP-4 die B35 Neuroblastomzellen exprimieren, und nachdem die Funktionalität des Expressionsvektors pBKCMV-CRMP-4 gezeigt worden war, wurden B35 Neuroblastomzellen mit diesem Vektor und pEGFP-C1 kotransfiziert und die Migration gemessen. Abbildung 14 zeigt ein typisches Experiment, bei dem die Fläche der Migrationspfade insgesamt 6,8fach zunahm.

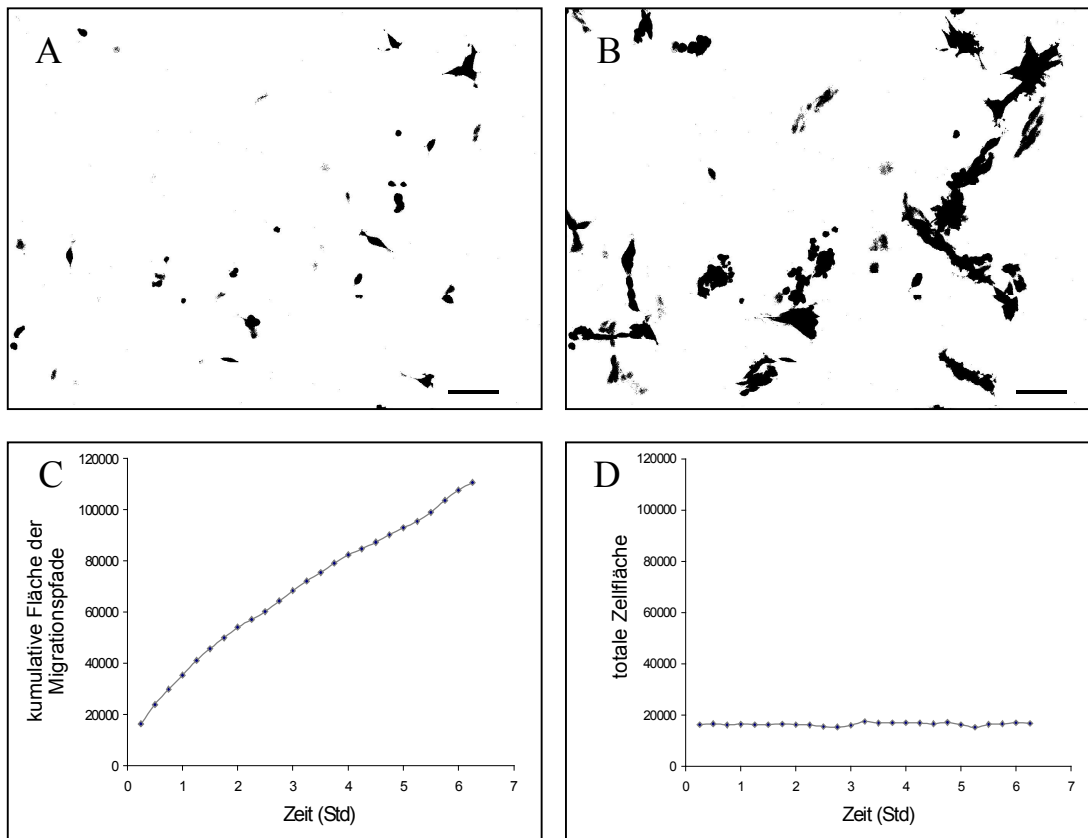


Abbildung 14: Zellmigration nach der transienten Kots transfektion von B35 Neuroblastomzellen mit pBKCMV-CRMP-4 und pEGFP-C1.

- A. Initiales Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - B. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - C. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - D. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 µm

Im Vergleich zu parallel durchgeführten Kontrolltransfektionen mit pBKCMV fanden wir in drei unabhängigen Experimenten eine leichte, aber signifikante Hemmung der Zellmigration durch CRMP-4. In Abbildung 15 werden die Mittelwerte des RDI der beiden Bedingungen verglichen.

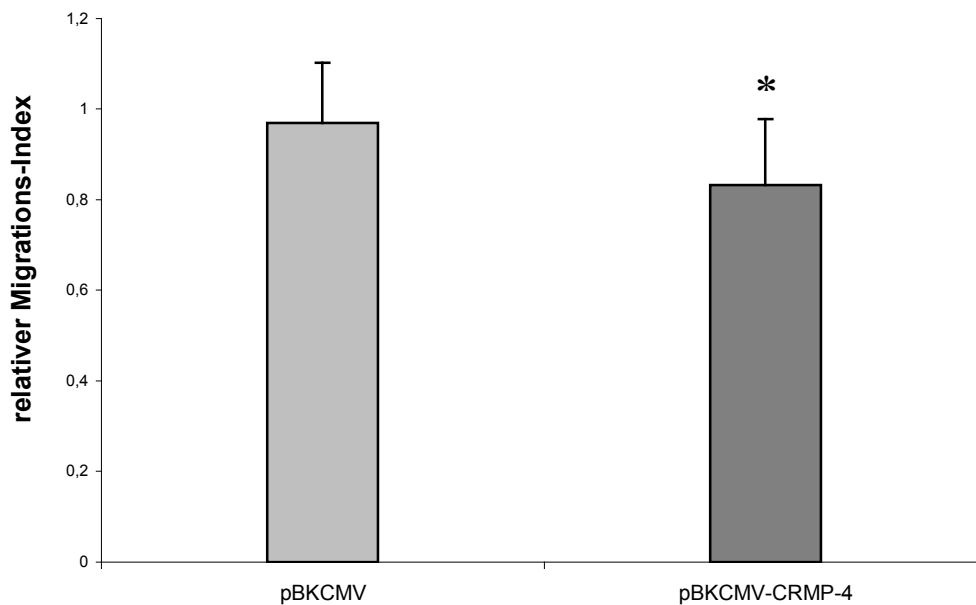


Abbildung 15: Einfluss einer Überexpression von CRMP-4 auf die Migration von B35 Neuroblastomzellen. Vergleich der relativen Migrations-Indizes.

Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von 6 Analysen und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung für Zellen, die mit pBKCMV (hellgraue Säule), bzw. mit pBKCMV-CRMP-4 (dunkelgraue Säule) transfiziert wurden. Die Werte wurden durch einen zweiseitigen t-Test verglichen (*, $p < 0,05$).

4.2.2 „Knockdown“ von CRMP-4

In der jüngeren Vergangenheit wurden Methoden entwickelt, um die Expression endogener Proteine durch small interfering RNAs (siRNA) zu hemmen. Da B35 Neuroblastomzellen eine starke endogene Expression von CRMP-4 zeigten, waren wir daran interessiert zu erfahren, ob dieser methodische Ansatz auch dazu genutzt werden konnte, um die Funktion von CRMP-4 bei der Migration dieser Zellen zu untersuchen. Zunächst haben wir die Wirkung von käuflichen siRNAs auf das Expressionsniveau von CRMP-4 untersucht. Neben Kontroll-siRNAs wurden dazu zwei verschiedene CRMP-4-spezifische siRNAs in Konzentrationen zwischen 25 nM und 100 nM eingesetzt. Vorexperimente zeigten die besten Ergebnisse, wenn beide siRNAs gleichzeitig in einer Konzentration von je 100 nM eingesetzt wurden.

Wenn Zellen nach einer Transfektion mit Kontroll-siRNA bzw. mit 100 nM CRMP-4 siRNA(1+2) durch differentielle Zentrifugation fraktioniert wurden und gleiche

Proteinmengen durch Westernblot mit antiCRMP-4 analysiert wurden, fanden wir eine Reduktion des cytosolischen CRMP-4 um etwa 95%. Als Kontrolle wurde Actin nachgewiesen (Abb. 16).

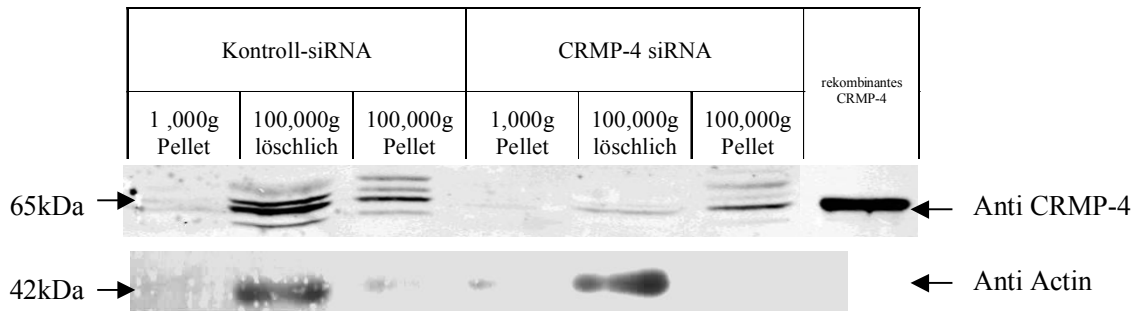


Abbildung 16: Westernblot-Analyse von B35 Neuroblastomzellen nach transients Transfektion mit CRMP-4 siRNA und Kontroll-siRNA.

3 Tage nach der Transfektion mit 100 nM CRMP4 siRNA(1+2) und Kontroll-siRNA wurden Homogenate der Zellen durch differentielle Zentrifugation fraktioniert und durch Westernblot mit anti-CRMP-4 analysiert. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen der korrespondierenden Fraktionen beider Transfektionen geladen.

Die immunocytochemische Analyse der transfizierten Kulturen bestätigte einen weitgehenden Verlust der CRMP-4 Immunreaktivität im Cytosol nach Inkubation mit 100 nM CRMP-4 siRNA(1+2) (Abb. 17). Lediglich im Zellkern war eine residuelle CRMP-4-Färbung zu beobachten. Die mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen zeigten eine CRMP-4 Verteilung wie unbehandelte Zellen (Abb. 17A; vergleiche Abb. 10B). Interessanterweise war die Struktur des F-Actins in Zellen mit fast vollständigem CRMP-4 „Knockdown“ im Vergleich zu Kontrollzellen verändert. Die in letzteren regelmäßig anzutreffenden linearen Actin-Bündel (Abb. 17B) erschienen in den Zellen ohne cytosolisches CRMP-4 weitgehend ungeordnet (Abb.17D).

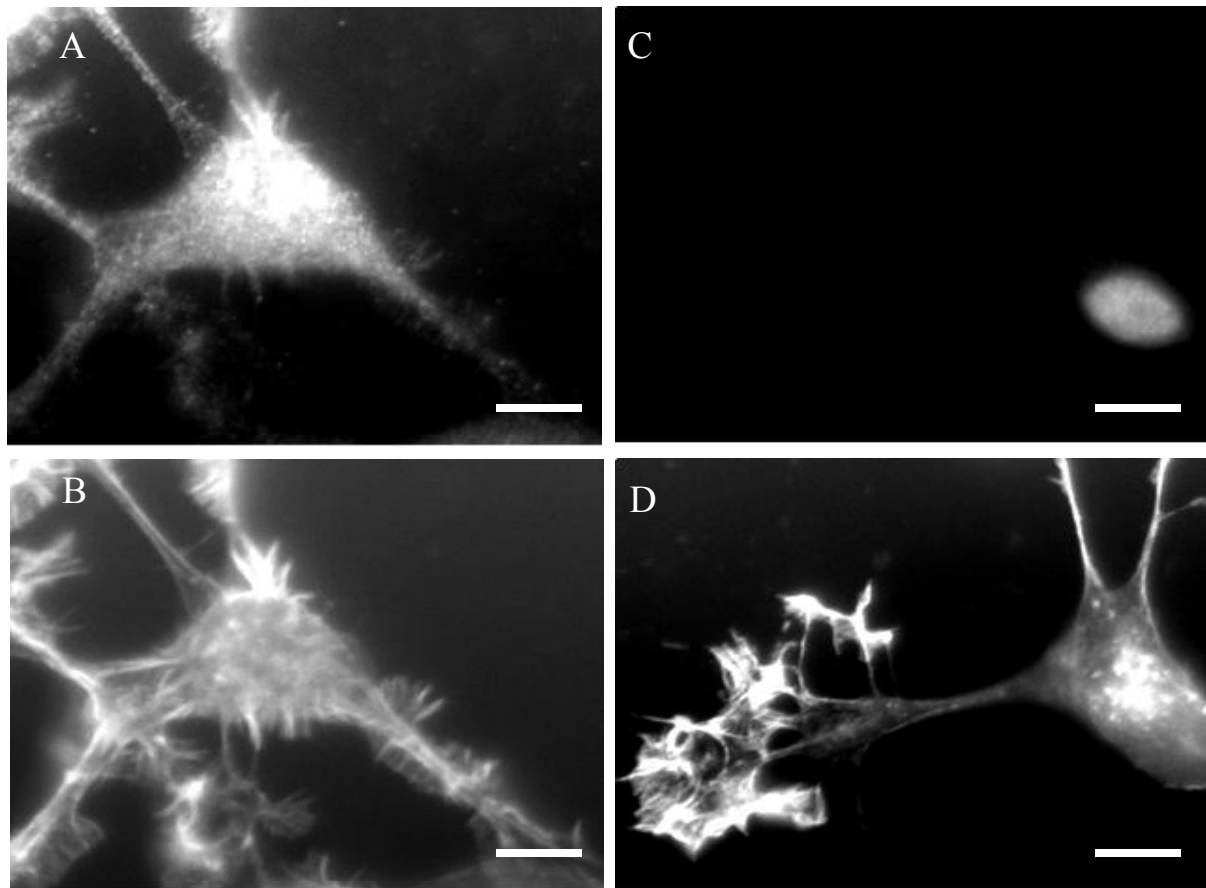


Abbildung 17: Immuncytochemische Analyse von B35 Neuroblastomzellen nach transienter Transfektion mit CRMP-4 siRNA und Kontroll-siRNA.

3 Tage nach der Transfektion mit 100 nM CRMP4 siRNA(1+2) und Kontroll-siRNA wurden die Zellen fixiert und CRMP-4 bzw. F-Actin gefärbt.

- A. Negativ-Kontrolle, CRMP-4-Färbung.
- B. Negativ-Kontrolle, F-Actin
- C. 100 nM CRMP4 siRNA(1+2), CRMP-4-Färbung
- D. 100 nM CRMP4 siRNA(1+2), F-Actin.

Maßstab: 10 μ m

Abschließend wurde der Einfluss eines CRMP-4 „Knockdowns“ auf die Zellmigration untersucht. Dazu wurden die Zellen zuerst mit dem pEGFP-C1 Plasmid transient transfiziert. Nach einem Tag erfolgte die Zugabe der siRNAs und die Migration der Zellen wurde nach weiteren drei Tagen mit unserem Test quantifiziert. Nach der Transfektion mit der Kontroll-siRNA beobachteten wir wiederum eine lebhaft Migration der Zellen. Die Abbildung 18 zeigt ein typisches Experiment, bei dem die Fläche der Migrationspfade im Lauf von 6 Stunden um das 4,7fache zunahm. Nach Inkubation mit 100 nM CRMP-4 siRNA(1+2) war ebenfalls eine lebhaft Motilität der Zellen zu beobachten. In dem in Abbildung 19 gezeigten Experiment nahm die Fläche der Migrationspfade im Lauf von 6 Stunden um das 5,3fache zu.

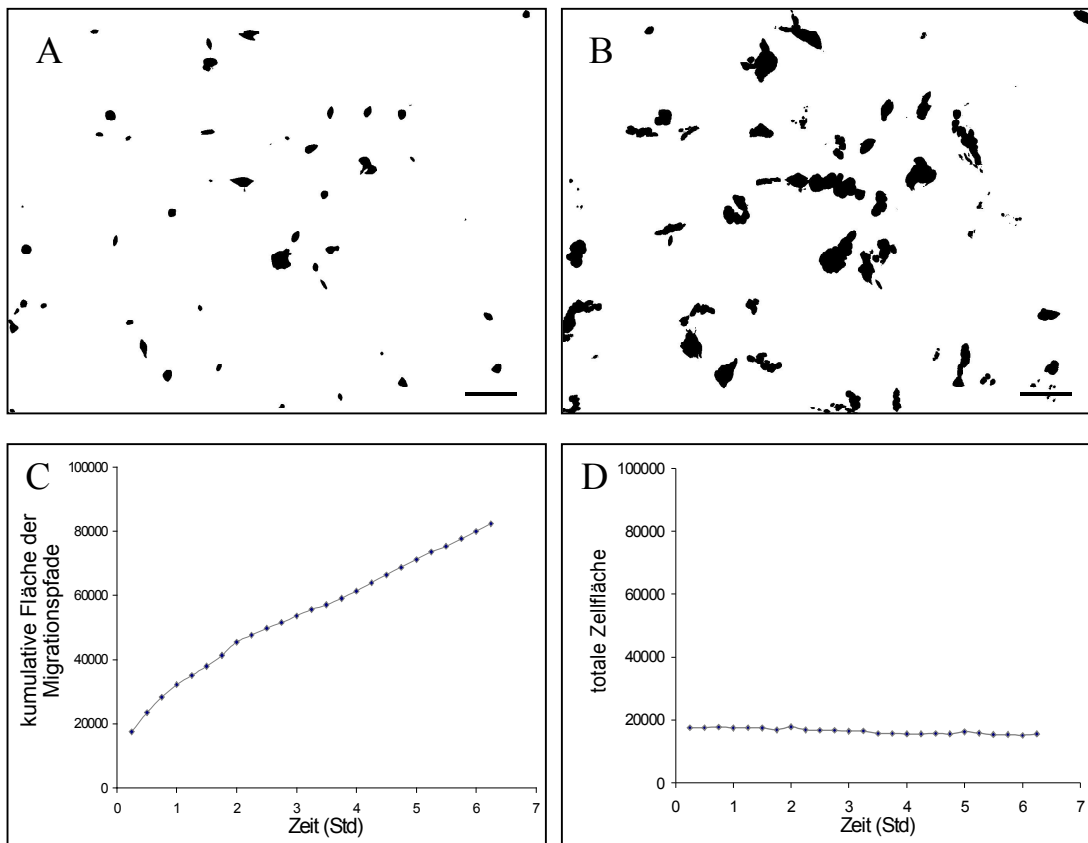


Abbildung 18: Zellmigration nach sequentieller transienter Expression von B35 Neuroblastomzellen mit pEGFP-C1 und mit Kontroll-siRNA.

- Initiales Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 µm

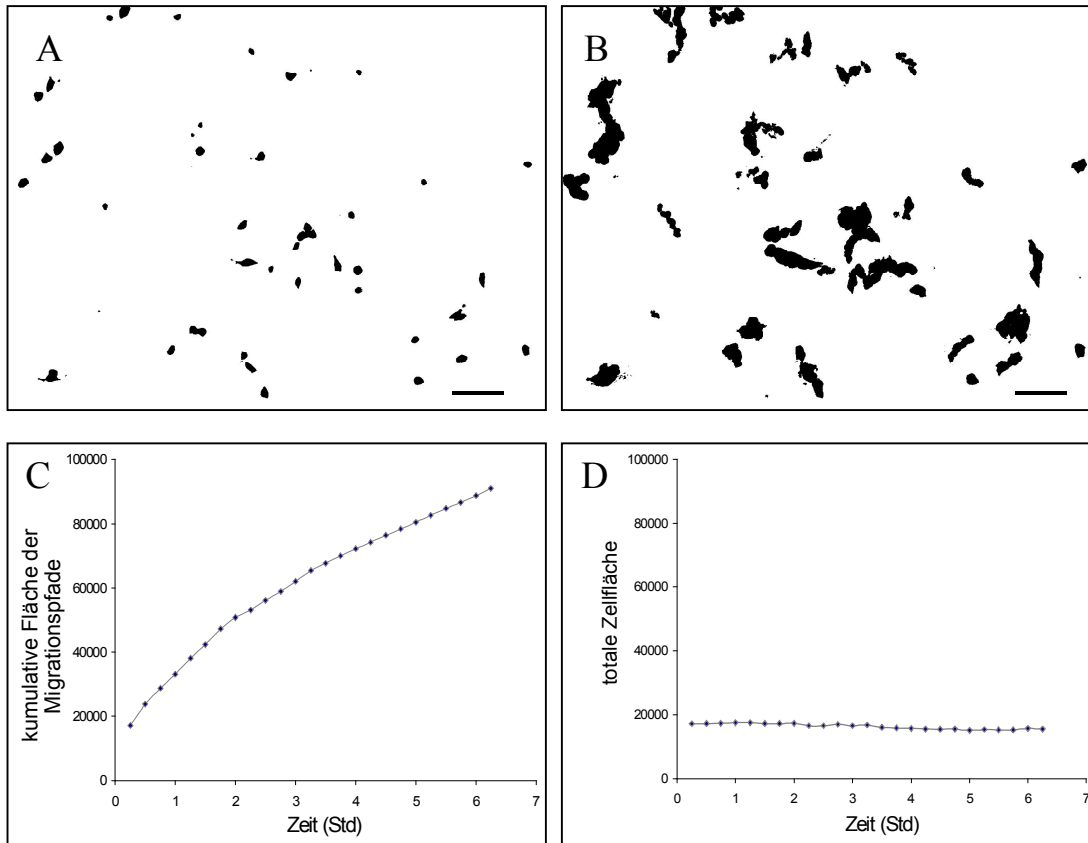


Abbildung 19: Zellmigration nach sequentieller transienter Expression von B35 Neuroblastomzellen mit pEGFP-C1 und mit CRMP-4 siRNA.

- A. Initiales Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - B. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - C. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - D. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 μ m

Im Vergleich zu parallel durchgeführten Kontrolltransfektionen mit Kontroll-siRNAs fanden wir in drei unabhängigen Experimenten eine signifikante Steigerung der Zellmigration nach Inkubation mit 100 nM CRMP-4 siRNA(1+2). In Abbildung 20 werden die Mittelwerte des relativen Migrations-Index der beiden Bedingungen verglichen.

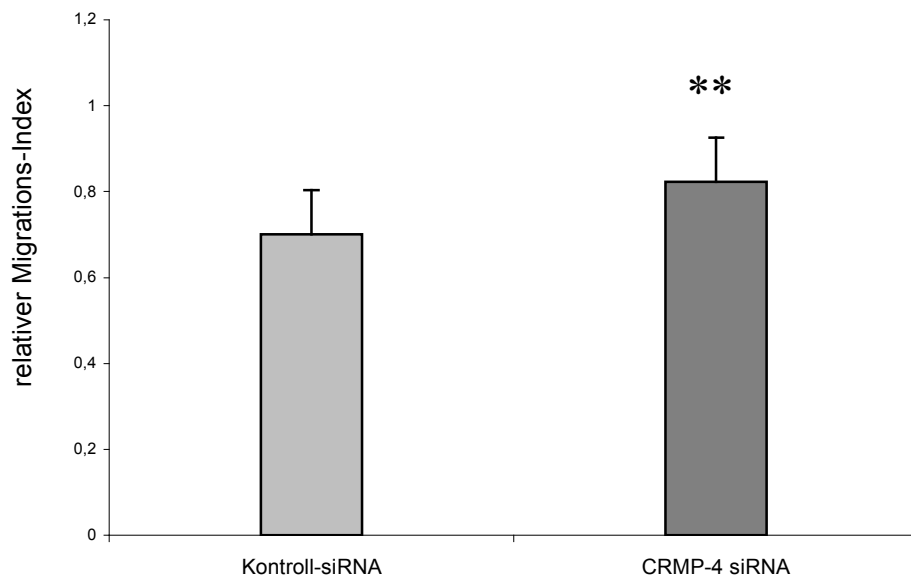


Abbildung 20: Einfluss der CRMP-4 siRNA auf die Migration von B35 Neuroblastomzellen. Vergleich der relativen Migrations-Indizes.

Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von 12 Analysen und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung für Zellen, die mit Kontroll-siRNA (hellgraue Säule) bzw. mit CRMP-4 siRNA (dunkelgraue Säule) transfiziert wurden. Die Werte wurden durch einen zweiseitigen t-Test verglichen (**, $p < 0,001$).

4.3 Suche nach Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Zellmigration

In einer abschließenden Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob mit Hilfe des Migrationstests Substanzen mit hemmender Wirkung auf die Zellmigration gefunden werden können. Solche Substanzen besäßen ein potentiell pharmakologisches Interesse als Hemmstoffe des invasiven Wachstums von Tumoren. Mit dem Test konnten im 24-well Format pro Experiment 12 oder mehr Substanzen gescreent werden. Wenn alle Substanzen in demselben Vehikel (z.B. DMF oder Ethanol) gelöst waren, konnten sogar maximal 23 verschiedene Stoffe in derselben Sitzung untersucht werden. Für Substanzen, die in diesem primären Screening eine Wirkung auf die Migration von B35 Neuroblastomzellen hatten, wurden zur Bestätigung des Effekts Studien zur Dosis-Wirkungs-Beziehung angeschlossen, wie dies in Abschnitt 4.1 am Beispiel des Cytochalasin B beschrieben wurde. Im Zuge dieser Experimente haben wir eine Substanz identifiziert, die einen starken hemmenden Effekt auf die Zellmigration besitzt. Wir bezeichnen diese Verbindung als Substanz A. Die chemische Struktur dieses Stoffes kann an dieser Stelle aus rechtlichen Gründen nicht gezeigt werden. Diese wird aber in einer Publikation offengelegt werden (Dai et al., in Vorbereitung). Abbildung 21 zeigt die Hemmung der Migration von B35 Neuroblastomzellen durch Substanz A in einer Konzentration von 20 μM in Gegenwart von 10% FCS. Andererseits blieb unter dieser Behandlung die Fläche schwarzer Pixel mit der Zeit etwa konstant (Abb. 21F). Deshalb konnte ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit Substanz A im Beobachtungszeitraum zum Tod der Zellen führte. Im Beobachtungszeitraum von 6 Stunden nahm diese Fläche der Migrationspfade um etwa das 4fache zu (Abb. 21E).

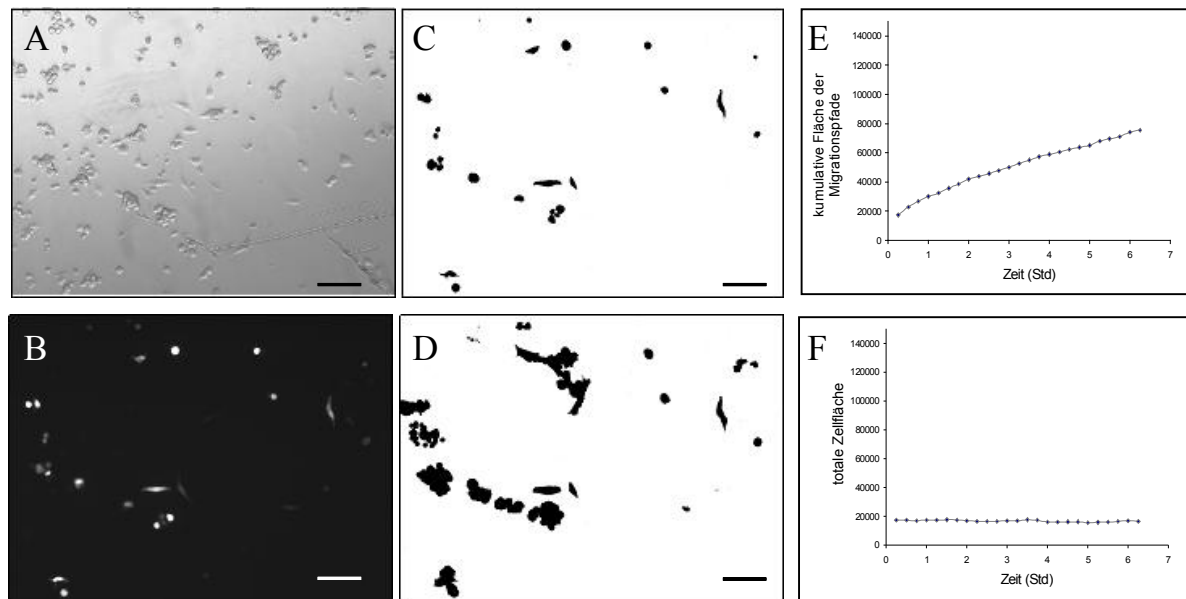


Abbildung 21: Migration von transient GFP exprimierenden B35 Neuroblastomzellen in Gegenwart von 20 µM Substanz A.

- A. Phasenkontrast-Bild der Kulturen
 - B. Fluoreszenzbild desselben Areals
 - C. Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - D. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - E. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - F. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 µm

Da die Substanz A aus einer Stammlösung in Dimethylformamid (DMF) im Volumenverhältnis 1:200 dem Kulturmedium zugesetzt worden war, ist in Abbildung 22 als Kontrolle die Migration der B35 Neuroblastomzellen in Gegenwart von 0,5% (v/v) DMF gezeigt, das als Vehikel verwendet wurde. Hierbei nahm die Fläche der Migrationspfade im Verlauf von 6 Stunden um das 7fache zu (Abb. 22E). Es ergaben sich keine Hinweise auf eine toxische Wirkung des DMF für die Zellen. Der statistische Vergleich der relativen Migrations-Indizes zeigte eine hochsignifikante Hemmung der Zellmigration durch 20 µM Substanz A (Abb. 23).

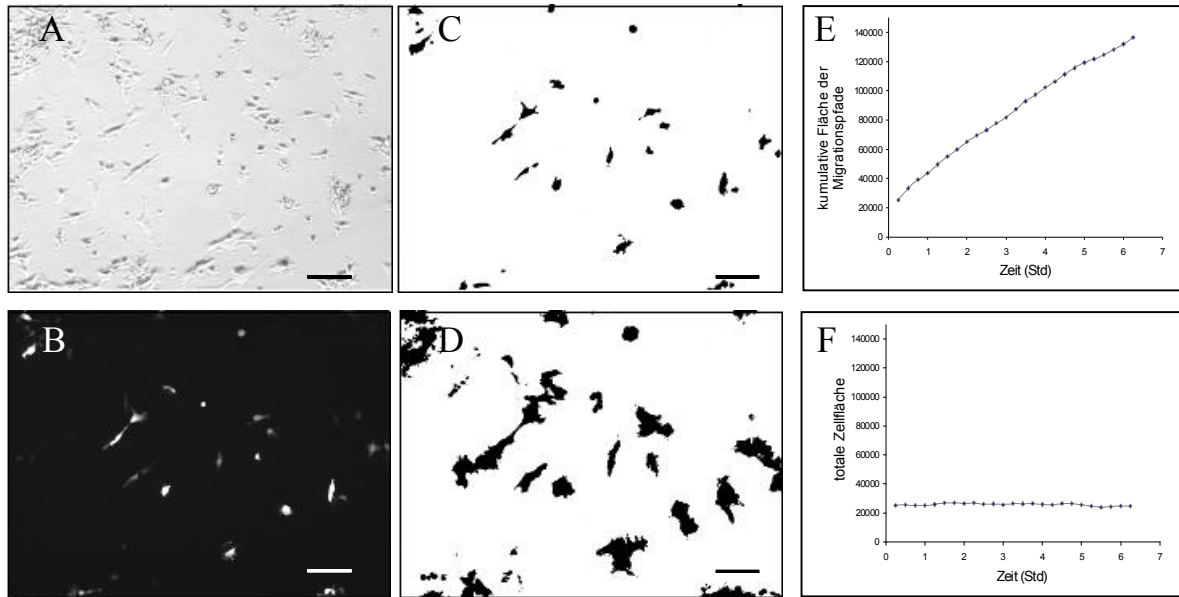


Abbildung 22: Migration von transient GFP exprimierenden B35 Neuroblastomzellen in Gegenwart von 0,5% DMF (Vehikel).

- A. Phasenkontrast-Bild der Kulturen
- B. Fluoreszenzbild desselben Areals
- C. Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
- D. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
- E. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
- F. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche

Maßstab: 100 μm

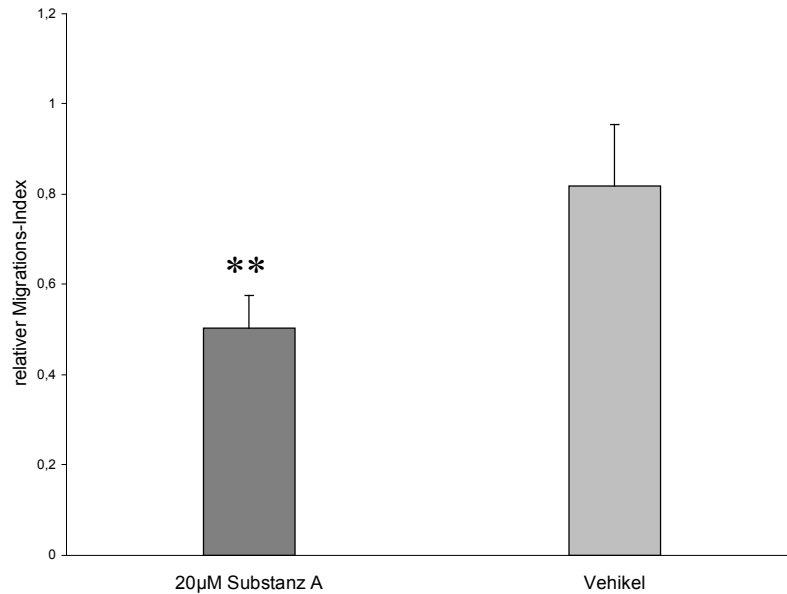


Abbildung 23: Einfluss von Substanz A auf die Migration von B35 Neuroblastomzellen: Vergleich der relativen Migrations-Indizes.

Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von 6 Analysen und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung für Zellen, die mit Vehikel (hellgraue Säule) bzw. mit 20 µM Substanz A (dunkelgraue Säule) behandelt wurden. Die Werte wurden durch einen zweiseitigen t-Test verglichen (**, $p < 0,001$).

Mit Hilfe des RDI wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen der Substanz A auf die Zellmigration verglichen (Abb. 24). Hierbei wurde der RDI durch Substanz A mit einer klaren Dosis-Wirkungskurve gehemmt (Abb. 24). Eine maximale Hemmung der Zellmigration beobachteten wir oberhalb von 50 µM. Die halbmaximale Hemmung der Migration wurde bei einer Konzentration der Substanz A zwischen 12,5 und 25 µM beobachtet.

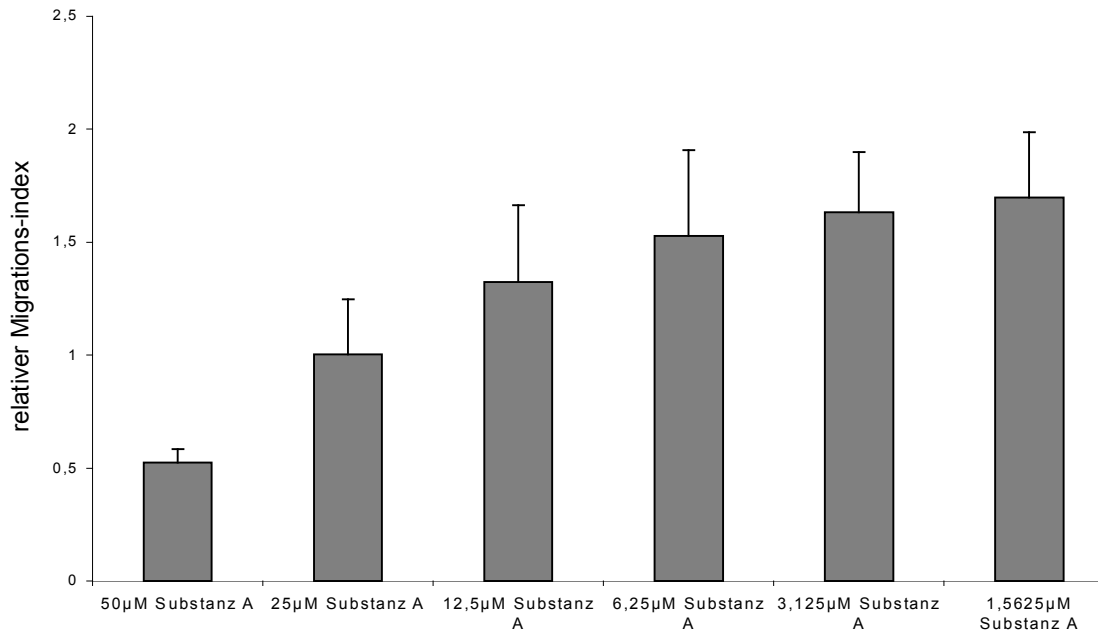


Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurve der Hemmung der Migration von B35 Neuroblastomzellen durch Substanz A in Gegenwart von 10% FCS.

Die Säulen repräsentieren Mittelwerte des relativen Migrations-Index. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=6).

Die mikroskopische Untersuchung der mit Substanz A behandelten B35 Neuroblastomzellen zeigte eine auffällige Formveränderung im Vergleich zum Vehikel im Sinne einer ausgeprägten Abrundung (Abb. 25). Diese Veränderung begann bereits kurz nach Zugabe der Substanz A, und dieser Effekt war nach etwa 1 Stunde vollständig ausgeprägt. Nach Färbung des F-Actin-Cytoskeletts war nach 1 Stunde eine tiefgreifende Umorganisation sichtbar (Abb. 25). Während mit Vehikel behandelte Zellen eine ausgebreitete fibroblastenähnliche Morphologie mit Lamellipodien, vielen Filopodien und Stressfasern aufwiesen (Abb. 25A), erschienen die mit 20 µM Substanz A behandelten Zellen viel kleiner und ihr Actin-Cytoskelett war weitgehend kollabiert (Abb. 25B). F-Actin war in retraktionsfaserartigen Ausläufern und in kompakten Ansammlungen nachweisbar (Abb. 25B). Substanz A ist somit ein sogenannter „Kollaps-Faktor“.

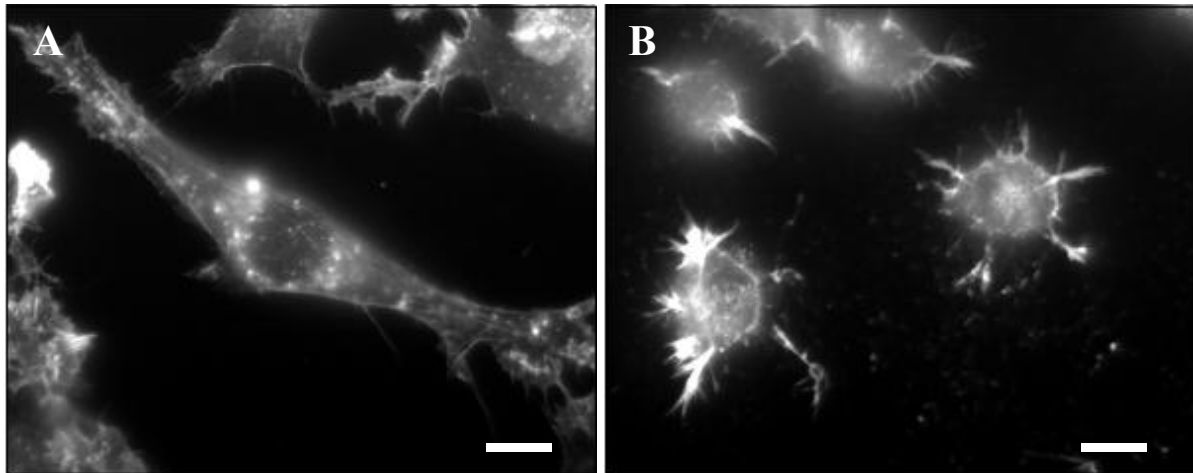


Abbildung 25: Cytochemische Analyse von B35 Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Substanz A bzw. Vehikel.

Nach 1 Stunde Inkubation mit 20 μM Substanz A bzw. Vehikel wurden die Zellen fixiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.

A. Vehikel

B. 25 μM Substanz A

Maßstab: 10 μm

Die Reduktion der Zellflächen unter Behandlung mit Substanz A ließ uns vermuten, dass es zu einer Hemmung der Zelladhäsion kommt. Deshalb wurden B35 Neuroblastomzellen für 2 Stunden mit 20 μM Substanz A behandelt, dann 3 mal mit DMEM/F12 gewaschen, die verbleibenden Zellen mit 4% PFA fixiert und mit DAPI gefärbt (Abb. 26). Hierbei war die Anzahl adhärenter Zellen nach Gabe von Substanz A deutlich reduziert. Die quantitative Auswertung zeigt eine Reduktion der Zelladhäsion um etwa 70% (Abb. 26C).

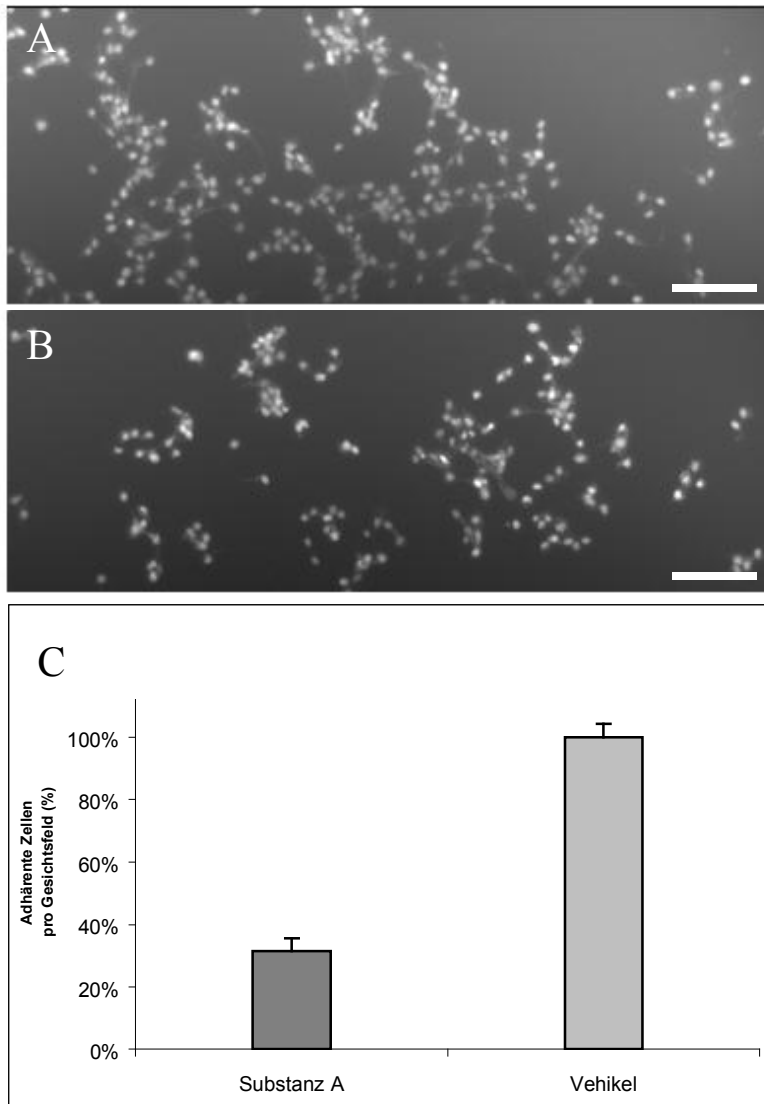


Abbildung 26: B35 Neuroblastomzellen Adhäsions-Test.

Nach 2 Stunden Inkubation mit 20 μM Substanz A bzw. Vehikel wurden die Zellen 3 mal gewaschen, fixiert, mit DAPI gefärbt und die Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld (10x Vergrößerung) gezählt.

A: Vehikel

B: 20 μM Substanz A

Maßstab: 100 μm

C: Histogramm: Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (n=6), die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Während der Beobachtung der mit Substanz A behandelten Zellen über einen Zeitraum von 6 Stunden hinweg mittels Zeitraffer-Videomikroskopie ergab sich kein Anhalt für ein Absterben der Zellen. Außerdem wurde untersucht, ob es nach längerer Inkubation der B35 Neuroblastomzellen mit 20 μM Substanz A zum vermehrten Absterben der Zellen kam. Bei der Anfärbung der Zellkerne mit DAPI im Anschluss an eine 16-stündige Inkubation der Zellen mit Substanz A waren pyknotische Zellkerne im Vergleich zum Vehikel nicht in

verstärktem Maß sichtbar (Abb. 27). Daher ergab sich kein Anhalt für eine die Apoptose der Zellen fördernde Wirkung der Substanz A.

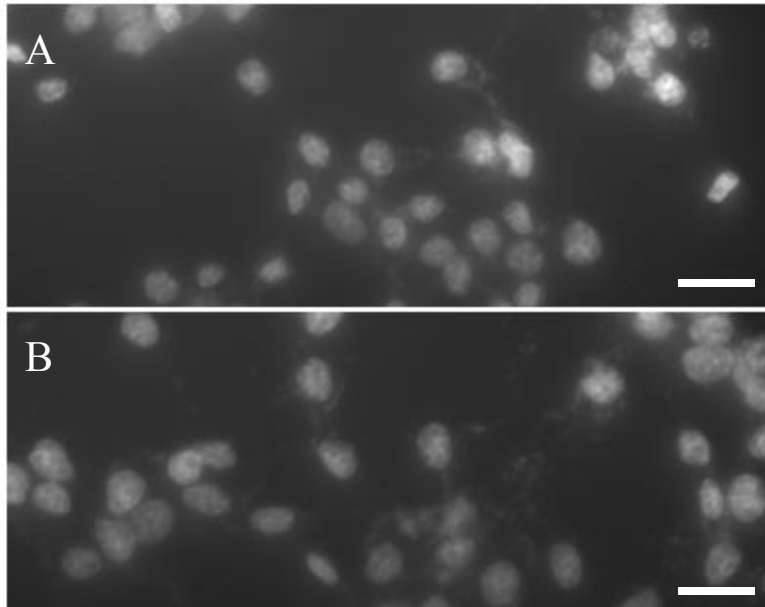


Abbildung 27: Struktur der Zellkerne von B35 Neuroblastomzellen nach Inkubation mit Substanz A bzw. Vehikel.

Die Zellen wurden für 16 Stunden mit 20 μM Substanz A bzw. Vehikel inkubiert, mit 4% PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

A. Vehikel

B. 20 μM Substanz A

Maßstab: 20 μm

Um die Zelltyp-Spezifität des migrationshemmenden und einen Actin-Cytoskelett-Kollaps auslösenden Effekte von Substanz A zu untersuchen, wurden aus embryonalen Stammzellen differenzierte gliale Vorläuferzellen verwendet, die stabil eCFP exprimierten. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Brüstle und Frau Dr. Glaser durchgeführt. Im Vergleich zu den B35 Neuroblastomzellen zeigten die glialen Vorläuferzellen eine erhöhte Photosensitivität. Daher wurden alle Fluoreszenz-Aufnahmen bei minimaler Intensität des Anregungslichtes und durch Binning gesteigerter Kamerasensitivität gemacht. Unter diesen Vorsichtsmaßnahmen kam es im Beobachtungszeitraum von 6 Stunden zu keinem vermehrten Absterben der Zellen. Die für diese Zellen optimale Zelldichte lag etwas höher als bei den B35 Neuroblastomzellen. Außerdem tolerierten diese Zellen DMF als Vehikelsubstanz weniger gut. In Gegenwart von 0,5% (v/v) Ethanol zeigten die glialen Vorläuferzellen unter den entsprechend angepassten Bedingungen eine lebhaftere Zellmigration (Abb. 28). Im Verlauf von 6 Stunden nahm die von

den Migrationspfaden überdeckte Fläche 6fach zu (Abb. 28C). Der Verlauf der totalen Zellfläche war fast konstant (Abb. 28D).

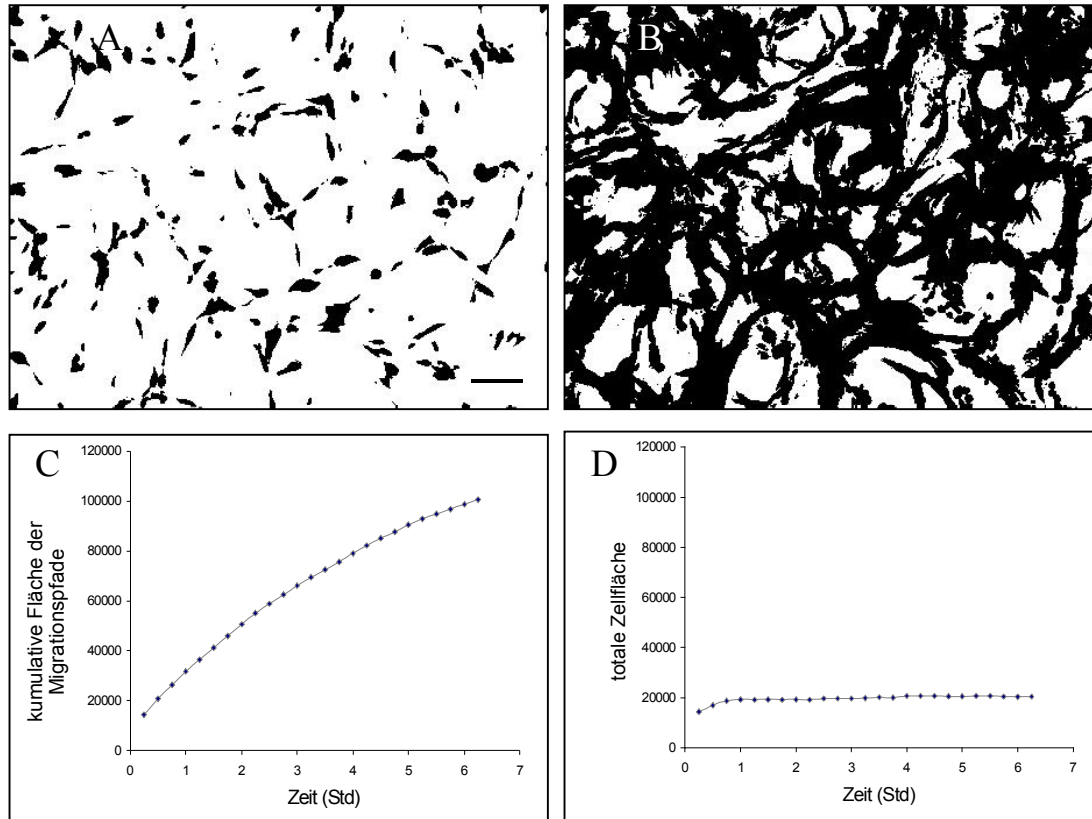


Abbildung 28: Migration von stabil CFP exprimierenden glialen Vorläuferzellen in Gegenwart von 0,5% (v/v) Ethanol in serumfreiem Medium.

- A. Initiales Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - B. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - C. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - D. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 μm

Nachdem Substanz A aus einer ethanolischen Stammlösung zugegeben wurde, zeigte sich eine deutliche Hemmung der Migration der glialen Vorläuferzellen bereits bei einer Konzentration von 5 μM in einem chemisch definierten, serumfreien Medium. Im Beobachtungszeitraum von 6 Stunden nahm die Fläche der Migrationspfade nur um etwa das 3fache zu (Abb. 29C). Unter dieser Behandlung war die Fläche schwarzer Pixel mit der Zeit minimal rückläufig (Abb. 29D). Eine deutliche Steigerung des Zelltodes war aber nicht auffällig. Der statistische Vergleich der relativen Migrations-Indizes zeigte eine hochsignifikante Hemmung der Zellmigration durch 5 μM Substanz A (Abb. 30).

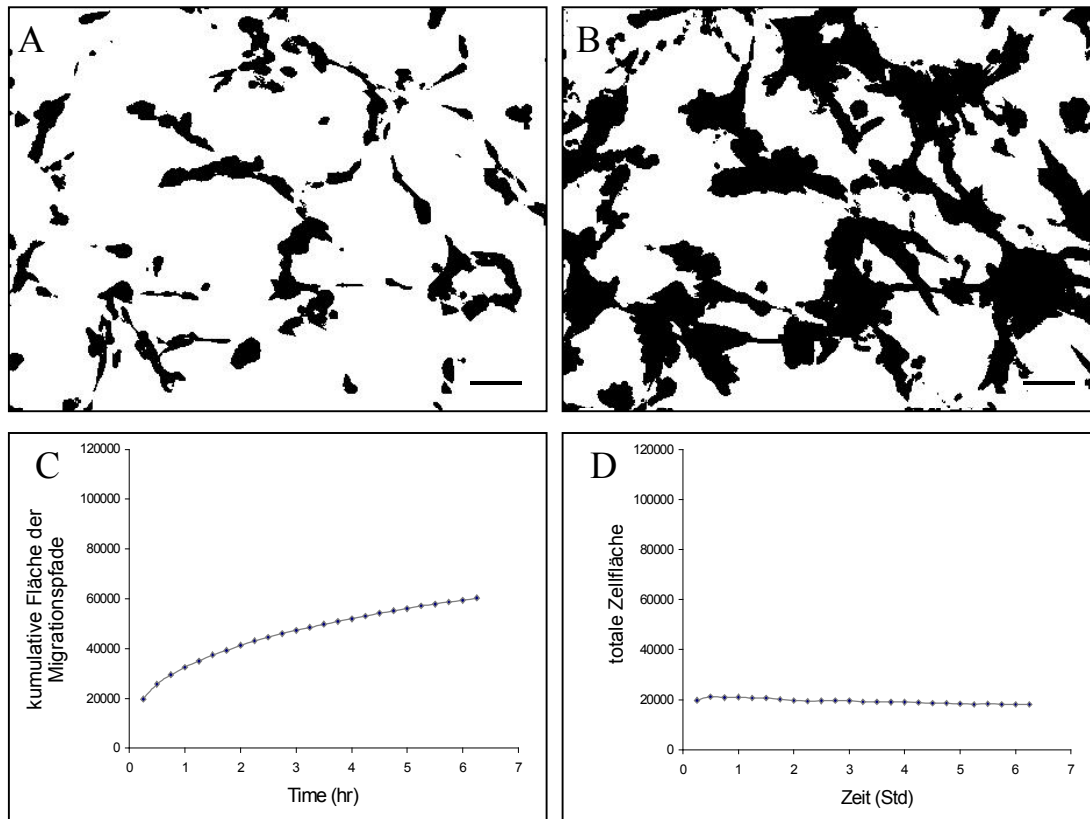


Abbildung 29: Migration von stabil CFP exprimierenden glialen Vorläuferzellen in Gegenwart von 5 μ M Substanz A in serumfreiem Medium.

- A. Initiales Bild nach der Einstellung des Schwellenwertes
 - B. Z-Projektion des Bildstapels von 25 binären Bildern
 - C. Zeitabhängige Zunahme der kumulativen Fläche der Migrationspfade
 - D. Zeitabhängigkeit der totalen Zellfläche
- Maßstab: 100 μ m

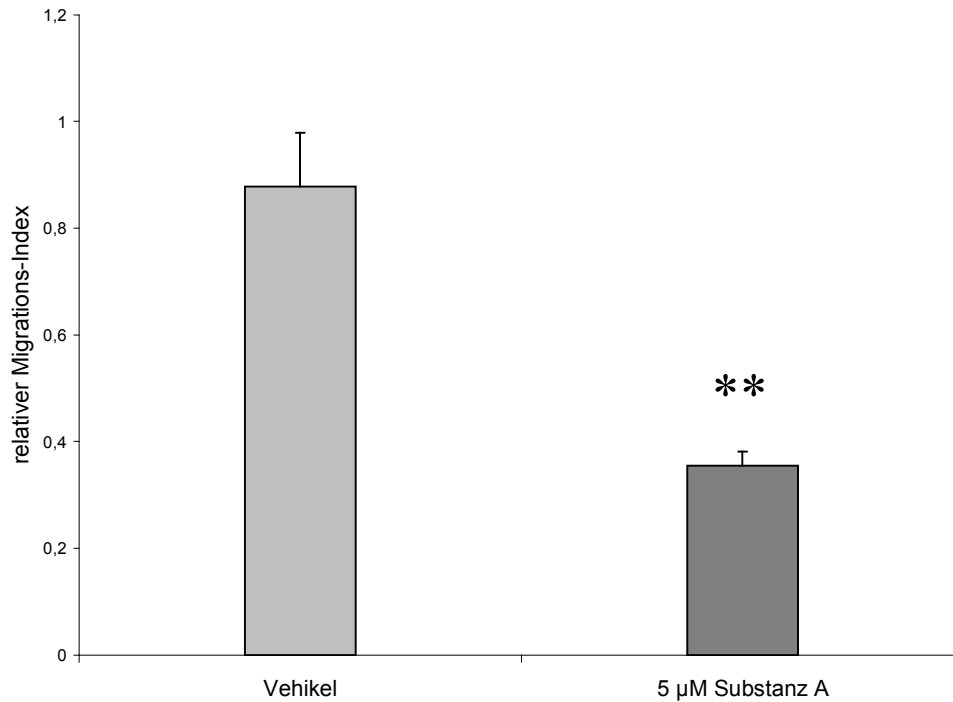


Abbildung 30: Einfluss von Substanz A auf die Migration von glialen Vorläuferzellen: Vergleich der relativen Migrations-Indizes.

Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von 6 Analysen und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Standardabweichung für Zellen, die mit Vehikel (hellgraue Säule), bzw. mit 5 µM Substanz A (dunkelgraue Säule) behandelt wurden. Die Werte wurden durch einen zweiseitigen t-Test verglichen (**, $p < 0,001$).

Mit Hilfe des RDI wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen an Substanz A auf die Migration der glialen Vorläuferzellen verglichen (Abb. 31). Hierbei wurde der RDI durch Substanz A mit einer klaren Dosis-Wirkungskurve gehemmt. Eine maximale Hemmung der Zellmigration beobachteten wir oberhalb von 10 µM. Die halbmaximale Hemmung der Migration wurde bei einer Konzentration der Substanz A zwischen 2,5 und 5 µM beobachtet.

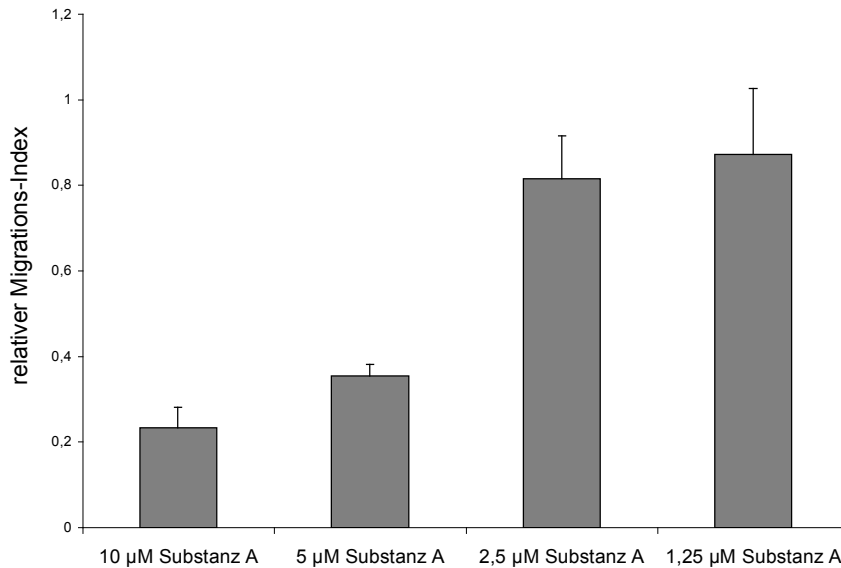


Abbildung 31: Dosis-Wirkungskurve der Migration von glialen Vorläuferzellen durch Substanz A in serumfreiem Medium.

Die Säulen repräsentieren Mittelwerte des relativen Migrations-Index. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (n=6).

Die mikroskopische Untersuchung der mit Substanz A behandelten glialen Vorläuferzellen zeigte ähnlich wie bei den B35 Neuroblastomzellen eine auffällige Formveränderung im Vergleich zum Vehikel im Sinne einer ausgeprägten Abrundung (Abb. 32C). Diese Veränderung wurde wenige Minuten nach Zugabe der Substanz A sichtbar und war nach etwa 1 Stunde vollständig ausgeprägt. Die Färbung des F-Actin-Cytoskeletts machte eine tiefgreifende Umorganisation sichtbar (Abb. 32D). Während mit Vehikel behandelte Zellen wieder eine ausgebreitete fibroblastenähnliche Morphologie mit Lamellipodien und Stressfasern aufwiesen (Abb. 32A, B), erschienen mit 20 µM Substanz A behandelte Zellen viel kleiner und ihr Actin-Cytoskelett war weitgehend kollabiert (Abb. 32D).

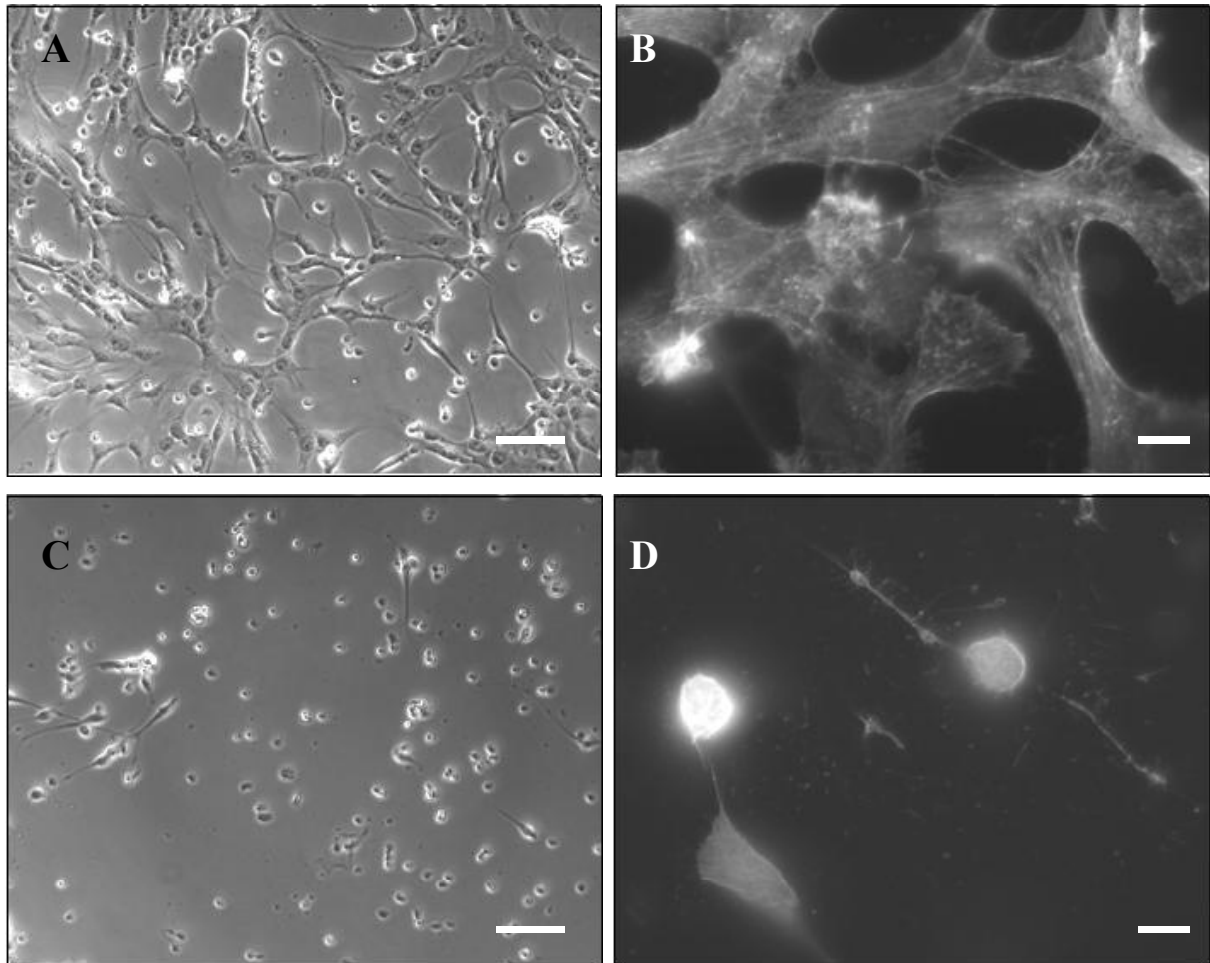


Abbildung 32: Morphologie von glialen Vorläuferzellen nach Inkubation mit 20 μM Substanz A bzw. Vehikel. Nach 1-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.

- | | |
|--|----------------------------|
| A. Vehikel, Phasenkontrast | Maßstab: 100 μm |
| B. Vehikel, F-Actin | Maßstab: 20 μm |
| C. 20 μM Substanz A, Phasenkontrast | Maßstab: 100 μm |
| D. 20 μM Substanz A, F-Actin | Maßstab: 20 μm |

Als weiterer Zelltyp wurden neuronale Vorläuferzellen untersucht, die durch Differenzierung embryonaler Stammzellen gewonnen wurden. Diese Zellen zeigten ein epithelähnliches Wachstumsmuster in Zellgruppen und eine ausgeprägte Bildung von Fortsätzen und Filopodien. Auch bei diesen Zellen kam es nach Gabe von 20 μM Substanz A zu einer auffälligen Formveränderung im Vergleich zum Vehikel (Abb. 33C, D). Diese Veränderung erschien allerdings etwas geringer ausgeprägt als bei den glialen Vorläuferzellen und den B35 Neuroblastomzellen. Die mit Substanz A behandelten Zellen hatten im Durchschnitt eine geringere Fläche, ihr Actin-Cytoskelett war teilweise kollabiert und es war in retraktionsfaserartigen Ausläufern nachweisbar (Abb. 33D).

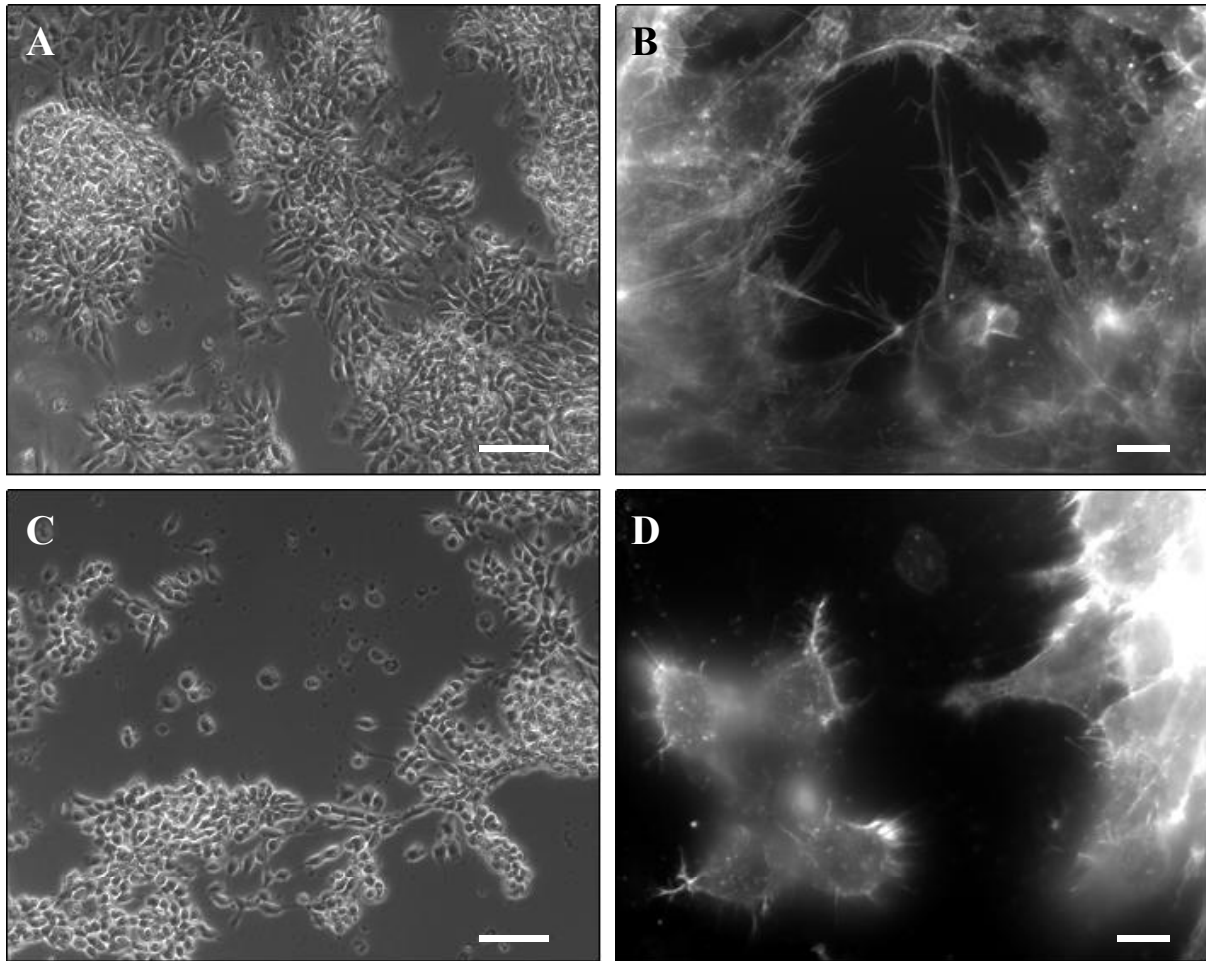


Abbildung 33: Morphologie von neuronalen Vorläuferzellen nach Inkubation mit 20 μM Substanz A bzw. Vehikel. Nach 1-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.

- | | |
|--|----------------------------|
| A. Vehikel, Phasenkontrast | Maßstab: 100 μm |
| B. Vehikel, F-Actin | Maßstab: 20 μm |
| C. 20 μM Substanz A, Phasenkontrast | Maßstab: 100 μm |
| D. 20 μM Substanz A, F-Actin | Maßstab: 20 μm |

Abschließend wurde der Effekt von Substanz A auf C6-Gliom-Zellen untersucht. Diese Zellen der Ratte wurden ausgewählt, da sie als Modell für menschliche Glioblastomzellen angesehen werden können. Die mikroskopische Untersuchung der mit Substanz A behandelten C6-Gliom-Zellen zeigte ebenfalls eine Wirkung auf die Zellform (Abb. 34C, D). Die Färbung des F-Actin-Cytoskeletts machte wieder eine tiefgreifende Umorganisation sichtbar (Abb. 34D). Während mit Vehikel behandelte Zellen wieder eine ausgebreitete fibroblastenähnliche Morphologie mit Lamellipodien aufwiesen (Abb. 34B), erschienen mit 20 μM Substanz A behandelte C6-Gliom-Zellen abgerundet (Abb. 34C) und ihr Actin-Cytoskelett war weitgehend kollabiert (Abb. 34D).

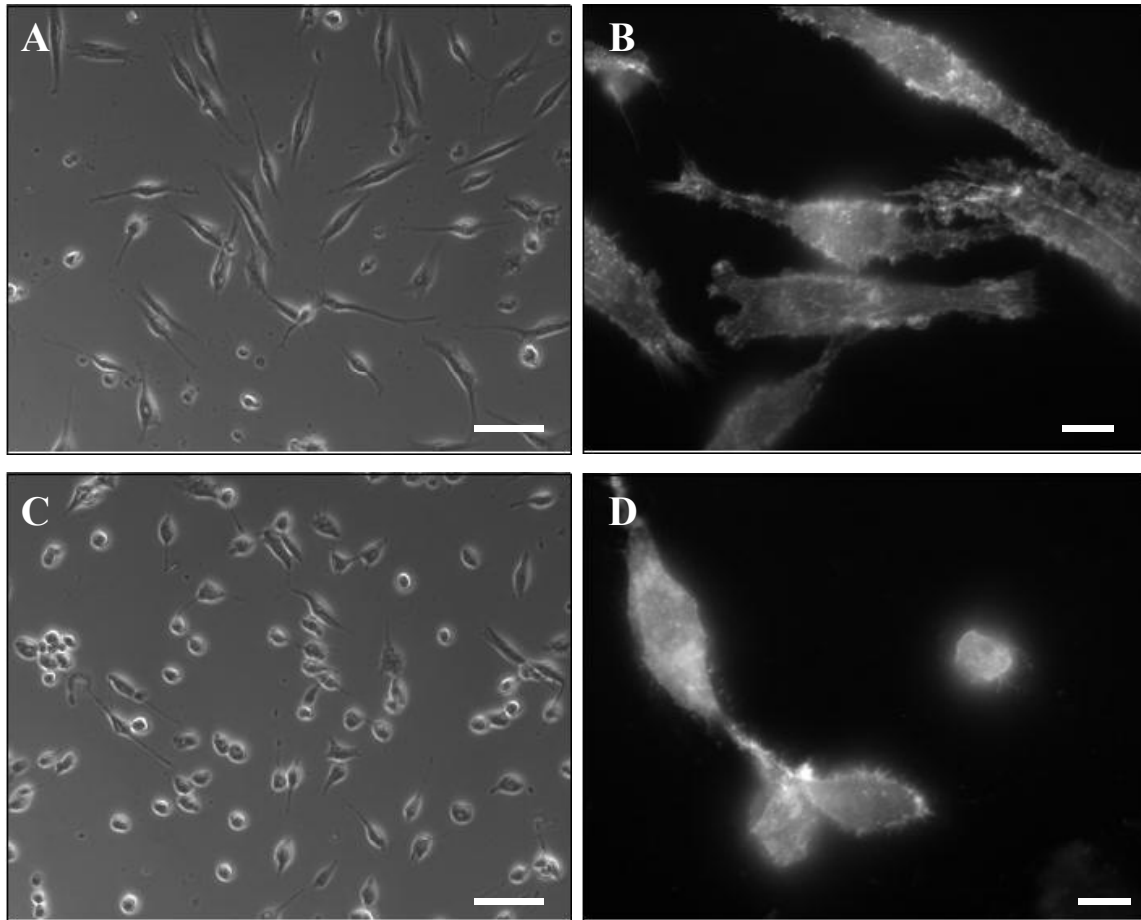


Abbildung 34: Morphologie von C6-Gliom-Zellen der Ratte nach Inkubation mit 20 µM Substanz A bzw. Vehikel. Nach 1-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und mit Phalloidin-TRITC gefärbt.

- | | |
|-------------------------------------|----------------|
| A. Vehikel, Phasenkontrast | Maßstab: 100µm |
| B. Vehikel, F-Actin | Maßstab: 20 µm |
| C. 20 µM Substanz A, Phasenkontrast | Maßstab: 100µm |
| D. 20 µM Substanz A, F-Actin | Maßstab: 20 µm |

5 Diskussion

5.1 Vorteile des etablierten Migrationstests

In dieser Arbeit wurde ein allgemeiner methodischer Ansatz zur schnellen Quantifizierung der Migration von Zellpopulationen entwickelt und angewendet. Die Methode basiert auf der Idee, die Migration der Zellen durch die kumulative Zunahme der von den Zellen im Lauf der Zeit gebildeten Migrationspfade zu repräsentieren. Auf dem Niveau einzelner Zellen ist die Analyse von Flächenveränderungen aufgrund von Protrusion und Retraktion eine gut etablierte Methode, um die Zellbewegungen quantitativ zu messen (*Weiss and Garber 1952*), wenn präzise Informationen über die Zellfläche zum Beispiel auf der Basis mikrointerferometrischer Techniken (*Dunn and Zicha 1995*) gewonnen werden können. Hier wurde dieser Ansatz auf die Analyse der Motilität von B35 Neuroblastomzell-Populationen, die GFP transient exprimieren, übertragen. Diese neuronale Zelllinie wurde früher in Transwell-Assays als Modell benutzt, um die Migration von neuronalen Vorläuferzellen (*Thelen et al. 2002*) zu untersuchen.

Zur Messung von Flächen, die von migrierenden Zellen überdeckt wurden, wurde eine stringente Schwellenwert-Prozedur verwendet. Weil die Fluoreszenz innerhalb dünner Protrusionen in der hier benutzten Übersichtsvergrößerung schwach war und zum Teil unterhalb des Schwellenwerts lag, der notwendig war, um jeglichen Hintergrund auszuschließen (Abb. 2A, B, C), wurde die wirklich von Zellen überdeckte Gesamtfläche eher zu gering veranschlagt. Dies beinhaltet, dass die bei dem Assay gemessenen Flächenänderungen hauptsächlich die Bewegungen der Zellkörper wiedergeben. Die migrationsbedingt sukzessive bedeckte Fläche (Abb. 2D) nahm ungefähr linear mit der Zeit zu (Abb. 2E). Daraus schließen wir, dass die Richtungspersistenz bei der Migration von B35 Neuroblastomzellen gleich oder größer ist als die Dauer des Experiments (6 Stunden). Daher beschreibt ein einfacher relativer Migrations-Index, der als RDI definiert wird, die Migration dieser Zell-Populationen quantitativ. Die Hemmung der Actin-Polymerisation mit Cytochalasin B führte zu einer Reduktion der Zellmigration (Abb. 4) mit einer klaren Dosis-Wirkungs-Beziehung (Abb. 5). Eine Extraktion von Cholesterin mit Methyl- β -Cyclodextrin reduzierte die Zellmigration (Abb. 6) ebenfalls deutlich. Diese Behandlung beeinflusst die Zell-Polarisation, weil eine Sortierung cholesterinreicher Microdomänen der Plasmamembran notwendig ist, um die Membran-Organisationen am „leading edge“ aufzubauen und zu

erhalten, wie z.B. bei Adenokarzinom-Zellen (*Manes et al. 1999*) und an T-Zellen (*Gomez-Mouton et al. 2001*) gezeigt wurde. Unsere Beobachtung zeigte, dass cholesterinreiche Mikrodomänen auch für eine gerichtete Migration von B35 Neuroblastomzellen notwendig sind.

Vor allem nach einer Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin, aber auch mit Cytochalasin B, zeigten die Migrations-Kurven in einigen Fällen eine deutlich nichtlineare Zunahme mit einer konvexen Kurvenkrümmung (Abb. 4E, 6E). Unter der Annahme, dass diese Krümmung dadurch bedingt war, dass die Zellen in zufälliger Weise ihre Migrationsrichtung änderten und daher die Migrationspfade sich selbst überlappen würden, konnte nach Ergänzung der Modellfunktion um einen Wurzelterm: $[y = a*t + \text{sqrt}(b*t)]$ eine gute Kurvenanpassung erreicht werden. Im Extremfall einer rein zufälligen Migration ($a = 0$) stellt diese Funktion die wohlbekannte Formel für das mittlere Verschiebungsquadrat der Brownschen Bewegung dar. Daher kann diese Funktion als gewichtete Summe einer linearen und einer zufälligen Komponente interpretiert werden. Auch für die Migration unbehandelter Zellen wurde bei Verwendung dieser Modell-Funktion eine verbesserte Kurvenanpassung im Vergleich zur linearen Regression erhalten (Abb. 8B, 8C). Hierbei war die Rate der gerichteten Migration aber größer als die der zufälligen Migration.

Unsere Methode konnte als Makro im frei verfügbaren Software-Paket Image J programmiert werden. Die mathematische Kurvenanpassung wurde mit dem Programm Origin 6.1 vorgenommen. Die Einfachheit der Anwendung ermöglichte eine automatische und schnelle Auswertung von einhundert und mehr Bild-Sequenzen. Die hohe Geschwindigkeit der Auswertung war möglich, weil für unseren Algorithmus keine Erkennung von individuellen Zellen als separate Einheiten nötig war. Daher kann diese Methode auch für Analysen von Bildern angewendet werden, die eine große Anzahl von Zellen zeigen. Darüber hinaus ist dieser Test vorteilhaft bei der Untersuchung einer großen Anzahl von verschiedenen Bedingungen, wie es beispielsweise in Screening-Versuchen der Fall ist oder bei der Untersuchung von Dosis-Wirkungskurven (siehe oben).

Weil der relative Migrations-Index die Motilität von bis zu 40 Zellen pro Bildserie repräsentiert, ist der von solchen Plots abgeleitete normalisierte Index ein relativ zuverlässiges statistisches Maß für die durchschnittliche Migration der Zellpopulationen. Ähnlich wie beim Transwell-Assay gibt unsere Methode keine Auskunft über die Verteilung von unterschiedlichen Migrationstypen und -geschwindigkeiten innerhalb der Zellpopulation. Eine solche Analyse war aber nicht unsere ursprüngliche Intention, weil exakte Zellpfad-

Algorithmen für einzelne Zellen vorhanden sind (z.B. Mtrack 2). Solche Programme benötigen jedoch mehr Rechenzeit und der Output ist eine lange Liste von Ziffern zur Beschreibung der einzelnen Zellpfade. Aus diesen Werten lassen sich Mittelwert und Varianz der Zellmigration berechnen. Demgegenüber hat die hier entwickelte Methode den Vorteil, dass eine einzige Zahl ermittelt wird, welche die Migration der gesamten Zellpopulation qualifiziert. Mit dieser Zahl als Kriterium ist es möglich, schnell eine große Anzahl von unterschiedlichen Bedingungen zu screenen und zu kategorisieren. Im Gegensatz zum Transwell-Assay können die gleichen Rohdaten, z.B. Bildserien, mittels elaborierteren und zeitaufwendigeren Methoden direkt für eine sekundäre Evaluation verwendet werden, nachdem eine globale Veränderung der Zellmigration durch unsere Methode festgestellt wurde. Insgesamt ist die Kalkulation der zeitabhängigen Migration von Zellpopulationen eine vielseitige Methode, um quantitative Informationen über die Zellmigration zu erhalten.

5.2 CRMP-4 und Zellmigration

In den Experimenten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das actinbündelnde Protein CRMP-4 ein negativer Regulator der Zellmigration ist. Deshalb soll im Folgenden zusammengefasst werden, was über die Bedeutung anderer, schon seit längerer Zeit untersuchter actinbündelnder Proteine für die Zellmigration bekannt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dann in diesem Zusammenhang interpretiert werden.

Die actinbündelnden Proteine stellen eine heterogene Untergruppe cytosolischer Polypeptide dar, die alle in der Lage sind, Actin-Filamente quervernetzen. Die Abbildung 35 gibt einen Überblick über die modularen Strukturen von Hauptvertretern dieser Proteinklasse (*Revenu et al. 2004*). Alle diese Proteine besitzen actinbindende Domänen (ABD; hervorgehoben), die sich aber in ihrer Struktur unterscheiden können. Actinbindende Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung sogenannter „core bundles“ in den Mikrovilli wie sie beispielsweise im Epithel des Darmes, der Nierentubuli und in der Placenta vorkommen (*Glenny et al. 1980; Mooseker et al. 1980; Matsudaira and Burgess 1982; Coluccio and Bretscher 1989*). Es ist bekannt, dass diese Proteine die Dynamik des Actin-Cytoskeletts dadurch beeinflussen, dass sie die Actin-Polymerisierung und die räumliche Anordnung der Protofilamente verändern.

Ein Beispiel für ein quervernetzendes Protein ist Filamin (Abb. 35; Tab. 2), aber die Filamine sind keine actinbündelnden Proteine. Sie finden sich entsprechend nicht in Filopodien oder Mikrovilli, sondern in Lamellipodien. Filamin A ist notwendig für die Zellmigration z.B. in einem Wundheilungs-Test (*Flanagan et al. 2001*) und die Bindung von Filamin an Integrine kann die Zellmigration hemmen (*Calderwood et al. 2001*). Eine Mutation im humanen Filamin A ist eine Ursache der periventriculären nodulären Heterotopie, einer neuronalen Migrationsstörung (*Nagano et al. 2002*).

Villin, Fimbrin, Fascin und Actinin sind actinbündelnde Proteine. Villin-Überexpression induzierte die Bildung von Mikrovilli in fibroblastenartigen CV1-Zellen (*Friederich et al. 1992*). Dazu passend war in Antisense-RNA-Experimenten mit humanen intestinalen CaCo2-Zellen die Bürstensaumbildung drastisch beeinträchtigt (*Costa de Beauregard et al. 1995*). Diese Resultate belegen eine strukturelle Bedeutung des Villins bei der Bürstensaumbildung. Darüber hinaus wurde ein fördernder Einfluss von Villin auf die Zellmigration gezeigt (*Athman et al. 2003; Tomar et al. 2004*).

Fimbrin ist ein actinbündelndes Protein, das zwei Tandem-ABDs ohne Spacer enthält. L-Fimbrin findet sich z.B. in Makrophagen in Membrane „ruffles“, Microspikes, und an Zelladhäsionskontakten wie zum Beispiel Podosomen, die an der Zellmigration beteiligt sind (*Marchisio et al. 1987; de Arruda et al. 1990; Messier et al. 1993*).

Fascine sind actinbündelnde globuläre Proteine. Sie sind an der Bildung von Zellprotrusionen und von cytoplasmatischen Actin-Bündeln beteiligt. Fascin steigert die Zellmigration (*Yamashiro et al. 1998*), und in Colon-Epithelzellen führt die de-novo-Expression von Fascin zu einem motilen Phänotyp (*Adams 2004*). Untersuchungen an Karzinomen zeigen, dass Fascin während der Tumorprogression an der Ausprägung eines invasiven Phänotyps beteiligt ist. Fascin könnte als prognostischer Marker zur frühen Identifikation aggressiver Tumore geeignet sein (*Hashimoto et al. 2004*).

Abbildung 35: Molekülstrukturen actinquervertzender Proteine (Revenu et al. 2004).

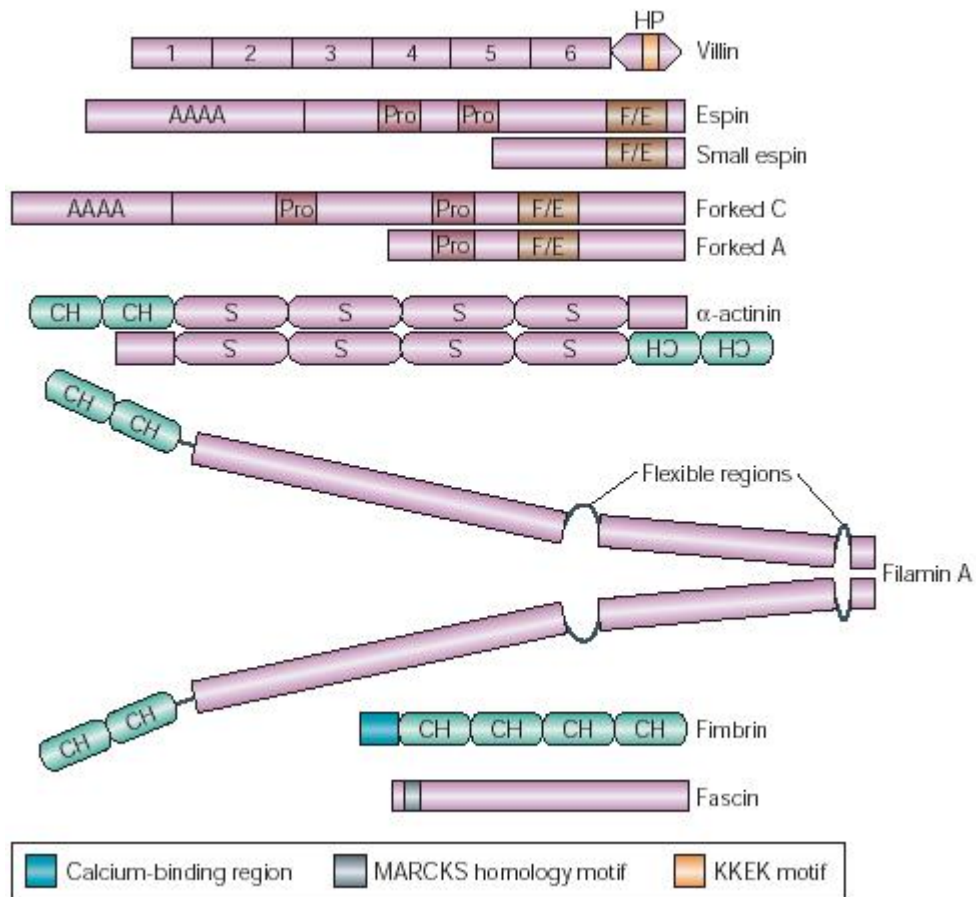


Tabelle 2 Actinquervertzende und -bündelnde Proteine.

Protein Familie	Domänen Struktur (Siehe Abb.35)	Struktur MW; Di-/Oligomerisierung	Isoformen (Vorkommen)	K _D	Effekte auf die Zellmigration
A. Actinquervertzende Proteine					
Filamin	4x Calponin-Homologie (CH)	2x280 kDa Dimer	Filamin-A (Muskel) (<i>Gariboldi et al. 1994</i>) Filamin-B (Muskel und Herz) (<i>Gariboldi et al. 1994</i>) Filamin-C (Muskel)	Nicht bekannt	+ M2 Zellen; Wundheilungs-Test (<i>Flanagan et al. 2001</i>) + CHO Zellen; Transwell-Assay (<i>Calderwood et al. 2001</i>)
B. Actinbündelnde Proteine					
Villin	6x Modules; Headpiece (HP)	92,5 kDa Monomer	(absorbierende Epithelien des Darmes und der Niere) (<i>Bretscher and Weber 1979</i>); (<i>Matsudaira and Burgess 1979</i>); (<i>Robine et al. 1985</i>).	1,4 µM (<i>Burgess et al. 1987</i>)	+ MDCK Zellen; Wundheilungs-Test (<i>Athman et al. 2003</i>) HeLa; Wundheilungs-Test (<i>Tomar et al. 2004</i>)
Espin	Ankyrin-Repeats (AAAA) Prolin-reiche Regionen (Pro) Forked/Espin Homologie (F/E)	110 kDa Monomer	Small Espin (<i>Bartles et al. 1998</i>) SC Espin (<i>Bartles et al. 1996</i>)	70 nM (<i>Chen et al. 1999</i>)	Nicht bekannt
Fimbrin	4x Calponin-Homologie (CH); 1x MARCK	68 kDa Monomer	I-Fimbrin (Bürstensaum des intestinalen und renalen Epithels) T-Fimbrin (solide Gewebe) L-Fimbrin (hämatopoetisches System)	100 nM (<i>Ohsawa et al. 2004</i>)	Nicht bekannt
Fascin	MARCKS-Homologie Motiv	55 kDa Monomer	Fascin-1 (mesenchymale Gewebe, Nervensystem) Fascin-2 (Photorezeptoren) Fascin-3 (Testes)	140 nM (<i>Ono et al. 1997</i>)	+ LLC-PK1 Zellen; Transwell-Assay (<i>Yamashiro et al. 1998</i>) + C2C12 Zellen (<i>Adams and Schwartz 2000</i>)
MIM	WASP Homologie 2 Motiv; N-terminale α-helikale (<i>Lee et al. 2002b</i>)	37 kDa Monomer	MIM (<i>Lee et al. 2002b</i>) MIM-B (<i>Woodings et al. 2003</i>) (Basalzellkarzinomzellen, Blasenkarzinomzellen) (<i>Callahan et al. 2004</i>)	0,5 µM (<i>Gonzalez-Quevedo et al. 2005</i>)	(-) MIM fehlt in einer metastasierenden Blasen-CA-Zelllinie (<i>Lee et al. 2002b</i>)
Actinine	2x Calponin-Homologie (CH); 4x Spectrin-Repeats(S)	2x100 kDa Dimer	Actinin-1 (fokale und adhäsive Kontakte) Actinin-2 Actinin-3 Actinin-4 (stark konzentriert am „leading edge“ der motilen Zellen) (<i>Honda et al. 2005</i>)	0,6-4,7 µM (<i>Wachsstock et al. 1993</i>)	- Actinin-1; 3T3 Zellen; Wundheilungs-Test; phagokinetic Tracks (<i>Gluck and Ben-Ze'ev 1994</i>) - Actinin-4; hoch maligne Neuroblastoma-Stammzellen [BE(2)-C] (<i>Nikolopoulos et al. 2000</i>) + Actinin4; DLD1 Zellen; Wundheilungs-Test (<i>Honda et al. 2005</i>) - Nach Expression von Actinin-4 Mutante Verlust der Tumor Zellmigration (<i>Menez et al. 2004</i>)

Interessanterweise begünstigen actinbündelnde Proteine nicht generell die Zellmotilität. So wurde MIM (Missing in Metastasis) als neues actinbündelndes Genprodukt identifiziert, welches invasives Wachstum und die Metastasierung von Tumoren beeinflusst (*Lee et al. 2002b*). Der Verlust von MIM in invasiven Karzinomen macht einen hemmenden Einfluß dieses Proteins auf die Zellmigration *in vivo* wahrscheinlich. Dies wurde bislang aber noch nicht *in vitro* untersucht.

Eine inhibitorische Wirkung auf die Zellmigration wurde auch für das Actinin-1 gezeigt (*Gluck and Ben-Ze'ev 1994*). Actinin-1 findet sich an fokalen Kontakten und adhärenen Zellkontakten. Überexpression von Actinin-1 reduzierte die Zellmotilität von 3T3 Fibroblasten um ca. 50% und die Reduktion der Actinin-1-Expression auf ein Niveau von 25-60% nach Transfektion eines Antisense-Actinin-1 Plasmids steigerte die Zellmigration etwa um 30% (*Gluck and Ben-Ze'ev 1994*). Nach der Injektion Actinin-1-defizienter 3T3 Zellen in Nacktmäuse kam es zur vermehrten Tumorbildung. Jüngere Studien zeigen, dass Actinin-1 eine Bedeutung für die Auflösung von fokalen Kontakten besitzt, wie sie zum Beispiel nach einer Aktivierung von Calpain erfolgt (*Bhatt et al. 2002; Otey and Carpen 2004*).

Auf der anderen Seite besitzt Actinin-4 in einigen Zelltypen einen ausgeprägten fördernden Einfluß auf die Zellmigration. Die Aminosäuresequenz des Actinin-4 ist zu 86% identisch mit der von Actinin-1, es besitzt aber eine andere Verteilung als Actinin-1 innerhalb der Zellen. Es befindet sich am „leading edge“ migrierender Zellen und in Membrane „ruffles“ von Makrophagen stark angereichert. Das Expressionsniveau von Actinin-4 ist in motilen Zellen erhöht und der Nachweis von cytoplasmatischem Actinin-4 in Brustkrebs-Zellen ist eng korreliert mit einem invasiven Phänotyp und einer schlechten Prognose (*Honda et al. 2005*). Ähnliche Beobachtungen wurden für das kleinzellige Bronchialkarzinome gemacht (*Yamagata et al. 2003*). Andererseits korreliert bei Neuroblastomzellen ein Verlust von Actinin-4 mit gesteigerter Invasivität (*Nikolopoulos et al. 2000*).

Vor kurzem wurde CRMP-4 als actinbindendes wie auch bündelndes Protein identifiziert (Rosslbroich, Dissertation; Rosslbroich et al. eingereicht). In B35 Neuroblastomzellen kolokalisiert CRMP-4 mit bündelartigen Actin-Strukturen innerhalb von Lamellipodien. In migrierenden Zellen fand sich ein GFP-CRMP-4-Fusionsprotein angereichert am „leading edge“ und zum Teil in Bündel-Strukturen, die sich unter einer Behandlung mit Latrunculin A schnell auflösten (Rosslbroich et al, eingereicht). Rekombinantes CRMP-4 bildet

Oligomere, die *in vitro* an F-Actin binden und dieses in Bündeln organisiert. Die aus Bündelungs-Tests errechnete K_D beträgt 730 nM (Rosslenbroich et al, eingereicht). Dies liegt in der Größenordnung der Konzentration von CRMP-4 im Cytosol, die mit Hilfe von quantitativen Westernblots als 1,7 μ M bestimmt wurde (Abb. 12). Die Überexpression von CRMP-4 führte zu einer leichten, aber signifikanten Hemmung der Migration von B35 Neuroblastomzellen (Abb. 15), während ein siRNA-vermittelter „Knockdown“ zu einer Steigerung der Zellmigration führte (Abb. 20). Morphologisch war nach dem CRMP-4 „Knockdown“ eine ungeordnete F-Actin-Struktur in Lamellipodien auffällig (Abb.17). Somit ist CRMP-4 ein actinbündelndes Protein, das die Zellmigration negativ reguliert. Es handelt sich beim CRMP-4 um das erste Protein dieser Familie, für das eine direkte Interaktion mit F-Actin gezeigt wurde. Für andere CRMPs wurde eine Kollokalisierung mit F-Actin in immunocytochemischen Studien gezeigt (Minturn et al. 1995; Yuasa-Kawada et al. 2003). Darüber hinaus haben Hotta et al. (2005) nachgewiesen, dass CRMP-5/CRAM an der Bildung von Filopodien beteiligt ist. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit ergaben keinen Anhalt für eine Regulation von Filopodien durch CRMP-4. Die ausgeprägteste Kollokalisierung von CRMP-4 mit F-Actin-Bündeln wurde auch nicht in Filopodien, sondern innerhalb von Lamellipodien beobachtet. Der molekulare Mechanismus der Migrationshemmung durch CRMP-4 ist bislang noch nicht geklärt. In den meisten Fällen sind actinbündelnde Proteine positive Regulatoren der Zellmigration, wie zum Beispiel das Fascin (siehe Tab. 2). Auf der anderen Seite sind aber MIM und Actinin-1 als negative Regulatoren der Migration bekannt. Der Verlust der Expression dieser Proteine korreliert mit der Entwicklung eines invasiven Phänotyps in Tumorzellen. Eine ähnliche die Metastasierung unterdrückende Wirkung wurde auch den CRMP-1 zugeordnet (Shih et al. 2003). Im Fall des Actinin-1 könnte eine Erklärung für seine migrationshemmende Wirkung darin liegen, dass dieses Protein an der Destabilisierung von fokalen Adhäsionen beteiligt ist (Otey and Carpen 2004), denn es ist bekannt, dass die Zelladhäsion eine wichtige Voraussetzung der Migration ist. Auf der anderen Seite sind für die CRMPs eine Reihe weiterer cytosolischer Interaktionspartner beschrieben, über die CRMPs indirekt auf die Zellmigration Einfluss nehmen könnten. So wurde gezeigt, dass die CRMPs an Tubulin-Dimere binden und die Bildung von Mikrotubuli fördern (Fukata et al. 2002). Da die Koordination des Actin- und des Tubulin-Cytoskeletts eine wichtige Voraussetzung für die Polarisierung und die Zellmigration darstellt (Zhou and Cohan 2004), könnte hier eine Ursache der beobachteten Effekte zu suchen sein. Die sehr schnelle Umverteilung von GFP-CRMP-4 in lebenden Zellen zeigt, dass die Interaktion von CRMP-4 mit dem Actin-Cytoskelett wahrscheinlich rapide

reguliert wird. Ein möglicher Mechanismus, durch den dies geschehen könnte, ist die Protein-Phosphorylierung. Es wurde gezeigt, dass CRMP-4 während der durch NGF ausgelösten Differenzierung von PC12-Zellen phosphoryliert wird (*Byk et al. 1996*). CRMPs sind Substrate für eine Reihe von Kinasen. So phosphoryliert die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Fes CRMP-2 und CRMP-5 (*Mitsui et al. 2002*). CRMP-1 und CRMP-2 sind Substrate der Rho-Kinase (*Arimura et al. 2000; Leung et al. 2002*), und CRMP-2 und CRMP-4 werden von der GSK-3 β umgesetzt (*Cole et al. 2004*). Die Phosphorylierung könnte die Affinität von CRMP-4 zu F-Actin herabsetzen. In diese Richtung weisen unveröffentlichte Ergebnisse, die mit Hemmstoffen von Ser/Thr Phosphatasen (Okada-Säure) und Tyrosin-Phosphatasen (Phenylarsin-Oxid) erzielt wurden. In beiden Fällen wurde die Kollokalisierung mit dem F-Actin aufgehoben und es trat anschließend ein Kollaps des F-Actin-Cytoskeletts ein (persönliche Mitteilung, V. Rosslenbroich). CRMPs sind an der Signaltransduktion nach Stimulation von neuronalen Zellen mit Semaphorin 3A/Collapsin beteiligt. Dieses extrazelluläre Protein steuert die axonale Wegfindung, indem es auf Wachstumskegel Einfluss nimmt. Im Gegensatz zur Migration von Fibroblasten ist der Arp2/3-Komplex ein negativer Regulator der Motilität von Wachstumskegeln (*Strasser et al. 2004*), die Bündelung von F-Actin ist für die neuronale Navigation unverzichtbar (*Zhou and Cohan 2004*). Unsere Beobachtungen zeigen, dass CRMP-4 ein wichtiger Regulator der Actin-Bündelung ist. Diese Funktion könnte für die Kontrolle der neuronalen Navigation durch Collapsin bedeutsam sein.

5.3 Suche nach migrationshemmenden Substanzen

Die gesteigerte Zellmigration ist ein entscheidendes Element des invasiven Wachstums von Tumoren. Das invasive Wachstum und die Metastasierung von Tumoren sind lebensbedrohliche Komplikationen von Krebserkrankungen. Da es nur in wenigen Fällen gelingt, einen Tumor vor dem Stadium der Invasion zu entfernen, liegt in der Behandlung metastasierter Karzinome eine wichtige therapeutische Herausforderung. Durch eine lokale Therapie allein ist in diesen Fällen eine Heilung der Patienten nicht mehr möglich. Daher ist die Hemmung des invasiven Tumorwachstums von großer Bedeutung. Die biochemischen und zellbiologischen Mechanismen, die dem invasiven Wachstum zugrunde liegen, sind bei unterschiedlichen Tumoren ähnlich. Daher stellen diese Mechanismen logische Angriffspunkte der antiinvasiven Tumorthherapie dar. Solche Strategien können bei Personen

mit hohem Erkrankungsrisiko präventiv eingesetzt werden. Andererseits besitzen sie einen möglichen Wert als adjuvante Therapie oder Erhaltungstherapie (*Holland Frei, 2003*).

Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über Substanzen mit antiinvasiver Wirkung. Als mögliche Angriffspunkte der antiinvasiven Therapie kommen infrage:

- (i) Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren
- (ii) Zelladhäsion
- (iii) Zellmigration
- (iv) Proteasen
- (v) Signaltransduktionskaskaden und „second messenger“ (z.B. Proteinkinasen, Calcium)

Tabelle 3 Anti-Metastatische Therapie: Angriffspunkte und Substanzen (Holland Frei, 2003).

A. Antiinvasive Strategien		
Angriffspunkt	Beispiele	Effekte
Wachstums-Faktoren	C225 (anti-EGFR)	Block von EGFR Signaling, Proliferation, invasiven Wachstum
	EGFR Tyrphostins (RTK Inhibitors wie: ZD1839, OSI-774)	
	Anti-VEGF	Block von VEGFR Signaling, vasculärer Proliferation, Invasion
	VEGFR Tyrphostins (z.B. SU5416)	
	Kombination RTK Tyrphostins (z.B. SU6668, FGF/VEGF/PDGF)	Block von FGF/VEGF/PDGF RTK Signaling, vasculärer und stromaler Proliferation und Invasion
Zell-Adhäsion	Anti- $\alpha\beta3$ (Vitaxin) $\alpha\beta3$ peptidomimetics	Blockt Endothelial Zell-Interaction mit ECM
Proteolysis	MMPis	Block von Matrix-Degradation
	uPAR-I	
Motilität	Taxane	Blockade von Mikrotubuli
Signal-Inhibitoren	Siehe B.	Blockade von Signalen für Angiogenesis, Invasion, und Metastasis

B. Signal Inhibitoren		
Substanz	Angriffspunkt	Aktivität
CAI	Calcium Einstrom hemmt	Hemmt Adhäsion, Motilität, Angiogenesis
Squalamine	Hemmt NHE-3 Na Austausch	Anti-Angiogen
LY294002 und Analoge	PI3 kinase Inhibitor	Hemmt Motilität, Proliferation, Überleben
MAPK Inhibitoren	MAPK Signaling	Hemmt Invasion, Proliferation

CAI= Carboxamidotriazol wurde 1992 bei einem Screening nach migrationshemmenden Substanzen entdeckt. Es handelt sich um ein kleines Molekül, das die Calcium-Freisetzung hemmt (Kohn *et al.* 1992). CAI führte bei etwa der Hälfte der behandelten Karzinom-Patienten zur Stabilisierung der Erkrankung (Kohn *et al.* 1997). Vor dem Hintergrund dieser Erfahrungen wurde der in dieser Arbeit entwickelte Migrationstest dazu eingesetzt, nach anderen migrationshemmenden Substanzen zu suchen. In einem klein angelegten Screening haben wir eine Substanz entdeckt, die eine stark hemmende Wirkung auf die Migration von Neuroblastomzellen besaß (Substanz A). Bei der Anwendung auf diese Zellen in Gegenwart

von 10% FCS beobachteten wir eine halbmaximale Wirksamkeit bei einer Konzentration von ca. 20 μ M (Abb. 24). Die Hemmung der Zellmigration korrelierte mit einer drastischen Formveränderung des Actin-Cytoskeletts der Zellen im Sinne eines Cytoskelett-Kollaps (Abb. 25). Gleichzeitig wurde die Adhäsion der Neuroblastomzellen auf einem Plastik-Substrat gehemmt (Abb. 26). Andererseits fand sich an diesen Zellen kein Hinweis auf eine Steigerung der Apoptose durch 20 μ M Substanz A (Abb. 27).

Ähnliche Wirkungen auf die Migration und das Cytoskelett waren an glialen Vorläuferzellen zu beobachten (Abb. 32). Diese Zellen wurden in einem chemisch definierten Medium ohne fetales Kälberserum (FCS) gehalten. Hierbei lag die halbmaximale Wirksamkeit der Substanz A bei ca. 3 μ M (Abb. 31). Dies deutet darauf hin, dass es zu einer die Wirksamkeit reduzierenden Bindung der Substanz A an Serumproteine kommen könnte. Auch an neuronalen Vorläuferzellen und C6-Gliom-Zellen haben wir ähnliche Formveränderungen und einen Kollaps des Actin-Cytoskeletts in Gegenwart von 20 μ M Substanz A beobachtet (Abb. 33, 34). Differenzierte cerebelläre Körnerzellen zeigten hingegen keine wesentliche Formveränderung nach einer entsprechenden Behandlung (J. Kappler und K. Schilling, persönliche Mitteilung). Zusammenfassend besaß Substanz A eine starke Wirkung auf die Organisation des Actin-Cytoskeletts und/oder die Migration von undifferenzierten Vorläufer- und Tumorzellen. Diese Wirkung könnte teilweise auf eine Hemmung der Zelladhäsion zurückzuführen sein. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Substanz auch auf andere Tumorzellen ähnliche Wirkung hat und welche molekularen Mechanismen den beobachteten Effekte zugrunde liegen.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen eine Reihe von Fragen/Problemen auf, die in der Zukunft untersucht werden können.

1. Kann der Migrationstest weiter verfeinert werden, so dass Informationen über die Verteilung der Migrationsgeschwindigkeiten innerhalb von Zellpopulation abgeleitet werden können?
2. Die actinbindende Domäne von CRMP-4 ist strukturell und funktionell weiter zu charakterisieren.
3. Der molekulare Mechanismus der Actin-Bündelung ist aufzuklären.
4. Welche weiteren Interaktionen von CRMP-4 mit cytosolischen Proteinen sind an seiner Funktion als negativer Regulator der Zellmigration beteiligt?
5. Auf welche Weise wird die Interaktion von CRMP-4 mit Mikrofilamenten in Zellen reguliert? Welche Bedeutung hat die Phosphorylierung z.B. durch GSK-3 β für die Interaktion von CRMP-4 mit F-Actin? Auf welche Weise wirken extrazelluläre Faktoren, die den Kollaps des Actin-Cytoskeletts auslösen, auf die Interaktion zwischen CRMP-4 und Mikrofilamenten ein?
6. Welche Rezeptoren und Signaltransduktionsprozesse vermitteln die Wirkung von Substanz A auf das Actin-Cytoskelett? Sind hierbei dieselben Moleküle beteiligt wie bei der Reaktion auf Collapsin/Semaphorin 3A?

6 Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. (2004). "Roles of fascin in cell adhesion and motility." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 590-6.
- Adams, J. C. and M. A. Schwartz (2000). "Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42." J Cell Biol **150**(4): 807-22.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Rafe M, Roberts K, Walter P (1999). "Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie", 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Albrecht-Buehler, G. (1977). "The phagokinetic tracks of 3T3 cells." Cell **11**(2): 395-404.
- Allen, W. E., D. Zicha, et al. (1998). "A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis." J Cell Biol **141**(5): 1147-57.
- Amann, K. J. and T. D. Pollard (2001). "The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments." Nat Cell Biol **3**(3): 306-10.
- Arimura, N., N. Inagaki, et al. (2000). "Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse." J Biol Chem **275**(31): 23973-80.
- Athman, R., D. Louvard, et al. (2003). "Villin enhances hepatocyte growth factor-induced actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells." Mol Biol Cell **14**(11): 4641-53.
- Bartles, J. R. (2000). "Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 72-8.
- Bartles, J. R., A. Wierda, et al. (1996). "Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the F-actin-rich junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations." J Cell Sci **109** (Pt 6): 1229-39.
- Bartles, J. R., L. Zheng, et al. (1998). "Small espin: a third actin-bundling protein and potential forked protein ortholog in brush border microvilli." J Cell Biol **143**(1): 107-19.
- Bhatt, A., I. Kaverina, et al. (2002). "Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain." J Cell Sci **115**(Pt 17): 3415-25.
- Blanchoin, L., K. J. Amann, et al. (2000). "Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins." Nature **404**(6781): 1007-11.
- Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-66.
- Bretscher, A. and K. Weber (1979). "Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2321-5.

- Burgess, D. R., K. O. Broschat, et al. (1987). "Tropomyosin distinguishes between the two actin-binding sites of villin and affects actin-binding properties of other brush border proteins." J Cell Biol **104**(1): 29-40.
- Byk, T., T. Dobransky, et al. (1996). "Identification and molecular characterization of Unc-33-like phosphoprotein (Ulip), a putative mammalian homolog of the axonal guidance-associated unc-33 gene product." J Neurosci **16**(2): 688-701.
- Byk, T., S. Ozon, et al. (1998). "The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties." Eur J Biochem **254**(1): 14-24.
- Calderwood, D. A., A. Huttenlocher, et al. (2001). "Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration." Nat Cell Biol **3**(12): 1060-8.
- Callahan, C. A., T. Ofstad, et al. (2004). "MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription." Genes Dev **18**(22): 2724-9.
- Chen, B., A. Li, et al. (1999). "Espin contains an additional actin-binding site in its N terminus and is a major actin-bundling protein of the Sertoli cell-spermatid ectoplasmic specialization junctional plaque." Mol Biol Cell **10**(12): 4327-39.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." J Cell Biol **133**(6): 1403-15.
- Cole, A. R., A. Knebel, et al. (2004). "GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons." J Biol Chem **279**(48): 50176-80.
- Coluccio, L. M. and A. Bretscher (1989). "Reassociation of microvillar core proteins: making a microvillar core in vitro." J Cell Biol **108**(2): 495-502.
- Cooper, J. A. (1987). "Effects of cytochalasin and phalloidin on actin." J Cell Biol **105**(4): 1473-8.
- Cory, G. O., R. Garg, et al. (2002). "Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein." J Biol Chem **277**(47): 45115-21.
- Costa de Beauregard, M. A., E. Pringault, et al. (1995). "Suppression of villin expression by antisense RNA impairs brush border assembly in polarized epithelial intestinal cells." Embo J **14**(3): 409-21.
- Cutler, J. E. and J. J. Munoz (1974). "A simple in vitro method for studies on chemotaxis." Proc Soc Exp Biol Med **147**(2): 471-4.
- Daub, H., K. Gevaert, et al. (2001). "Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16." J Biol Chem **276**(3): 1677-80.
- de Arruda, M. V., S. Watson, et al. (1990). "Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins." J Cell Biol **111**(3): 1069-79.

- Deo, R. C., E. F. Schmidt, et al. (2004). "Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling." Embo J **23**(1): 9-22.
- Dunn, G. A. and D. Zicha (1995). "Dynamics of fibroblast spreading." J Cell Sci **108 (Pt 3)**: 1239-49.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta." Cell **106**(4): 489-98.
- Flanagan, L. A., J. Chou, et al. (2001). "Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells." J Cell Biol **155**(4): 511-7.
- Friederich, E., K. Vancompernelle, et al. (1992). "An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin." Cell **70**(1): 81-92.
- Friedl, P., E. B. Brocker, et al. (1998). "Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells." Cell Adhes Commun **6**(2-3): 225-36.
- Fukata, Y., T. J. Itoh, et al. (2002). "CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly." Nat Cell Biol **4**(8): 583-91.
- Gariboldi, M., E. Maestrini, et al. (1994). "Comparative Mapping of the Actin-Binding Protein 280 Genes in Human and Mouse." Genomics **21**(2): 428-430.
- Glenney, J. R., Jr., A. Bretscher, et al. (1980). "Calcium control of the intestinal microvillus cytoskeleton: its implications for the regulation of microfilament organizations." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6458-62.
- Gluck, U. and A. Ben-Ze'ev (1994). "Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells." J Cell Sci **107 (Pt 7)**: 1773-82.
- Gomez-Mouton, C., J. L. Abad, et al. (2001). "Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9642-7.
- Gonzalez-Quevedo, R., M. Shoffer, et al. (2005). "Receptor tyrosine phosphatase-dependent cytoskeletal remodeling by the hedgehog-responsive gene MIM/BEG4." J Cell Biol **168**(3): 453-63.
- Hall, C., M. Brown, et al. (2001). "Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase." J Biol Chem **276**(46): 43482-6.
- Hamajima, N., K. Matsuda, et al. (1996). "A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution." Gene **180**(1-2): 157-63.
- Hanahan D. (1985): Techniques for transformation of E. coli in: v. Glover D.M. (Hrsg): DNA-cloning. *IRL Press, Oxford.*

- Harder, T., P. Scheiffele, et al. (1998). "Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components." J Cell Biol **141**(4): 929-42.
- Hashimoto, Y., Y. Shimada, et al. (2004). "The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma." Oncology **67**(3-4): 262-70.
- Higgs, H. N. and T. D. Pollard (1999). "Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins." J Biol Chem **274**(46): 32531-4.
- Higgs, H. N. and T. D. Pollard (2000). "Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex." J Cell Biol **150**(6): 1311-20.
- Holland Frei (2003). "Cancer medicine" 6th ed. Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil, editors. Hamilton (Canada): BC Decker Inc.; c2003.
- Honda, K., T. Yamada, et al. (2005). "Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer." Gastroenterology **128**(1): 51-62.
- Hotta, A., R. Inatome, et al. (2005). "Critical role of collapsin response mediator protein-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons." Mol Biol Cell **16**(1): 32-9.
- Inatome, R., T. Tsujimura, et al. (2000). "Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain." J Biol Chem **275**(35): 27291-302.
- Kilsdonk, E. P., P. G. Yancey, et al. (1995). "Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins." J Biol Chem **270**(29): 17250-6.
- Kohn, E., M. Sandeen, et al. (1992). "In vivo efficacy of a novel inhibitor of selected signal transduction pathways including calcium, arachidonate, and inositol phosphates." Cancer Res **52**(11): 3208-3212.
- Kohn, E. C., W. D. Figg, et al. (1997). "Phase I trial of micronized formulation carboxyamidotriazole in patients with refractory solid tumors: pharmacokinetics, clinical outcome, and comparison of formulations." J Clin Oncol **15**(5): 1985-93.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-69.
- Lee, S., J. H. Kim, et al. (2002a). "Collapsin response mediator protein-2 inhibits neuronal phospholipase D(2) activity by direct interaction." J Biol Chem **277**(8): 6542-9.
- Lee, Y. G., J. A. Macoska, et al. (2002b). "MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer." Neoplasia **4**(4): 291-4.
- Leung, T., Y. Ng, et al. (2002). "p80 ROKalpha binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology." FEBS Lett **532**(3): 445-9.

- Luo, Y., D. Raible, et al. (1993). "Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones." Cell **75**(2): 217-27.
- Machesky, L. M., S. J. Atkinson, et al. (1994). "Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose." J Cell Biol **127**(1): 107-15.
- Machesky, L. M. and K. L. Gould (1999). "The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer." Curr Opin Cell Biol **11**(1): 117-21.
- Machesky, L. M., E. Reeves, et al. (1997). "Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins." Biochem J **328** (Pt 1): 105-12.
- Manes, S., E. Mira, et al. (1999). "Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells." Embo J **18**(22): 6211-20.
- Marchisio, P. C., D. Cirillo, et al. (1987). "Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions." Exp Cell Res **169**(1): 202-14.
- Matsudaira, P. T. and D. R. Burgess (1979). "Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton." J Cell Biol **83**(3): 667-73.
- Matsudaira, P. T. and D. R. Burgess (1982). "Organization of the cross-filaments in intestinal microvilli." J Cell Biol **92**(3): 657-64.
- Menez, J., B. Le Maux Chansac, et al. (2004). "Mutant alpha-actinin-4 promotes tumorigenicity and regulates cell motility of a human lung carcinoma." Oncogene **23**(15): 2630-9.
- Messier, J. M., L. M. Shaw, et al. (1993). "Fimbrin localized to an insoluble cytoskeletal fraction is constitutively phosphorylated on its headpiece domain in adherent macrophages." Cell Motil Cytoskeleton **25**(3): 223-33.
- Miki, H. and T. Takenawa (1998). "Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization." Biochem Biophys Res Commun **243**(1): 73-8.
- Miki, H., H. Yamaguchi, et al. (2000). "IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling." Nature **408**(6813): 732-5.
- Minturn, J. E., H. J. Fryer, et al. (1995). "TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a *C. elegans* gene involved in axon outgrowth." J Neurosci **15**(10): 6757-66.
- Mitsui, N., R. Inatome, et al. (2002). "Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling." Embo J **21**(13): 3274-85.
- Mooseker, M. S., T. A. Graves, et al. (1980). "Regulation of microvillus structure: calcium-dependent solation and cross-linking of actin filaments in the microvilli of intestinal epithelial cells." J Cell Biol **87**(3 Pt 1): 809-22.

- Mullins, R. D. (2000). "How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 91-6.
- Mullins, R. D. and T. D. Pollard (1999). "Structure and function of the Arp2/3 complex." Curr Opin Struct Biol **9**(2): 244-9.
- Nagano, T., T. Yoneda, et al. (2002). "Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone." Nat Cell Biol **4**(7): 495-501.
- Nakamoto, T., K. H. Kain, et al. (2004). "Neurobiology: New connections between integrins and axon guidance." Curr Biol **14**(3): R121-3.
- Nelson, R. D., P. G. Quie, et al. (1975). "Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes." J Immunol **115**(6): 1650-6.
- Nikolopoulos, S. N., B. A. Spengler, et al. (2000). "The human non-muscle alpha-actinin protein encoded by the ACTN4 gene suppresses tumorigenicity of human neuroblastoma cells." Oncogene **19**(3): 380-6.
- Nobes, C. D. and A. Hall (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.
- Ohsawa, K., Y. Imai, et al. (2004). "Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fibrin and enhances its actin-bundling activity." J Neurochem **88**(4): 844-56.
- Ono, S., Y. Yamakita, et al. (1997). "Identification of an actin binding region and a protein kinase C phosphorylation site on human fascin." J Biol Chem **272**(4): 2527-33.
- Otey, C. A. and O. Carpen (2004). "Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player." Cell Motil Cytoskeleton **58**(2): 104-11.
- Palazzo, A. F., T. A. Cook, et al. (2001). "mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules." Nat Cell Biol **3**(8): 723-9.
- Pantaloni, D., R. Boujemaa, et al. (2000). "The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins." Nat Cell Biol **2**(7): 385-91.
- Pollard, T. D., L. Blanchoin, et al. (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 545-76.
- Puschel, A. W. (1996). "The semaphorins: a family of axonal guidance molecules?" Eur J Neurosci **8**(7): 1317-21.
- Quinn, C. C., E. Chen, et al. (2003). "TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone." J Neurosci **23**(7): 2815-23.
- Quinn, C. C., G. E. Gray, et al. (1999). "A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth." J Neurobiol **41**(1): 158-64.

- Revenu, C., R. Athman, et al. (2004). "The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(8): 635-46.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." Cell **70**(3): 389-99.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, et al. (1992). "The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling." Cell **70**(3): 401-10.
- Robine, S., C. Huet, et al. (1985). "Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?" Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8488-92.
- Rohatgi, R., L. Ma, et al. (1999). "The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly." Cell **97**(2): 221-31.
- Saiki, R. K., T. L. Bugawan, et al. (1986). "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes." Nature **324**(6093): 163-6.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Schubert, D., S. Heinemann, et al. (1974). "Clonal cell lines from the rat central nervous system." Nature **249**(454): 224-7.
- Shih, J. Y., Y. C. Lee, et al. (2003). "Collapsin response mediator protein-1: a novel invasion-suppressor gene." Clin Exp Metastasis **20**(1): 69-76.
- Small, J. V., K. Rottner, et al. (1998). "Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement." Biochim Biophys Acta **1404**(3): 271-81.
- Strasser, G. A., N. A. Rahim, et al. (2004). "Arp2/3 is a negative regulator of growth cone translocation." Neuron **43**(1): 81-94.
- Takenawa, T. and H. Miki (2001). "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." J Cell Sci **114**(Pt 10): 1801-9.
- Thelen, K., V. Kedar, et al. (2002). "The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins." J Neurosci **22**(12): 4918-31.
- Tomar, A., Y. Wang, et al. (2004). "Regulation of cell motility by tyrosine phosphorylated villin." Mol Biol Cell **15**(11): 4807-17.
- Varani, J., W. Orr, et al. (1978). "A comparison of the migration patterns of normal and malignant cells in two assay systems." Am J Pathol **90**(1): 159-71.
- Volkman, N., D. DeRosier, et al. (2001). "An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function." J Cell Biol **153**(5): 947-56.

- Wachsstock, D. H., W. H. Schwartz, et al. (1993). "Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels." Biophys J **65**(1): 205-14.
- Wang, L. H. and S. M. Strittmatter (1997). "Brain CRMP forms heterotetramers similar to liver dihydropyrimidinase." J Neurochem **69**(6): 2261-9.
- Weiss, P. and B. Garber (1952). "Shape and Movement of Mesenchyme Cells as Functions of the Physical Structure of the Medium. Contributions to a Quantitative Morphology." PNAS **38**(3): 264-280.
- Welch, M. D., J. Rosenblatt, et al. (1998). "Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation." Science **281**(5373): 105-8.
- Woodings, J. A., S. J. Sharp, et al. (2003). "MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta." Biochem J **371**(Pt 2): 463-71.
- Yamagata, N., Y. Shyr, et al. (2003). "A training-testing approach to the molecular classification of resected non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **9**(13): 4695-704.
- Yamashiro, S., Y. Yamakita, et al. (1998). "Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells." Mol Biol Cell **9**(5): 993-1006.
- Yuasa-Kawada, J., R. Suzuki, et al. (2003). "Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization." Eur J Neurosci **17**(11): 2329-43.
- Zhou, F. Q. and C. S. Cohan (2004). "How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets." J Neurobiol **58**(1): 84-91.

7 Danksagung

Diese Seiten möchte ich nutzen, um all denjenigen meinen Dank auszusprechen, die direkt oder indirekt das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

PD Dr. Joachim Kappler möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Prof. Dr. Volkmar Gieselmann möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Christa E. Müller für die Übernahme des Co-Referenten.

Prof. Dr. Thomas Magin danke ich für Benutzung der Mikroskope.

Herrn Nobert Rösel für technische und persönliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Joachim Kappler für die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die freundliche wie geduldige Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation und nicht zuletzt für seine Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich danken, dass sie auf so vielfältige Weise die Unterstützung gewährt haben, die mich überhaupt an diesen Punkt geführt hat.

Vielen Dank auch an alle, die ich hier nicht namentlich erwähnen konnte, damit die Danksagung nicht länger wird als die gesamte Arbeit.

Bonn im 2005