

**Funktionelle Analyse der Polaritäts- und
Tumorsuppressorgene *hugl-1* und *hugl-2* mittels
siRNA-vermitteltem Gen-*Silencing* und
konditionalem Gen-*Knockout***

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Chemie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sebastian Sieber

geb. am 02. Dezember 1978 in Frankfurt a. M.

Magdeburg, 2012

Dekan:

1. Berichterstatterin: [Die Namen von Dekan und Gutach-
tern sind gelöscht.]

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 2012

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zellpolarität	1
1.2	Epitheliale Zellpolarität und Tumorigenese	2
1.3	T-Zellpolarität	4
1.3.1	T-Zellpolarität und Migration	5
1.3.2	T-Zellpolarität und Immunologische Synapse	7
1.3.3	Zellpolarität und Aktindynamik	7
1.4	Polaritätskomplex-Proteine	9
1.5	Scribble-Komplex	11
1.6	<i>Lethal giant larvae (lgl)</i>	13
1.6.1	Konservierung von Lgl in Eukaryoten	14
1.6.2	Hugl-1 und Hugl-2	16
1.6.3	Struktur, Funktion und Rolle von Lgl	17
1.6.4	Lgl in Etablierung und Erhalt der Zellpolarität	19
1.6.5	Lgl als Tumorsuppressor	23
1.7	Gen- <i>Silencing</i> durch RNA-Interferenz	25
1.8	Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese in Mäusen	29
1.9	Aufgabenstellung	32
2	MATERIAL UND METHODEN	34
2.1	Material	34
2.1.1	Geräte	34
2.1.2	Gebrauchsgegenstände und Plastikwaren	35
2.1.3	Chemikalien	36
2.1.4	Kits	37
2.1.5	Software	38
2.1.6	Enzyme	38
2.1.7	Plasmide	38
2.1.8	Primer	39
2.1.9	siRNAs	40
2.1.10	Antikörper	41
2.1.11	Zelllinien	42
2.1.12	Zellkulturmedien und Zusätze	43

2.2 Methoden	45
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1.1 Klonierung von shRNA-Expressionskonstrukten	45
2.2.1.2 Restriktionsverdau	46
2.2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	46
2.2.1.4 DNA-Präzipitation	47
2.2.1.5 Ligation	47
2.2.1.6 Transformation.....	47
2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryoten.....	48
2.2.1.8 Sequenzierung der Plasmid-DNA	49
2.2.1.9 RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen	50
2.2.1.10 Reverse Transkription.....	51
2.2.1.11 Semi-quantitative PCR.....	51
2.2.1.12 Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	52
2.2.1.13 Agarose-Gelelektrophorese	53
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	54
2.2.2.1 Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen	54
2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	54
2.2.2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
2.2.2.4 Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot).....	56
2.2.2.5 Immundetektion von Proteinen	57
2.2.3 Zellbiologische Methoden	59
2.2.3.1 Kultivierung von Suspensionszellen	59
2.2.3.2 Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien	59
2.2.3.3 Kryokonservieren und Auftauen von Zellen	59
2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl	60
2.2.3.5 Präparation humaner PBMCs	60
2.2.3.6 Isolierung CD4- oder CD8-positiver T-Lymphozyten aus PBMCs	61
2.2.3.7 <i>In vitro</i> Generierung von humanen Dendritischen Zellen	62
2.2.3.8 Transfektion humaner T-Zellen mit synthetischen siRNAs	62
2.2.3.9 Lipotransfektion von HEK293 Zellen.....	63
2.2.3.10 Generierung stabil transfizierter Zelllinien	64
2.2.3.11 Induktion der Aktinpolymerisation durch Okt-3	65
2.2.3.12 Chemokin-induzierte Aktinpolymerisation.....	66
2.2.3.13 Adhäsions-Assay	66
2.2.3.14 Migationsstudien	67
2.2.3.15 Cyclin D1 Reporter-gen-Assay.....	68
2.2.3.16 Durchflusszytometrie (FACS)	69
2.2.3.17 Zweidimensionaler (2D) Koloniebildungs-Assay (<i>Colony Formation Assay</i>) 70	
2.2.3.18 Dreidimensionale (3D) Matrigel Kultur	71
2.2.3.19 CellTiter-Glo Lumineszenz Zellviabilitätsassay.....	71
2.2.3.20 Proliferations-Assay	72
2.2.3.21 Zytotoxizitätsversuche	72
2.2.3.22 Konfokale Zeitraffer-Mikroskopie	73

2.2.3.23	Immunfluoreszenzfärbungen für die konfokale Laserscanmikroskopie	73
2.2.4	Tierexperimente	75
2.2.4.1	Haltung von Experimentaltieren	75
2.2.4.2	Transgene Mäuse	75
2.2.4.2.1	Verpaarung von Experimentaltieren	75
2.2.4.2.2	Maus Genotypisierung	76
2.2.4.2.3	Konditionale Deletion von <i>mgl-2</i>	77
2.2.4.3	Maus Xenograft Versuche	77
2.2.5	Statistische Analyse	78
3	ERGEBNISSE	79
3.1	Einfluss von Hvgl-1 und Hvgl-2 auf Erhalt und Modulation der Zellpolarität in T-Lymphozyten	79
3.1.1	Einfluss von Hvgl-1 und -2 auf den Erhalt und die Modulation der Zellpolarität von Jurkat-16 T-Zellen	79
3.1.1.1	Expression von Hvgl-1 und Hvgl-2 in Jurkat-16 T-Zellen	79
3.1.1.2	Transiente Transfektion von Jurkat-16 T-Zellen mit Hvgl-1- oder Kontroll-siRNA	80
3.1.1.3	Generierung von Jurkat-16 Aktin-GFP Zellen	83
3.1.1.4	Einfluss von Hvgl-1 auf die CD3/TCR Komplex-vermittelte Aktinpolymerisation in Jurkat-16 GFP-Aktin Zellen	84
3.1.1.5	Einfluss von Hvgl-1 auf das Adhäsionsverhalten	86
3.1.1.6	Aktinpolymerisation Hvgl-1-supprimierter Zellen nach Stimulation mit SDF-1 α	89
3.1.1.7	Durchflusszytometrische Analyse der Aktinpolymerisation in Hvgl-1-supprimierten Zellen	91
3.1.1.8	Effekt von Hvgl-1 auf die chemokin-induzierte Migration	92
3.1.2	Einfluss von Hvgl-1 und -2 auf den Erhalt und die Modulation der Zellpolarität primärer T-Zellen	94
3.1.2.1	Expression von Hvgl-1 und -2 in primären CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	94
3.1.2.2	Transiente Transfektion primärer CD4-positiver T-Lymphozyten mit Hvgl-1- oder Kontroll-siRNA	95
3.1.2.3	Effekt von Hvgl-1 auf die F-Aktinpolymerisation und Zellpolarisation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit CCL19	96
3.1.2.4	Einfluss von Hvgl-1 auf die Kontaktaufnahme von naiven CD4 ⁺ T-Zellen und Dendritischen Zellen	101
3.2	Generierung vektorbasierter siRNA-Expressionskonstrukte gegen Hvgl-1 und Hvgl-2	106
3.2.1	Klonierung eines rekombinanten Vektorsystems zur Expression von Hvgl-1- und Hvgl-2-siRNA	106
3.2.1.1	Erstellung eines Vektors zur stabilen Expression von Hvgl-1-siRNA	106
3.2.1.1.1	Klonierung des pSuper-Hvgl-1-Vektors	107
3.2.1.1.2	Sequenzierung der pSuper-Hvgl-1-Konstrukte	109
3.2.1.1.3	Aktivität des Konstruktes in HEK293 Zellen	110
3.2.1.2	Erstellung eines Vektors zur stabilen Expression von Hvgl-2-siRNA	111
3.2.1.2.1	Klonierung des pSuper-Hvgl-2-Vektors	112

3.2.1.2.2	Sequenzierung der pSuper-Hugl-2-Konstrukte	113
3.2.1.2.3	Aktivität des Konstruktes in HEK293 Zellen.....	114
3.3	Einfluss der Tumorsuppressoren Hugl-1 und Hugl-2 auf Modulation und Erhalt der Zellpolarität in HEK293 Epithelzellen	116
3.3.1	Etablierung stabiler, Hugl-defizienter Zelllinien HEK293-pSuper-Hugl-1 und HEK293-pSuper-Hugl-2	116
3.3.2	Etablierung stabiler HEK293-pSuper-Hugl-1+2 Zelllinien	118
3.3.3	Funktionelle Studien zur Analyse der Funktion von Hugl-1 und Hugl-2	119
3.3.3.1	Phänotypische Analyse Hugl-1- und Hugl-2-supprimierter HEK293 Zellen.....	119
3.3.3.2	Effekt von Hugl-1 und Hugl-2 auf die Expression von E-Cadherin	121
3.3.3.3	Einfluss von Hugl-1 und Hugl-2 auf das 2D-Koloniebildungsverhalten (<i>Colony Formation Assay</i>).....	123
3.3.3.4	Analyse des Einflusses von Hugl-1 und Hugl-2 auf die Bildung von Zellsphäroiden in der <i>in vitro</i> Matrigel 3D-Kultur.....	126
3.3.3.5	Einfluss von Hugl-1 und Hugl-2 auf das Migrationsverhalten	128
3.3.3.6	Effekt von Hugl-1 und Hugl-2 auf den Zellzyklusregulator Cyclin D1	129
3.3.3.7	Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellzyklusverteilung in Hugl-1 und Hugl-2 depletierten HEK293 Zellen	131
3.3.3.8	Proliferationsverhalten Hugl-1- und Hugl-2-defizienter Zellen	133
3.3.3.9	Einfluss des Hugl-1- und Hugl-2-Expressionsstatus auf das Ansprechen von HEK293 Zellen auf Zytostatika	134
3.3.3.10	Einfluss von Hugl-1 und Hugl-2 in <i>in vivo</i> Maus Xenograft Versuchen.....	136
3.4	Cre/loxP-vermittelte konditionale <i>mgl-2</i> Deletion in der Maus	138
3.4.1	Mäuse mit loxP-flankiertem <i>mgl-2</i>	138
3.4.1.1	Analyse von <i>mgl-2</i> -flox Mäusen.....	140
3.4.1.2	Erhalt der <i>mgl-2</i> ^{flox/flox} Mauslinie	141
3.4.2	Darmspezifische und zeitlich kontrollierte Deletion von <i>mgl-2</i>	142
3.4.2.1	Etablierung transgener <i>mgl-2</i> ^{flox/flox} <i>Vil</i> ^{Cre/+} Mäuse	143
3.4.2.2	Analyse von <i>mgl-2</i> ^{flox/flox} <i>Vil</i> ^{Cre/+} Mäusen nach konditionaler Deletion von <i>mgl-2</i> im Darmepithel	145
3.4.2.2.1	Phänotypische Analyse.....	145
3.4.2.2.2	Anatomische Analyse	146
3.4.2.3	Verifizierung der konditionalen Deletion von <i>mgl-2</i> mittels organspezifischer DNA	147
4	DISKUSSION	149
4.1	Relevanz von Hugl-1 für die Zellpolarität und -morphologie von T-Lymphozyten	149
4.2	Hugl-1 in der mDC-induzierten Polarisierung und Motilität CD4-positiver T-Lymphozyten	152
4.3	Funktionalität der shRNA-Expressionskonstrukte gegen Hugl-1 und Hugl-2	153

4.4	Effekt von Hugi-1 und Hugi-2 auf das migratorische und metastatische Potenzial von Epithelzellen.....	154
4.5	Effekte von Hugi-1 und Hugi-2 auf den Zellzyklus.....	157
4.6	Einfluss des Hugi-1- und Hugi-2-Expressionsniveaus auf das Ansprechen auf Zytostatika.....	158
4.7	Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese von <i>mgl-2</i> in der Maus	159
5	AUSBLICK	161
6	ZUSAMMENFASSUNG	163
7	LITERATURVERZEICHNIS	165
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	181
	PUBLIKATIONEN	185

1 Einleitung

1.1 Zellpolarität

Die Ausbildung und der Erhalt der Zellpolarität sind essenziell für viele Aspekte der Zell- und Entwicklungsbiologie. In ein- und mehrzelligen eukaryotischen Organismen ist die Zellpolarität in Prozesse der Differenzierung, Proliferation und Morphogenese eingebunden (Gotta, 2005). Zellpolarität ist daher grundlegend für die strukturelle Integrität komplexer Gewebe sowie für die korrekte Partitionierung zellulärer Komponenten auf zellulärer Ebene und Ebene ganzer Gewebe (Banks und Humbert, 2008). Ein wesentliches Merkmal der Zellpolarität besteht in der asymmetrischen Verteilung zellulärer Komponenten wie Proteinen und Lipiden, Zellorganellen und Zytoskelettbestandteilen hin zu bestimmten Regionen. Die hieraus resultierende funktionelle und strukturelle Spezialisierung der Zellen geht auf einen grundlegenden konservierten Mechanismus zurück, der von der Hefe über *Drosophila melanogaster* bis hin zum Säuger anzutreffen ist. Die Asymmetrie zellulärer Komponenten ermöglicht in Plasmamembran und Zytoplasma die Bildung abgegrenzter funktioneller Domänen. Diese sind für die effektive Interaktion der Zelle mit einer variablen extrazellulären Umgebung notwendig und bestimmen sowohl Orientierung als auch Funktion und Schicksal der Zelle (Mellman und Nelson, 2008). Zellpolarität kann in drei verschiedene Haupttypen klassifiziert werden: die apiko-basale Zellpolarität, die anterior-posteriore sowie die planare Zellpolarität (Dow und Humbert, 2007). Die apiko-basale Zellpolarität ist für die Funktion epithelialer Monolayer notwendig. Die anterior-posteriore Polarität spielt hingegen eine Rolle in der Migration, der Bildung einer immunologischen Synapse, der asymmetrischen Zellteilung oder der Axonspezifizierung (Abbildung 1 A, B). Anders als bei der apiko-basalen Zellpolarität erfordert die anterior-posteriore Polarität keine spezifische Gewebestruktur. Die Orientierung einzelner Zellen im Kontext eines gesamten Gewebes wird durch die planare Zellpolarität oder Gewebepolarität einzelner Zellschichten beeinflusst. Diese Art der zellulären Organisation ist beispielsweise essenziell für die Ausbildung von Flügel oder Auge von *Drosophila* oder aber für die Ausbildung von Haarzellen des Säugerinnenohrs (Abbildung 1 C). In allen Fällen der Zellpolarität werden polarisierte Zellen in unterschiedliche funktionelle Domänen unterteilt. Bezüglich der Zusammensetzung von Proteinen und Lipiden sind diese einzigartig und bestimmen mitunter die strukturelle Integrität der Zelle.

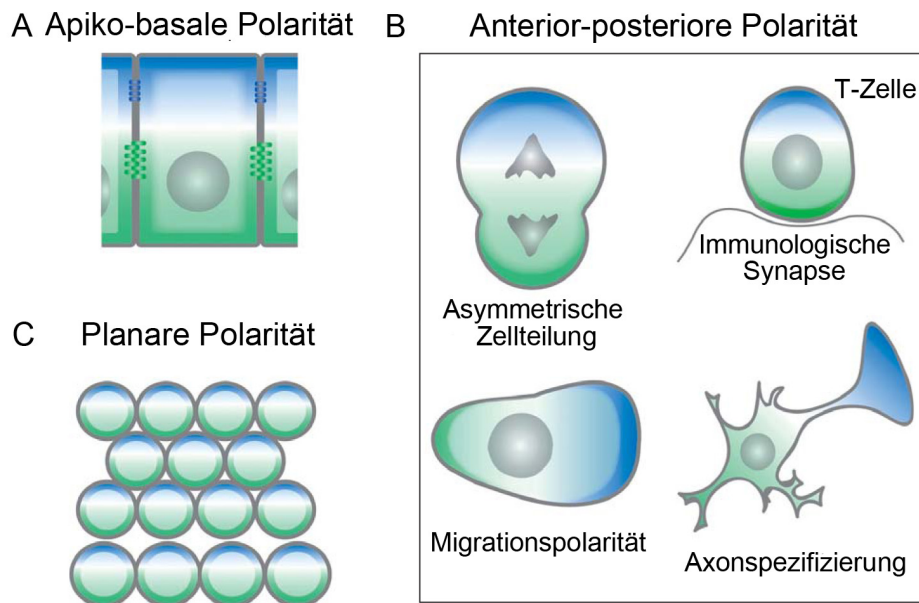


Abbildung 1. Haupttypen der Zellpolarität. Die asymmetrische Verteilung zellulärer Komponenten führt in vielzelligen Organismen zur Ausbildung unterschiedlicher Typen der Zellpolarität. (A) Apiko-basale Zellpolarität in epithelialen Monolayern. (B) Anterior-posteriore Zellpolarität am Beispiel von asymmetrischer Zellteilung, Ausbildung einer Immunologischen Synapse von T- und Zielzelle, Migrationspolarität sowie neuronale Axonspezifizierung (von oben links nach unten rechts). (C) Planare Zellpolarität oder Gewebepolarität von Epithelzellen, die im Kontext eines gesamten Gewebes auf zweidimensionaler Ebene organisiert sind. Blaue und grüne Farben symbolisieren die asymmetrische Verteilung unterschiedlicher zellulärer Komponenten hin zu bestimmten Zellregionen. Modifiziert nach (Dow und Humbert, 2007).

1.2 Epitheliale Zellpolarität und Tumorigenese

Epitheliales Gewebe bildet die Kontaktfläche zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Es bedeckt Organe und Körperhöhlen wie Lunge, Verdauungstrakt, Haut oder Niere. Hierbei sorgt es für mechanischen Schutz und nimmt eine Schlüsselfunktion in der Homöostase des Organismus ein, indem es die Sekretion, Absorption und sensorische Funktionen vermittelt (Tanos und Rodriguez-Boulan, 2008; Iden und Collard, 2008). Diese Funktionen werden durch eine große Anzahl an Kanälen, Transportern und Rezeptoren aufrecht erhalten, welche stark polarisiert zwischen der apikalen und basalen Domäne der zellulären Plasmamembran vorliegen. Diese apiko-basale Zellpolarität in Epithelzellen wird durch zwei Plasmamembrandomänen bestimmt. In Vertebraten sind diese durch *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* voneinander abgetrennt. Die Anordnung dieser Verbindungsproteine ist essenziell für die Initiierung der epithelialen Zellpolarität (Tsukita *et al.*, 2008; Jeanes *et al.*, 2008). Die apikale Zelloberfläche ist zum Lumen beziehungsweise hin zum externen Medium gerichtet, während die basolaterale Oberfläche mit benachbarten Zellen und der darunterliegenden

extrazellulären Matrix (EZM) interagiert. Beide Domänen unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Lipide und Proteine und spiegeln aufgrund dieser asymmetrischen Verteilung die spezifischen Funktionen der jeweiligen Domäne wider. *Tight Junctions* stellen eine enge Verbindung von benachbarten Zellen her und sind für das Epithelgewebe von essenzieller Bedeutung. In Zellen aus *Drosophila* entsprechen diese den *Septate Junctions*. Zwischen benachbarten Zellen fungieren sie nicht nur als Diffusionsbarriere für lösliche Moleküle, sondern verhindern auch die freie Verteilung von Membranproteinen und -lipiden von einer Domäne in die andere. *Tight Junctions* sorgen daher für den Erhalt der apikalen und basolateralen Plasmamembrandomänen (Iden und Collard, 2008; Shin *et al.*, 2006). *Adherens Junctions* sorgen dagegen durch klassische Cadherine für den Erhalt der Adhäsion und für die mechanische Stabilität zwischen benachbarten Zellen (Moreno-Bueno *et al.*, 2008). Besondere Bedeutung für Ausbildung und Erhalt epithelialer Zell-Zell Kontakte kommt dem E-Cadherin zu, das zusammen mit N- und P-Cadherinen am häufigsten exprimiert wird. Beide Zell-Zell Verbindungsproteine, *Tight* und *Adherens Junctions*, zeichnet aus, dass sie mit der extrazellulären Domäne an homotypische Proteine gegenüberliegender Zellen binden und mit der zytoplasmatischen Domäne über Adapterproteine mit dem Aktinzytoskelett interagieren. Die apiko-basale Zellpolarität von Epithelzellen wird jedoch nicht nur allein durch diese beiden Verbindungsproteine bestimmt. Apikale Verbindungsproteine kooperieren in diesem Prozess mit spezialisierten Polaritätskomplexen, welche die Identität der abgetrennten Plasmamembrandomänen regulieren.

Der Verlust der Zell-Zell Adhäsion sowie der apiko-basalen Polarität führt zu gravierenden morphologischen und physiologischen Veränderungen in Epithelzellen und gilt als wichtige Ursache für die Entstehung von Krebs (Wodarz und Näthke, 2007; Feigin und Muthuswamy, 2009). Nach Schätzungen der *American Cancer Society* sind mehr als 80% aller Tumorarten Karzinome, die auf einen epithelialen Ursprung zurückzuführen sind und in Organen wie Leber, Lunge, Brust, Darm, Pankreas und Ösophagus auftreten (American Cancer Society, 2010; Huang und Muthuswamy, 2010). Die Entstehung epithelialer neoplastischer Gewebe ist häufig durch einen Verlust von Zell-Zell Verbindungen, einem Verlust oder einer Dysregulation der epithelialen apiko-basalen Zellpolarität sowie durch eine Zunahme der Zellproliferation gekennzeichnet (Martin-Belmonte und Rodriguez-Fraticelli, 2009). Störungen der Zellpolarität beeinflussen die asymmetrische Verteilung von Oberflächenproteinen, das Aktin- und Tubulinzytoskelett, den Vesikelverkehr und konservierte Polaritätsproteine (Krummel und Macara, 2006). Der epitheliale Charakter des ursprünglichen Gewebes geht verloren und

nimmt eine verstärkt mesenchymale Erscheinungsform an. Charakteristisch für diesen als epithelialen-mesenchymalen Übergang (*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) bezeichneten Vorgang ist der Verlust der Zell-Zell Adhäsion, der apiko-basalen Polaritätsregulation sowie eine damit verbundene gesteigerte Zellmotilität (Hanahan und Weinberg, 2000; Wodarz und Näthke, 2007). Diese korreliert mit der Invasion von Tumorzellen in benachbartes Gewebe und der Bildung von Metastasen. Der Zusammenhang von EMT und Tumorprogression gilt allgemein als gesichert. Das Verständnis über die Beziehung von Zellpolarität und frühen Ereignissen der Karzinogenese ist dagegen noch lückenhaft und bedarf in Zukunft weiterer intensiver Aufklärung.

1.3 T-Zellpolarität

Die Mechanismen der Polaritätsregulation in Epithelzellen sind weit besser verstanden als diejenigen der T-Zellpolarität. Aufgrund der funktionellen Konservierung in unterschiedlichen Spezies zeichnen sich jedoch nach und nach immer mehr Parallelen zwischen der epithelialen Polarität und der T-Zellpolarität ab. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass letztere durch die gleichen konservierten Mechanismen reguliert wird (Humbert *et al.*, 2006; Krummel und Macara, 2006).

T-Zellen nehmen in der erworbenen Immunität eine wichtige Rolle ein, da sie die Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen oder durch Lyse Antigen-tragender Zellen entweder verstärken oder unterdrücken (Billadeau *et al.*, 2007). Um diese Funktionen auszuüben, migrieren T-Zellen entlang eines chemotaktischen Gradienten zu Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cell*, APC) und treten mit diesen in Kontakt. Die Morphologie der T-Zellen während dieser Prozesse wird durch die selektive Rekrutierung von Oberflächenrezeptoren, Signalkomplexen und Zellorganellen hin zu verschiedenen funktionellen Regionen der Zelle bestimmt (Ludford-Menting *et al.*, 2005). Dieser als anterior-posteriore T-Zellpolarisierung bezeichnete Vorgang ist ein integraler Bestandteil für alle Aspekte der T-Zell Funktion und umfasst Prozesse wie die Migration, Proliferation, homotypische Interaktion, Aktivierung als Antwort auf die Antigenpräsentation sowie der Zytotoxizität (Sanchez-Madrid und del Pozo, 1999; Dustin und Chan, 2000). Für das Verständnis der Immunregulation ist es wichtig zu verstehen, über welche Mechanismen genau die T-Zellpolarität reguliert wird und auf welche Weise diese die Signalwege der T-Zelle beeinflussen. Während

der Polarisierung von T-Zellen rufen morphologische und funktionelle Veränderungen eine bipolare, asymmetrische Zellform hervor. Anterior ist diese durch die Ausbildung eines Lamellipodiums (engl. *leading edge*) gekennzeichnet und posterior durch die Ausbildung einer einfachen Ausstülpung, welche als Uropod bezeichnet wird. Je nach zellulärem Kontext kann sich der Uropod der Zelle auch zurückbilden. Beide Pole der Zelle sind durch eine gemeinsame Polaritätsachse miteinander verbunden und zeichnen sich durch eine einzigartige Zusammensetzung der zellulären Komponenten aus. Zu den beiden Hauptformen der T-Zellpolarität gehören die Polarität während der T-Zellmigration sowie die Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) als Antwort auf die Antigenpräsentation (Russell, 2008) (Abbildung 2 A, B).

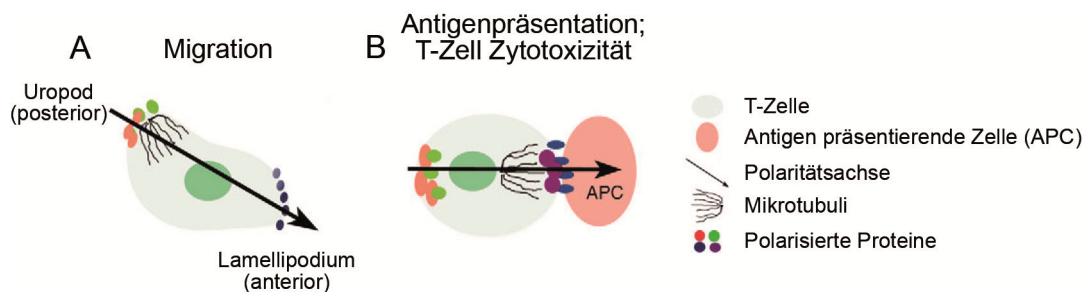


Abbildung 2. Anterior-posteriore Polarität von T-Zellen. Darstellung der Polaritätsachse während der (A) T-Zellmigration und (B) der Antigenpräsentation und T-Zellzytotoxizität. Funktionelle und morphologische Veränderungen während der T-Zellpolarisierung rufen eine bipolare, asymmetrische Zellform hervor. Beide Pole der Zelle sind durch eine gemeinsame Polaritätsachse miteinander verbunden, die durch das Mikrotubuliorganisierendes Zentrum, Golgi-Apparat und Zellkern verläuft. Modifiziert nach (Russell, 2008).

1.3.1 T-Zellpolarität und Migration

Werden im Blutstrom befindliche naive T-Zellen durch passende Chemokine stimuliert, lagern sie sich an die Gefäßwand an und migrieren durch das Gefäßepithel hindurch. Auf der Suche nach präsentierten Antigenen wandern T-Zellen entlang des Lockstoffgradienten in lymphatische Kompartimente oder in Gewebe, in denen inflammatorische Prozesse ablaufen. Der Uropod migrierender T-Lymphozyten beinhaltet neben dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule organizing center*, MTOC) Vimentin- und Aktinfilamente, die Adhäsionsproteine Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) sowie das Zytoskelettverbindungsprotein Plektin (McFarland, 1969; Brown *et al.*, 2001; Burkhardt *et al.*, 2008). Das an der Migrationsfront befindliche Lamellipodium ist dagegen auf die Quelle des Stimulus ausgerichtet und mit Chemokinrezeptoren wie CXCR4, CCR2 und CCR5 angereichert (Nieto *et al.*, 1997). Die Front migrierender T-Zellen ist darüber hinaus für die Antigenerkennung sensibilisiert und

mit aktivierten Integrinrezeptoren wie beispielsweise LFA-1 ausgestattet (Wei *et al.*, 1999; Stanley *et al.*, 2008). Das Aktin- und Tubulinzytoskelett, Oberflächenproteine, Vesikelverkehr sowie konservierte Polaritätsproteine sind in T-Zellen differenziell und asymmetrisch lokalisiert (Abbildung 3 A-E). Relativ zur Migrationsrichtung bilden sie eine anterior-posteriore Polaritätsachse aus. Diese Polarität definiert die Bewegungsrichtung während der T-Zellmigration und ermöglicht gleichzeitig die Modifikation des Zytoskeletts, das die Zellform und die Fortbewegung der Zelle vermittelt (Russell, 2008). Signale, welche die T-Zelle während der Migration durch Lymphgefäße und Gewebe über Chemokinrezeptoren, Adhäsionsmoleküle, kostimulatorische Moleküle und Antigenrezeptoren aus der Mikroumgebung aufnimmt, werden in diesen Prozess integriert und tragen zur Etablierung und zum Erhalt der Zellpolarität bei. In Geweben können T-Zellen entweder einen hoch motilen Zustand annehmen, der das Abtasten Antigen-präsentierender Zellen ermöglicht, oder aber sie verweilen für eine verlängerte Interaktion an einem Ort. Der Übergang zwischen beiden Stadien wird durch die Gegenwart des Antigens, des Aktivierungszustandes von T-Zelle und APC sowie durch die dreidimensionale Beschaffenheit der umgebenden Matrix bestimmt (Friedman *et al.*, 2005; Burkhardt *et al.*, 2008).

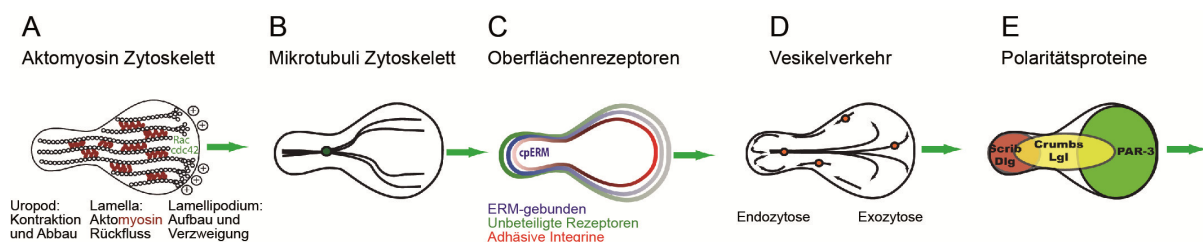


Abbildung 3. Polaritätssysteme in motilen T-Lymphozyten. Die anterior-posteriore Migrationspolarität von T-Lymphozyten wird durch fünf grundlegende Polaritätskomponenten definiert. (A) Das Aktomyosinzytoskelett besteht aus Aktinfasern, an deren Plus-Enden die Anlagerung von Monomeren erfolgt. Es bildet das Lamellipodium durch aktinbasierte Ausbuchtungen. Der Mittelkörper der Zelle ist möglicherweise für den rückläufigen Aktinfluss zum Uropod verantwortlich. (B) Das Tubulinzytoskelett ist ein weiteres polarisiertes Zytoskelett der Zelle. Dieses ist um den MTOC organisiert. (C) In migrierenden T-Zellen sind Oberflächenrezeptoren asymmetrisch lokalisiert. Adhäsive Integrine sammeln sich in Migrationsrichtung am Lamellipodium, unbeteiligte Rezeptoren sowie Oberflächenrezeptoren, die mit der C-terminal phosphorylierten Form von Ezrin, Radixin und Moesin assoziiert sind (cpERM), akkumulieren vor ihrer Aktivierung am Uropod. (D) Exo- und Endozytosemechanismen sorgen in einem Zyklus für eine Internalisierung adhäsiver Integrine sowie für den anschließenden Transport zum Uropod. Von dort aus werden sie an die Zellfront transportiert, wo sie spezifisch für die Vorwärtsbewegung der Zelle wiederverwertet werden. (E) Konservierte Polaritätsproteine tragen ebenfalls zur asymmetrischen Verteilung zellulärer Komponenten bei. Die genaue Bedeutung dieser Proteine für die T-Zellpolarität ist Gegenstand aktueller Forschung. Modifiziert nach (Krummel und Macara, 2006).

1.3.2 T-Zellpolarität und Immunologische Synapse

Eine Immunantwort wird ausgelöst, wenn T-Zellen Antigenfragmente erkennen, die über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen, wie beispielsweise einer Dendritischen Zelle oder B-Zelle, präsentiert werden. Dieser Prozess beinhaltet die Ausbildung einer immunologischen Synapse an der Kontaktstelle von T-Zelle und APC und erfordert eine Polarisierung der T-Zelle. Die Interaktion von T-Zellrezeptoren (*T-cell receptor*, TCR) mit passenden MHC-Peptid Komplexen führt zu einer Aktivierung von Signalkaskaden, die in einer Anreicherung von F-Aktin an der Zell-Zell Kontaktstelle resultieren (Billadeau und Burkhardt, 2006). T-Zellen durchlaufen grundlegende morphologische Veränderungen, die durch den Umbau des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts gesteuert werden. Diese Veränderungen rufen eine komplexe und dynamische Relokalisation von Signalmolekülen und Polaritätsproteinen am proximalen, der Schnittstelle zum APC-zugewandten Pol, sowie dem distalen Pol hervor (Cemerski und Shaw, 2006; Krummel und Macara, 2006; Billadeau *et al.*, 2007). Als ein wichtiges Merkmal werden sowohl das MTOC als auch assoziierte sekretorische Granula an die immunologische Synapse angelagert. In der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität ermöglicht dies die Freisetzung zytotoxischer Granula in den Spalt von T- und Zielzelle (Kupfer *et al.*, 1985; Stinchcombe *et al.*, 2006). Die Antigenpräsentation findet generell in den Lymphknoten statt. Angelockt durch Signalstoffe migrieren T-Zellen in diese hinein und tasten eine Reihe von APCs im Lymphknoten ab. Ein Vorgang, der wiederum die Zellpolarisation einschließt. Nach der Aktivierung durch präsentierte Antigene kommt es zur vielfachen Teilung der T-Zellen und zu einer Migration der daraus resultierenden Nachkommenschaft zu Infektionsherden oder zu Orten der Immunaktivierung (Russell, 2008).

1.3.3 Zellpolarität und Aktindynamik

Polarisierte Prozesse wie die der T-Zellmigration, die Bildung von immunologischen Synapsen, aber auch weitere zelluläre Prozesse wie beispielsweise der Integrin-vermittelten Adhäsion erfordern einerseits die Aktivierung der T-Zelle durch unterschiedliche Zelloberflächenrezeptoren und andererseits die asymmetrische Rekrutierung von regulatorischen Proteinen. Obwohl sich diese Abläufe im Detail unterscheiden, ist jeder dieser komplexen Prozesse abhängig vom Zytoskelett der T-Lymphozyten (Gomez und Billadeau, 2008; Billadeau *et al.*, 2007). Die strukturelle Basis für die Polarisierung von T-Zellen wird durch das Aktin- und

Mikrotubulizytoskelett gewährleistet. Filamentöses Aktin (F-Aktin) kontrolliert die Zellmorphologie und -plastizität und ermöglicht die polarisierte Verteilung regulatorischer Proteine innerhalb der Zelle. Darüber hinaus sorgt es für die mechanische Kraft, welche für die Zellmotilität notwendig ist (Vicente-Manzanares und Sánchez-Madrid, 2004; Billadeau *et al.*, 2007). Ein weiterer wichtiger Faktor für die strukturelle Integrität der T-Zelle sind die Mikrotubuli. Sie erhalten die Stabilität der F-Aktin-abhängigen Zellpolarität und sorgen für eine polarisierte Sekretion von Effektormolekülen (Sancho *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu F-Aktin trägt der Aufbau des Mikrotubulizytoskeletts nicht zur Fortbewegung der Zellen während der Migration bei. Eher dient es zur Etablierung der Zellpolarität und Zellplastizität.

Aktinfilamente sind polare Fasern, die aus globulären Aktinuntereinheiten (G-Aktin) zusammengesetzt sind, welche ATP binden und hydrolysieren. Die Polarität der Fasern ergibt sich aus der gleichgerichteten Orientierung der Proteinuntereinheiten sowie durch zwei strukturell unterschiedliche Enden. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrer Stabilität, sondern zeichnen sich ebenso durch unterschiedliche Assoziations- und Dissoziationsraten des G-Aktins aus. Die hieraus resultierende intrinsische Aktindynamik, welche die dynamische Polymerisierung und Depolymerisierung des F-Aktins beschreibt, ist von grundlegender Bedeutung für die Zellpolarität. In Antwort auf äußere Polaritätssignale ist das Aktinzytoskelett in der Lage, sich schnell und lokal zu reorganisieren. Die Asymmetrie in Struktur und Dynamik des Aktins wird anschließend über Zytoskelett-assoziierte Proteine in polarisierte Zellfunktionen übersetzt (Li und Gundersen, 2008).

Die Polymerisation des F-Aktins und der dazu erforderliche Umbau des Aktinzytoskeletts während der Chemokin- und TCR-Rezeptor-vermittelten Stimulation von T-Zellen werden durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine koordiniert. Kleine GTPasen der Ras Superfamilie übernehmen die Funktion von molekularen Schaltern und sind in die Regulation der Zellpolarität eingebunden. Die Rho Subfamilie setzt sich aus über 20 Mitgliedern zusammen und umfasst die GTPasen Cdc42, Rac-1 und RhoA. Rho GTPasen regulieren den Umbau des Zytoskeletts, indem sie die Polymerisation zu linearen oder verzweigten Aktinfilamenten induzieren (Iden und Collard, 2008). Die GTPasen Rac und Cdc42 sind insbesondere mit der Ausbildung des Lamellipodiums und mit der Orientierung der Migration assoziiert. Effektorproteine beider GTPasen wie beispielsweise das Wiskott-Aldrich Syndromprotein (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*, WASP), neuronales WASP und die verwandte WAVE Proteinfamilie sorgen durch Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (*Actin-related proteins 2/3*) für die

Induktion der Aktinnukleation. Die GTPase RhoA hingegen fördert die Organisation und Kontraktion von Aktinfilamenten durch die Aktivierung von Myosin-II und sorgt auf diese Weise für die Ausbildung des Uropod (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009b). Die Aktivität von RhoA und Rac steht in gegensätzlicher Beziehung zueinander. Während RhoA in der Zellfront inaktiv ist, vermittelt Rac dort die Bildung von Zellausläufern. Die Steuerung der Zellpolarität durch Regulation der Aktindynamik wird neben den GTPasen auch durch Zellpolaritätsproteine bestimmt. Während der Polarisation der Zelle sind diese Proteine nicht nur asymmetrisch verteilt, sondern sorgen sowohl in T-Zellen, als auch in Zellen epithelialen Ursprungs für eine differenzielle Verteilung assoziierter Proteine. Der Einfluss von Zellpolaritätsproteinen auf zentrale zelluläre Prozesse in T-Zellen ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

1.4 Polaritätskomplex-Proteine

Die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität wird in unterschiedlichen Organismen durch drei konservierten Hauptpolaritätskomplexe, Par (Cdc42/Par-3/Par-6/aPKC), Crumbs (Crb/Pals/Patj) und Scribble (Scribble/Dlg/Lgl), kontrolliert (Humbert *et al.*, 2008; Assemat *et al.*, 2008; Ludford-Menting *et al.*, 2005; Iden und Collard, 2008; Gérard *et al.*, 2007) (Abbildung 4). Ursprünglich wurden diese Polaritätsproteine in *Caenorhabditis elegans* und in *Drosophila melanogaster* entdeckt. In höheren Organismen, wie beispielsweise in Säugern, finden sich ebenfalls entsprechende Homologe der Proteine. Alle drei Komplexe sind in unterschiedlichen zellulären Zusammenhängen involviert. Beispiele hierfür sind die der asymmetrische Zellteilung, die epitheliale und neuronale Polarisation, sowie die Migration und Zellproliferation (Bryant und Mostov, 2008). Die apiko-basale Zellpolarität in humanen Epithelzellen wie auch die anterior-posteriore Zellpolarität von T-Lymphozyten werden im Wesentlichen durch diese drei Komplexe gesteuert. Über die Funktionsweise der Polaritätsnetzwerke in T-Zellen ist nur wenig bekannt. In diesem Abschnitt wird daher exemplarisch auf Polaritätskomplexe in Epithelzellen eingegangen.

Die Par- und Crumbs-Komplexe lokalisieren vornehmlich an der lateralen Plasmamembran der apikalen Domäne, während sich der Scribble-Komplex an der basolateralen Membran anreichert (Abbildung 4). Zwischen den drei Polaritätskomplexen finden unterschiedliche Interaktionen statt, welche zu einer Balance der Zellpolarität führen und das Ausmaß der

apikalen und basolateralen Membranen begrenzen. Der wechselseitige Antagonismus von Scribble-Komplex und den apikal lokalisierten Crumbs- und Par-Komplexen ermöglicht die Etablierung einer asymmetrischen Achse und somit die Kontrolle der apiko-basalen Zellpolarität in *Drosophila* und Mensch (Bilder *et al.*, 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003; Goldstein und Macara, 2007; Yamanaka *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2006). So wird beispielsweise die apikale Lokalisation des Scribble-Komplexes durch eine aPKC-vermittelte Phosphorylierung von Lgl-1/2 ausgeschlossen, da phosphoryliertes Lgl vom Zellkortex weg dissoziiert. Weitere Ausschlussmechanismen sorgen dafür, dass unterschiedliche Polaritätskomplexe nicht miteinander interferieren. Es bilden sich apikale und basolaterale Domänen, die nicht miteinander überlappen.

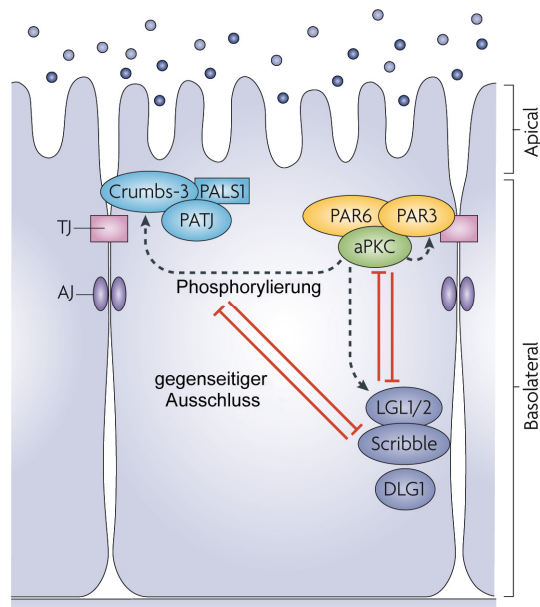


Abbildung 4. Etablierung und Aufrechterhaltung der epithelialen apiko-basalen Zellpolarität durch differenzielle Lokalisation von Par-, Crumbs- und Scribble-Komplexen. In einer Vielzahl verschiedener Organismen werden Polarisierungsprozesse durch konservierte Polaritätskomplexe reguliert. Zu den drei Hauptpolaritätskomplexen gehören der Par-Komplex (Par-3/Par-6/aPKC), sowie der Crumbs- (Crumbs-3/Pals/Patj) und Scribble-Komplex (Scribble/Dlg/Lgl). Alle drei Polaritätskomplexe spielen eine wichtige Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen. Zu diesen gehören die asymmetrische Zellteilung, Zellmigration und -proliferation sowie die neuronale und epitheliale Polarisation. Die funktionelle Abgrenzung der apikalen und basolateralen Domänen erfolgt durch wechselseitigen Ausschluss von basolateral lokalisiertem Scribble-Komplex und den apikalen Crumbs- und Par-Komplexen. Erläuterung der Abkürzungen: Par: *partitioning defective*; aPKC: *atypical protein kinase*; Pals-1: (*protein associated with Lin-7*)-1; Patj: *Pals-1-associated tight-junction protein*; Lgl-1/2: *lethal giant larvae 1/2*; Dlg: *discs large*; TJ: *tight junctions*; AJ: *adherens junctions*. Modifiziert nach (Iden und Collard, 2008).

1.5 Scribble-Komplex

Das *scribble* (*scrib*) Gen wurde in *Drosophila melanogaster* bei dem Versuch identifiziert, maternale Effektmutationen zu analysieren, welche verschiedene Bereiche der epithelialen Morphogenese wie Zelladhäsion, -form und -polarität stören (Bilder und Perrimon, 2000). Diese gravierenden Defekte beeinflussen die Organisation der Monolayer des Epithelgewebes und führen zu Zellen, die abgerundet sind und eine unregelmäßige Form aufweisen. Zudem sind apikal lokalisierte Proteine wie auch *Adherens Junctions* Proteine in *scribble* mutierten Tieren fehlerhaft an der basolateralen Zelloberfläche lokalisiert. Scribble bildet mit zwei weiteren Polaritätsproteinen, Disc Large (Dlg) und Lethal Giant Larvae (Lgl), einen als Scribble-Komplex bezeichnetes funktionelles Modul. Der Verlust dieser Proteine, sowie der damit einher gehende Verlust der Zellpolarität ist ein wichtiges Merkmal für Krebs und ist eng mit einer unkontrollierten Zellproliferation verbunden (Bilder *et al.*, 2000; Vasioukhin, 2006). Studien belegten zudem den konzertierten Einfluss aller drei Proteine auf die Regulation der Epithelstruktur und Zellproliferation. Des Weiteren wiesen *lgl*, *scribble* und *dlg* Mutanten von *Drosophila* ähnliche Phänotypen auf. Es konnte somit belegt werden, dass alle drei Proteine im selben Signalweg wirken (Bilder *et al.*, 2000).

Das Scribble Protein beinhaltet 16 N-terminale Leucin-reiche Wiederholungen (*leucine-rich repeats*, LRR), vier PSD-95, Discs large und ZO-1 (PDZ) Domänen (Bryant und Huwe, 2000) sowie ein uncharakterisiertes C-terminales Ende (Humbert *et al.*, 2003; Bilder, 2004). Scribble wird daher als ein Mitglied der LAP-Proteinfamilie (LRR and PDZ) bezeichnet. Beide Domänen, LRR und PDZ, bestimmen maßgeblich die Lokalisation von Scribble an die basolaterale Epithelmembran (Navarro *et al.*, 2005; Nagasaka *et al.*, 2006). In nicht-polarisierten Zellen bindet Scribble über die PDZ Domänen 3 und 4 an das C-terminale Motiv von ZO-2, welches wiederum mit unterschiedlichen *Tight Junction* Markern (ZO-1, Occludin und Claudin) interagiert (Metais *et al.*, 2005; Gumbiner *et al.*, 1991; Itoh M *et al.*, 1999). In polarisierten Säugerzellen ist Scribble mit β -Catenin kolokalisiert, einem Marker für *Adherens Junctions* (Metais *et al.*, 2005; Vasioukhin, 2006). In *Drosophila* hingegen bindet Scribble an den *Septate Junctions*, die an der Grenzfläche von apikaler und basolateraler Membran lokalisiert sind. *Septate Junctions* sind funktionelle Analoge zu den *Tight Junctions* der Vertebraten (Bryant, 1997). Ludford-Menting *et al.* konnten nachweisen, dass die zuvor in Epithelzellen gefundenen Polaritätskomplexe auch in polarisierten T-Zellen anzutreffen sind, dort differenziell lokalisiert vorliegen und die Polarität und Funktion der Zelle regulieren (Ludford-Menting *et al.*, 2005). Die Lokalisation von Scribble an die Zellmembran ist in T-Zellen im

Gegensatz zu Epithelzellen nicht von Zell-Zell Bindeproteinen abhängig. In motilen, polarisierten T-Zellen akkumuliert Scribble im Uropod und spielt zudem eine Rolle in der Migration und Antigenpräsentation der Zelle sowie in der differenziellen Lokalisation weiterer Polaritätskomponenten. Von dem Polaritätsprotein Dlg sind in Säugern fünf eng verwandte Homologe bekannt (Dlg 1-5). Dlg enthält drei PDZ Domänen und ist Mitglied der membranassoziierten Guanylatkinase (MAGUK) Proteinfamilie. Diese ist zum einen durch eine Src Homologie 3 (*Src homology 3*, SH-3), durch eine Guanylatkinase-ähnliche (*guanylate kinase-like*, GUK) Domänen und durch eine 4.1 Bindedomäne charakterisiert (Anderson, 1996). Darüber hinaus enthält Dlg-1 eine N-terminale L27 Domäne, welche an MPP-2, MPP-3, MPP-7 und Lin-7 sowie Lin-2/hCask binden kann (Karnak *et al.*, 2002; Stucke *et al.*, 2007; Bohl *et al.*, 2007). Dlg-1 weist gegenüber *Drosophila* die größte strukturelle Homologie auf. Zudem gilt es auch als das am häufigsten untersuchte Dlg Protein in Epithelzellen (McLaughlin *et al.*, 2002). Die Bindung von Dlg-1 und MPP-7 erleichtert die Bildung epithelialer *Tight Junctions*. In Verbindung mit Lin-7 beeinflusst dieser Komplex die Stabilität von Dlg-1 und dessen Verteilung an Zellverbindungen (Assemat *et al.*, 2008; Bohl *et al.*, 2007). Die laterale Verteilung von Dlg-1 wird durch Interaktion der PDZ-1 und PDZ-2 Domänen und der Hakendomäne mit dem Zytoskelettprotein 4.1 reguliert (Lue *et al.*, 1996). In Madin-Darby Epithelzellen des Hundes (*Madin-Darby canine kidney*, MDCK) spielt in diesem Prozess zudem die Assoziation von Dlg-1 mit dem MAGUK Protein Lin-2/hCask eine zentrale Rolle (Lee *et al.*, 2002a). Diese wird über die L27N Domäne von Cask und der L27 Domäne von Dlg-1 vermittelt. In Epithelzellen lokalisiert Dlg-1 ebenso wie Scribble an der basolateralen Zellmembran und assoziiert mit dem kortikalen Zytoskelett. Darüber hinaus reguliert es die apiko-basale Zellpolarität und organisiert Zell-Zell Verbindungen (Bilder, 2001). In *Drosophila* wie auch in Säugerzellen kolokalisieren Dlg und Scribble an der basolateralen Kortex (Bilder und Perrimon, 2000; Dow *et al.*, 2003). Eine physikalische Interaktion beider Proteine wurde jedoch bislang nur in *Drosophila* nachgewiesen. Sie wird über das Linkerprotein GUK-Holder vermittelt, das an die GUK-Domäne von Dlg und an die zweite PDZ-Domäne von Scribble bindet (Mathew *et al.*, 2002). Obwohl Dlg-1 in neuronalen und epithelialen Zellen gut charakterisiert wurde, ist bisher wenig darüber bekannt, wie das Protein die Polarität von T-Zellen moduliert. Dlg-1 tritt im Uropod von T-Zellen auf sowie transient an der immunologischen Synapse während der Antigenpräsentation (Cullinan *et al.*, 2002; Xavier *et al.*, 2004). Neuere Studien zeigten zudem, dass Dlg-1 den Aktin-vermittelten Aufbau der zellulären Synapse sowie die Effektorfunktionen koordiniert, indem es die Interaktion der

Aktinregulatoren WASP und Zap70 mit der Tyrosinkinase Lck erleichtert (Round *et al.*, 2005).

Lgl ist ein Protein mit einer Größe von 130 kDa, das mehrere kurze WD40 Motive beinhaltet und Sequenzähnlichkeiten mit Zelladhäsionsproteinen aufweist. Wie der Name bereits impliziert, bestehen die WD40 Domänen aus jeweils 40 Aminosäuren und enden häufig mit einem Dipeptid aus Tryptophan und Asparaginsäure (W-D) (Lutzelschwab *et al.*, 1987; Assemat *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Scribble und Dlg, die beide konstitutiv an der Plasmamembran lokalisieren, ist die Lokalisation von Lgl von dessen Phosphorylierungsstatus abhängig (Humbert *et al.*, 2008). Phosphoryliertes Lgl ist inaktiv und kann nicht an der Plasmamembran binden (Wirtz-Peitz und Knoblich, 2006; Yamanaka und Ohno, 2008). Verschiedene Studien zeigten, dass die Phosphorylierung von Lgl in *Drosophila* und Säuger durch dessen Interaktion mit aPKC des Par-Komplexes vermittelt wird und von der Bindung an aPKC und Par-6 abhängt (Betschinger *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003). Physikalische Wechselwirkungen von Lgl mit anderen Proteinen des Scribble-Komplexes sind trotz des gemeinsamen genetischen Signalwegs nur schwer nachweisbar. Kallay *et al.* berichteten jedoch, dass Lgl und Scribble möglicherweise miteinander interagieren und dass sich diese Assoziation über die LRR-Domänen von Scribble ereignet (Kallay *et al.*, 2006). Über die Funktion von Lgl in T-Zellen ist im Gegensatz zu den Polaritätsproteinen Scribble und Dlg bislang nichts bekannt.

1.6 Lethal giant larvae (lgl)

Das Gen *lethal giant larvae (lgl/l(2)gl)* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist das erste in der Literatur beschriebene Tumorsuppressorgen. Es kontrolliert die Zellproliferation und -differenzierung und ist darüber hinaus an der Regulation der Zellpolarität und Gewebemorphologie beteiligt (Gateff und Mechler, 1989; Mechler und Strand, 1990). Das kodierte Lgl Protein lokalisiert im Zytoplasma und an der lateralen Plasmamembran, wo es in einem Komplex gebunden vorliegt. Dieser ist am Erhalt der Zellpolarität sowie der epithelialen Integrität beteiligt. Weiterhin interagiert das Lgl Protein mit dem Nicht-Muskel Myosin-II, einer Komponente des Zytoskelettnetzwerks (Strand *et al.*, 1994b; Strand *et al.*, 1994a).

Die Entdeckung des Gens geht ursprünglich auf die Studien von Bridges im Jahr 1933 zurück (Bridges und Brehme, 1944). Weitere grundlegende Untersuchungen wurden nachfolgend in

den siebziger Jahren von Elisabeth Gateff an mutanten Allelen von *lgl* vorgenommen. Sie konnte nachweisen, dass rezessive Mutationen des *lgl* Locus während der Embryonal- oder Larvalentwicklung die Ausbildung von neoplastischen Tumoren in den adulten optischen Neuroblasten des Larvengehirns hervorrufen sowie in den Imaginalscheiben (Gateff, 1978). Darüber hinaus zeigten diese Zellen einen Verlust der apiko-basalen Polarität und waren nicht in der Lage, sich auszudifferenzieren. Die schnelle und autonome Zellproliferation in Gehirn und Imaginalscheiben der mutanten Larven führte zu aufgeblähten Phänotypen („*giant larvae*“). Diese starben noch vor Eintritt in die Metamorphose (de Lorenzo *et al.*, 1999a). Die Klonierung und vorläufige molekulare Charakterisierung von *lgl* erfolgte anschließend durch Mechler *et al.* (Mechler *et al.*, 1985; Opper *et al.*, 1987; Mechler *et al.*, 1989). Durch Einbringen eines klonierten wildtypischen *lgl* Gens in entsprechende Mutanten wurde die Tumorbildung unterdrückt und der Nachweis erbracht, dass *lgl* Tumorsuppressoreigenschaften besitzt. Neoplastische Tumore, die durch Mutation von *lgl* in epithelialen Geweben entstehen, sind durch einen Verlust der epithelialen apiko-basalen Zellpolarität, der Proliferationskontrolle und der Zellmigration charakterisiert (Humbert *et al.*, 2008). Das unkontrollierte Gewebewachstum in *lgl* Mutanten weist viele gemeinsame Eigenschaften mit humanen Tumoren auf. Hierzu gehören der Verlust der Zellpolarität, der Zellform sowie die Unfähigkeit zur Differenzierung (Wirtz-Peitz und Knoblich, 2006).

1.6.1 Konservierung von Lgl in Eukaryoten

Lgl liegt in Eukaryoten hochkonserviert vor. Bislang wurden Homologe von *lgl* in Spezies wie der Hefe, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, Insekten, Zebrafisch, Maus und Mensch entdeckt (Strand, 1998; Sonawane *et al.*, 2005; Tomotsune *et al.*, 1993). Zwischen den Spezies Säuger und *Drosophila* ist Lgl auch funktionell konserviert. So wurde nachgewiesen, dass die Expression von humanem Lgl-1 (Hugl-1) in homozygoten *Drosophila lgl* Mutanten die Tumorsuppressorfunktion von Lgl sowie die Viabilität wiederherstellt (Grifoni *et al.*, 2004).

In Hefe sind mit *sro7* und *sro77* zwei funktionell redundante Homologe von *Drosophila lgl* bekannt. Beide Proteine der kodierenden Gene enthalten ähnliche funktionelle Domänen wie etwa das vom *Drosophila* Tumorsuppressorgen kodierte Lgl Protein. Doppelt-mutante *sro7/77* Hefezellen zeigten partielle Defekte in der Organisation des polarisierten Aktinzytos-

keletts und einen kältesensitiven Wachstumsphänotypen (Kagami *et al.*, 1998). Die *sro7/77* Gene wiesen darüber hinaus eine negative genetische Interaktion mit Nicht-Muskel Myosin-II (Myo2) und eine positive Interaktion mit Myosin vom Typ V auf (Myo2). Studien an Salzsensitiven Mutanten von *S. cerevisiae* erbrachten zudem den Nachweis, dass beide Gene in der Kationen-Homöostase involviert sind. Die Deletion von *sro7* steigerte die Sensitivität der Zellen gegenüber Na^+ , während der Verlust beider Gene eine Na^+ -Hypersensitivität hervorrief und die Sensitivität gegenüber Li^+ und K^+ erhöhte (Larsson *et al.*, 1998). Lehmann *et al.* identifizierten *sro7* und *sro77* als Bindepartner des SNARE Plasmamembranproteins Sec9, welches eine wichtige Rolle in der Regulation der polarisierten Exozytose einnimmt (Lehman *et al.*, 1999).

Mit *mgl-1* (*lgl-1*) und *mgl-2* (*lgl-2*) wurden auch in der Maus als erstem Säuger zwei homologe Gene von *lgl* beschrieben (Tomotsune *et al.*, 1993). Mgl-1 wird ubiquitär und mit besonderer Präferenz im Gehirn exprimiert. Dem gegenüber ist die Expression von Mgl-2 eingeschränkt und tritt vornehmlich in Niere, Leber und Magen auf. Beide Proteine haben untereinander eine Ähnlichkeit von 71% (Klezovitch *et al.*, 2004). *Mgl-1^{-/-}* Mäuse wiesen schwere Hirndysplasien auf, welche durch einen Verlust der Zellpolarität bedingt waren. Darüber hinaus zeigten sie in neuronalen Zellen ein Versagen der asymmetrischen Zellteilung. Dieses Versagen steht im Verdacht, für die Hyperproliferation und den Mangel an Differentiation der Zellen verantwortlich zu sein. Weiterhin schienen *mgl-1^{-/-}* Embryos bis zum Tag 9,5 normal zu sein, entwickelten jedoch ab Tag 12,5 massive morphologische Abnormalitäten im Gehirn (Klezovitch *et al.*, 2004). In einem transgenen Mausmodell für das okuläre Adenokarzinom, welches vom retinalen Pigmentepithel ausgeht, konnte nachgewiesen werden, dass eine Mislokalisierung von Lgl-1/Mgl-1, Dlg-1 und Scribble mit frühen Stufen der Augentumorigenese korrelierten. Zusätzlich war die Mislokalisierung der Suppressorgene mit einer verminderten Expression der Proteine assoziiert (Vieira *et al.*, 2008).

Im Menschen wurden mit *hugl-1* (*llgl-1*, *lgl-1*, *mlgl-1*, *dlg-4*) und *hugl-2* (*llgl-2*, *lgl-2*, *mlgl-2*, *hgl*) zwei humane Homologe des *Drosophila lgl* Gens identifiziert. Die kodierten Proteine Hugl-1 (115 kDa) und Hugl-2 (113 kDa) weisen mit 62,5% eine signifikante Sequenzhomologie zu Lgl aus *Drosophila* auf (Assemat *et al.*, 2008; Froldi *et al.*, 2008). Zwei weitere Lgl-verwandte Proteine sind die zum *Drosophila* Protein Tomosyn homologen und an Syntaxin bindenden Proteine Hugl-3 (Lgl-3) und Hugl-4 (Lgl-4) (Katoh, 2004). Von allen vier Homo-

logen sind Hugl-1 und Hugl-2 die in der Literatur am umfassendsten untersuchten Proteine. Nachfolgend wird daher näher auf diese beiden Proteine eingegangen.

1.6.2 Hugl-1 und Hugl-2

Beide humanen Homologe von *hugl* sind auf Chromosom 17 anzutreffen. *Hugl-1* ist an Position 17p11.2-12 und *hugl-2* an Position 17q24-q25 verortet (Strand *et al.*, 1995; Assemat *et al.*, 2008). Beide Gene kodieren für aus 1064 (Hugl-1) und 1020 (Hugl-2) Aminosäuren bestehende Proteine (NP_004131.3; NP_001026973.1), die gegenüber dem *Drosophila*-Widerpart Lgl signifikante Sequenzhomologien aufweisen. Dies erklärt die funktionelle Konservierung zwischen den Proteinen beider Spezies. Zu den übereinstimmenden Domänen zwischen Mensch und *Drosophila* gehören Homooligomerisierungsdomänen, Phosphorylierungsstellen und charakteristische WD40 Wiederholungen (Kalmes *et al.*, 1996; Grifoni *et al.*, 2004). Anhand von Substitutionsexperimenten konnten Grifoni *et al.* auch praktisch nachweisen, dass Hugl-1 die Funktion von Lgl in *lgl*-mutierten *Drosophila* Fruchtfliegen kompensierte. Dessen Expression verhinderte die Hyperproliferation der Zellen, und bestätigte zugleich den hohen Grad der funktionellen Konservierung zwischen Lgl aus dem Säuger und *Drosophila* (Grifoni *et al.*, 2004). Im Menschen weisen Hugl-1 und Hugl-2 daher, ebenso wie auch Lgl in *Drosophila*, Tumorsuppressoreigenschaften auf.

Eine Reihe von Hinweisen geben mittlerweile Anlass zu der Annahme, dass Polaritätsproteine nicht nur die epitheliale Morphogenese, sondern auch die Tumorigenese in Säugern regulieren (Humbert *et al.*, 2003; Huang und Muthuswamy, 2010). Mehrere Studien demonstrierten den Zusammenhang eines Verlustes oder einer Reduktion von Hugl-1 oder Hugl-2 mit dem Auftreten von humanen Karzinomen. Häufig ist die Gewebetransformation während der Tumorigenese mit einem Verlust der Zell- und Gewebepolarität verbunden (Huang und Muthuswamy, 2010). Eine Untersuchung des Transkriptionsprofils von *hugl-1* in verschiedenen humanen Tumorproben demonstrierte entweder die Reduktion oder den Verlust des Transkripts in Brust- (76%), Lungen- (63%), Prostata- (53%), Eierstockkarzinomen (50%) sowie in Melanomen (40%) (Kagami *et al.*, 1998; Kuphal *et al.*, 2006). Ebenso lag die Expression von *hugl-1* in 75% aller Tumorproben aus Patienten mit Kolonkarzinom reduziert vor. Die Reexpression von Hugl-1 in HEK293 Zellen steigerte dagegen die Zelladhäsion und erbrachte den Nachweis, dass ein signifikanter kausaler Zusammenhang zwischen dem Hugl-1 Expressionsstatus und der Zelladhäsion besteht (Schimanski *et al.*, 2005). Lu *et al.* berichteten von

anormalem *Splicing* von *hugl-1* Transkripten, welche mit einer Progression des hepatozellulären Karzinoms im Zusammenhang standen. Solche Transkripte kodieren abnormal verkürzte Hugl-1 Proteine, denen eine oder mehrere der konservierten WD40 Wiederholungsmotive fehlen. In Nacktmäusen führte die Überexpression der anormalen Transkripte zur Zunahme der Migration, Invasion und Tumorigenizität (Lu *et al.*, 2009). Zusammengenommen belegen diese Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Verlust von Hugl-1 und einem fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung. Geringe Expressionsspiegel des Proteins korrelieren hierbei mit invasiveren und aggressiveren Tumoren sowie Lymphknotenmetastasen.

Über Hugl-2, dem Homologen von Hugl-1, wurde in der Literatur bislang wenig berichtet. Ein Zusammenhang zwischen Tumorigenese und einem Verlust der Polarisation humaner Epithelgewebe wurde jedoch auch hier nachgewiesen. So liegt Hugl-2 in Kolon- und Brusttumoren vermindert vor. Als kritischer Faktor für die Ausprägung des epithelialen Phänotyps ist der Verlust von Hugl-2 bedeutsam für Metastasierungsprozesse. Vorläufige Xenograft-Experimente an Nacktmäusen wiesen ein vermindertes Metastasierungspotenzial von Hugl-2 überexprimierenden HEK293 Zellen nach. Diese Ergebnisse bestärkten die Rolle des Hugl-2 Verlustes für die Progression maligner Tumore (Spaderna *et al.*, 2008). Eine neuere immunhistochemische Studie kam zu dem Schluss, dass das Zellpolaritätsprotein Hugl-2 in epithelialen Dysplasien und Adenokarzinomen des Magens anormal lokalisiert vorliegt oder aber vollständig verloren ist. Der vollständige Verlust von Hugl-2 wurde im diffusen-Typ Adenokarzinom signifikant häufiger beobachtet als im intestinalen Typus (79% vs. 48%) (Lisovsky *et al.*, 2009). Die anormale Expression von Hugl-2 oder dessen Verlust eignet sich daher möglicherweise als ein potentieller Biomarker für die Unterscheidung von niedergradigen, intraepithelialen Pankreasneoplasien, welche Hugl-2 normal exprimieren, von hochgradigen intraepithelialen Pankreasneoplasien und duktalem Pankreasadenokarzinomen (Lisovsky *et al.*, 2010).

1.6.3 Struktur, Funktion und Rolle von Lgl

Die N-terminale Region des Lgl Proteins enthält in unterschiedlichen Spezies mehrere kurze WD40 Wiederholungen. Die N-terminale Region der Homologe Lgl-1 und Lgl-2 besteht aus sechs, beziehungsweise aus fünf WD40 Wiederholungen. Häufig zeichnen sich diese durch

ein Dipeptid aus Tryptophan (W) und Asparaginsäure (D) am Motivende aus (Neer *et al.*, 1994; Li und Roberts, 2001) und bilden in Einheiten von jeweils 4-16 WD40 Motiven zwei aufeinander folgende β -Propellerstrukturen (Abbildung 5). WD40 Domänen sind oft in die Koordination von Multiproteinkomplexen eingebunden, indem sie als Gerüst funktionieren. Die Regionen zwischen den einzelnen WD40 Sequenzen ermöglichen gleichzeitige Protein-Interaktionen mit mehreren Effektormolekülen wie beispielsweise Myosin-Inhibitoren. Zusätzlich erlauben sie eine Interaktion mit der Plasmamembran (Vasioukhin, 2006; Betschinger *et al.*, 2005) (Abbildung 5).

Der C-Terminus des Proteins interagiert mit t-SNARE Proteinen, die in der Exozytose involviert sind. In *Drosophila* vermitteln diese die Assoziation von Lgl an das Aktinzytoskelett (Gangar *et al.*, 2005; Müsch *et al.*, 2002; Strand *et al.*, 1994b; Betschinger *et al.*, 2005). Außer in der Hefe beinhaltet Lgl in allen Spezies mehrere konservierte Serin Reste, welche Zielstrukturen für das Par-Komplex Protein atypische Proteinkinase C (aPKC) darstellen. Diese Lgl-spezifische Domäne, welche die N-terminale von der weniger konservierten C-terminalen Region trennt, ist charakteristisch für die Lgl Proteinfamilie und bestimmt maßgeblich die Funktion des Proteins. Zu den physiologischen Bindepartnern von Lgl gehört ein Komplex aus Par-6 und aPKC (Par-6/aPKC). In der Regulation der Lgl Funktion spielt dieser eine wichtige Rolle. Par-6 bindet an die am N-Terminus befindliche und aus WD40 Einheiten bestehende β -Propellerstruktur von Lgl, während aPKC die an Position 656, 660 und 664 befindlichen Serinreste phosphoryliert (Plant *et al.*, 2003; Betschinger *et al.*, 2003). Durch Phosphorylierung der konservierten Serinreste in *Drosophila* an Position 656, 660 und 664 wird eine Konformationsänderung in Lgl induziert, die eine intramolekulare Aneinanderlagerung des C- und N-terminalen Endes hervorruft und in einer autoinhibitorischen Inaktivierung des Proteins resultiert (Betschinger *et al.*, 2005) (Abbildung 5). Funktionell inaktiviertes Lgl Protein verlässt daraufhin seine Assoziation mit dem Aktinzytoskelett und der Membran und kumuliert im Zytoplasma. Im Epithelgewebe von *Drosophila* und Säuger kommt es an der apikalen Domäne daher zum Ausschluss von Lgl. Im Gegenzug sorgt Lgl an der basolateralen Region für die Inaktivierung von aPKC. Der wechselseitige Ausschluss beider Proteine trägt zum Erhalt der apiko-basalen Zellpolarität bei und sorgt für eine korrekte Epithelfunktion und -struktur (Grifoni *et al.*, 2007).

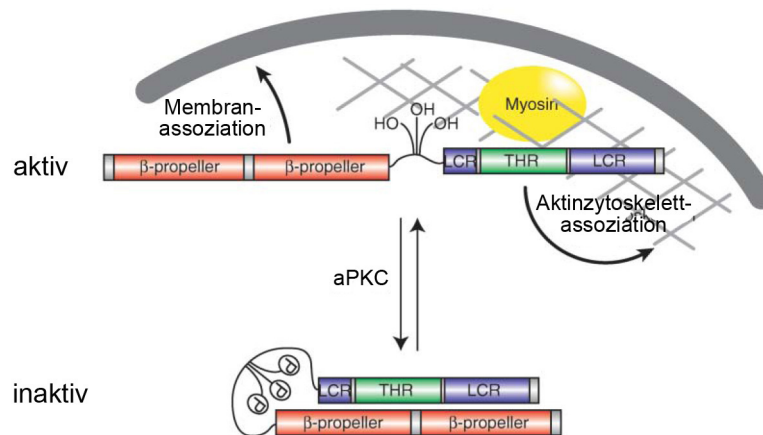


Abbildung 5. Modellhafte Darstellung der phosphorylierungsabhängigen Regulation von Lgl in *Drosophila*. Im unphosphorylierten Zustand ist Lgl über den C-Terminus mit Myosin und dem Zytoskelett assoziiert. Der N-Terminus des Proteins interagiert dagegen über β -Propellerstrukturen, die jeweils aus 4-16 WD40 Motiven bestehen, mit der Plasmamembran. Die atypische Proteinkinase C (aPKC) ist Bestandteil des Par-Polaritätskomplexes. Durch Phosphorylierung konservierter Serin-Reste induziert diese eine Änderung der Konformation in Lgl. Die N- und C-terminalen Enden des Proteins assoziieren miteinander und rufen eine funktionelle Inaktivierung von Lgl hervor. Der C-Terminus von Lgl kann nun nicht mehr mit dem Zytoskelett assoziieren, so dass das Protein in das Zytosol freigesetzt wird. LCR: *Low complexity region*; THR: *Tomosyn homology region*. Modifiziert nach (Betschinger *et al.*, 2005).

1.6.4 Lgl in Etablierung und Erhalt der Zellpolarität

Viele Erkenntnisse darüber, wie Lgl zur Etablierung und zum Erhalt der apiko-basalen Zellpolarität beiträgt, stammen aus Versuchen an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. In Epithelzellen bildet sich die apiko-basale Polaritätsachse durch Ausbildung zweier voneinander abgetrennter Domänen, welche sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden. An ihren Grenzflächen sind *Adherens Junctions* und *Septate Junctions*, in Säugern *Tight Junctions*, lokalisiert. In *lgl* mutanten Zellen kommt es zu einer fehlerhaften Lokalisation von Determinanten der apikalen Membrandomäne hin zur basolateralen Domäne. Gleichzeitig geht der Vorgang mit einer fragmentierten Verteilung der *Adherens Junctions* einher (Bilder *et al.*, 2000; Hutterer *et al.*, 2004). Mutanten der Gene *scribble* und *dlg*, die zusammen mit *lgl* in der Regulation der Zellpolarität involviert sind und genetisch miteinander interagieren, bringen einen ähnlichen Phänotyp hervor (Bilder *et al.*, 2000). Die in *lgl* Mutanten beobachtete basale Umverteilung von Determinanten der apikalen Domäne konnte auch durch Überexpression von Crumbs und aPKC, Proteinen apikal lokalisierter Crumbs- und Par-Polaritätskomplexe, ausgelöst werden (Bilder, 2004).

Für die Ausbildung der apikalen und basalen Domänen in Epithelzellen und Neuroblasten von *Drosophila* ist das Zusammenspiel der Polaritätskomplexe Scribble, Par und Crumbs von

besonderer Bedeutung. Das Scribble/Dlg/Lgl Polaritätsmodul definiert die Identität der basolateralen Domäne und antagonisiert die Aktivität der Polaritätskomplexe aPKC/Par-6/Par-3 und Crumbs/Pals/Patj, welche den Erhalt der apikalen Domäne regulieren (Bilder *et al.*, 2000; Bilder *et al.*, 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003). Wichtige Erkenntnisse darüber, wie das zum Scribble-Komplex gehörende Protein Lgl die Zellpolarität und damit die differenzielle Lokalisation von Zellproteinen beeinflusst, wurden aus Arbeiten von Betschinger *et al.* und Hutterer *et al.* gewonnen. Beide Arbeitsgruppen widmeten sich mitunter der Erschließung des wechselseitigen Antagonismus zwischen Proteinen des Scribble/Dlg/Lgl und aPKC/Par-6/Par-3-Komplexes (Betschinger *et al.*, 2003; Hutterer *et al.*, 2004). In neu gebildeten Epithelzellen von *Drosophila* lagert sich ein Komplex aus Par-6 und aPKC (Par-6/aPKC) an der apikalen Domäne an und leitet die Etablierung der epithelialen Zellpolarität ein. Entscheidend für die Lokalisation des Komplexes ist die Interaktion von Par-6 mit der aktivierten GTPase Cdc42. In diesem Stadium hat das Zytoskelettprotein Lgl keinen Einfluss auf die Lokalisation des Komplexes selbst, sondern sorgt stattdessen für den Erhalt der Par-6 Lokalisation (Hutterer *et al.*, 2004). Während der Interphase bindet Lgl an den apikal lokalisierten aPKC/Par-6 Komplex und inhibiert die Funktion von aPKC. Hierdurch wird – wie auch an Säugerzellen gezeigt werden konnte – der Eintritt des PDZ Domänen-Proteins Par-3 (Bazooka) in den Komplex verhindert (Wirtz-Peitz *et al.*, 2008; Yamanaka *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2006). Die durch Cdc42 über Par-6 aktivierte aPKC phosphoryliert Lgl und überführt das Protein in eine inaktive Form. Hierdurch verliert Lgl seine Affinität zu der apikalen Membrankortex und wird in das Zytosol freigesetzt. Die auf die apikale Membrandomäne begrenzte Lokalisation des Par-Komplexes sorgt daher durch Ausschluss von Lgl für eine auf die basolaterale Domäne beschränkte Funktionalität des Proteins. Im Gegenzug verhindert Lgl die basolaterale Verteilung des aPKC/Par-3/Par-6 Komplexes (Betschinger *et al.*, 2003). Lgl trägt so zur Bildung der basolateralen Domäne bei und beeinflusst die korrekte Positionierung epithelialer *Junction*-Proteine (Tanentzapf und Tepass, 2003; Hutterer *et al.*, 2004; Borg, 2004). Wie zentral die aPKC-vermittelte Phosphorylierung von Lgl für die Funktionalität und Lokalisation des Proteins sowie für die Lokalisation weiterer Lgl-assoziiierter Proteine ist, zeigte sich durch Expression einer nicht-phosphorylierbaren mutanten Form von Lgl (Lgl-3A). Diese Form war nicht nur auf die basale Membran beschränkt, sondern war zudem nicht in der Lage, Polaritätsdefekte *lgl*-mutanter Zellen auszugleichen. Dies hatte eine undifferenzierte Verteilung zellulärer Determinanten zur Folge (Betschinger *et al.*, 2003; Hutterer *et al.*, 2004).

Die Regulation der apiko-basalen Zellpolarität durch Lgl spielt auch für die asymmetrische Zellteilung in *Drosophila* eine besondere Rolle. Beide Prozesse umfassen die Lokalisation spezifischer Proteine in Subdomänen der Zellmembran. Mutationen in *lgl* verhindern jedoch die polarisierte Verteilung dieser Proteine (Wirtz-Peitz und Knoblich, 2006). In Zellen, die sich asymmetrisch teilen, werden als Schicksalsdeterminanten bezeichnete Proteine ungleich in nur eine der beiden Tochterzellen abgetrennt (Jan und Jan, 1998; Knoblich, 2008). Ein gut erforschtes Beispiel hierfür sind nichtdifferenzierte Neuroblasten in *Drosophila*. Diese entstehen aus polarisiertem Epithelgewebe und teilen sich während der Neurogenese in eine sich selbst erneuernde Tochterzelle und in eine Ganglienmutterzelle (*ganglion mother cell*, GMC). Ein apikal lokalisierter Komplex aus Par-3/Par-6/aPKC/Inscutable/Pins/G α /G $\beta\gamma$ sorgt während der Teilung der Neuroblasten in der Mitosephase für die Ausrichtung der Mitosespindel. Diese dirigiert die Adapterproteine *Partner of Numb* (Pon) und Miranda, aber auch die Schicksalsdeterminanten Numb und Prospero vom Zytoplasma zur basalen Membran, aus der die GMC hervorgeht (Wodarz *et al.*, 1999; Petronczki und Knoblich, 2001; Vasioukhin, 2006). Für die kortikale Rekrutierung und asymmetrische basale Lokalisation der Schicksalsdeterminanten während der Mitose in Neuroblasten ist das Tumorsuppressor- und Polaritätsprotein Lgl von grundlegender Bedeutung. Erst die apikale Phosphorylierung von Lgl durch aPKC des Par-Komplexes und dessen folgende Inaktivierung ermöglicht die asymmetrische Lokalisierung der Zelldeterminanten an der basalen Zellmembran. Bei einem Verlust von Lgl kommt es dagegen zu einer fehlerhaften basalen Rekrutierung der Schicksalsdeterminanten. Diese werden dann nicht asymmetrisch, sondern zu gleichen Teilen an die Tochterzellen vererbt (Ohshiro *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2000).

Erst in den letzten Jahren wurde entdeckt, auf welche Weise Lgl die asymmetrische Lokalisation von Zelldeterminanten während der Mitosephase beeinflusst. Studien von Mayer *et al.* zeigten, dass der rapide Austausch der Zelldeterminanten Numb und Pon zwischen Zytoplasma und Zellkortex durch das antagonistisierende Wechselspiel von aPKC und Lgl reguliert wird (Mayer *et al.*, 2005). Die Autoren vermuteten eine durch aPKC und Lgl asymmetrisch verteilte hochaffine, kortikale Bindestelle, welche für die asymmetrische Lokalisation der Schicksalsdeterminanten während der Mitose verantwortlich ist. Wie sich herausstellte, wurde die Plasmamembran-Affinität von Numb, Pon und Miranda durch aPKC-vermittelte Phosphorylierung reguliert. Die Phosphorylierung von Numb durch aPKC auf einer Seite der Zelle verhinderte dessen Membranlokalisation und führte zur Anreicherung an der gegenüberliegenden Seite der Plasmamembran (Neumuller und Knoblich, 2009; Smith *et al.*, 2007; Wirtz-

Peitz *et al.*, 2008). Wie verläuft dieser Vorgang jedoch mechanistisch? Während der Interphase bildet Lgl einen Komplex mit aPKC und Par-6 und inhibiert dessen Aktivität. Mit Eintritt in die Mitosephase wird Par-6 durch die Kinase Aurora-A phosphoryliert und aktiviert infolgedessen aPKC. Diese wiederum phosphoryliert Lgl und setzt das Protein durch Verminderung der Bindeaffinität aus dem Komplex und der Zellkortex in das Zytoplasma frei (Wirtz-Peitz *et al.*, 2008). Die Freisetzung von Lgl aus der Bindung mit aPKC/Par-6 ermöglicht den Eintritt des PDZ-Domänen-Proteins Par-3 (Bazooka) in den Komplex, wo es als mögliches Adapterprotein eine Verbindung von Kinase und Numb-Protein herstellt (Yamanaka *et al.*, 2006; Knoblich, 2010). Die Substratspezifität von aPKC ändert sich und erlaubt die Phosphorylierung der Schicksalsdeterminante Numb sowie dessen Freisetzung von einer Seite der Zellkortex. Numb ist daher asymmetrisch in der Zelle lokalisiert und wird während der Zellteilung ungleich in eine der beiden Tochterzellen abgetrennt. Zusammengefasst liegt die Funktion von Lgl nicht – wie zuvor angenommen – in der Rekrutierung der Zelldeterminanten an die Zellkortex sondern darin, die Substratspezifität und möglicherweise auch die Aktivität von aPKC zu regulieren (Knoblich, 2010). In Übereinstimmung dazu belegten Untersuchungen der aPKC-induzierten polarisierten Lokalisation der Schicksalsdeterminante Miranda, dass die Regulation der aPKC Kinaseaktivität direkt durch Lgl und unabhängig von Myosin-II erfolgt (Atwood und Prehoda, 2009). Das Lgl Polaritätsprotein scheint zudem die Funktion eines Puffers inne zu haben, um die Phosphorylierung von Numb bis zum passenden Zeitpunkt im Zellzyklus zu supprimieren (McCaffrey und Macara, 2009).

Verglichen mit dem Wissen über die Abläufe in *Drosophila melanogaster* ist das Wissen über die epitheliale apiko-basale Zellpolarität in Säugern relativ begrenzt. Untersuchungen an Zellkulturen wiesen eine physikalische und funktionale Bindung von Lgl an einen Polaritätskomplex aus Par-6 und aPKC nach. Lgl wurde an der apikalen Domäne durch aPKC-vermittelte Phosphorylierung inaktiviert, wodurch dessen Aktivität auf die basolaterale Membrandomäne beschränkt wurde (Plant *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2006). In humanen Epithelzellen deckte sich der wechselseitige Ausschluss beider Proteine mit den im *Drosophila* Modell gemachten Beobachtungen. Diese sind zentral für die Etablierung einer korrekten epithelialen Struktur und Funktion (Grifoni *et al.*, 2007). Neben Untersuchungen an kultivierten Säugerzellen wurde die Funktion von Lgl bereits in ersten *in vivo* Experimenten am Gen-*Knockout* Modell der Maus analysiert (Klezovitch *et al.*, 2004).

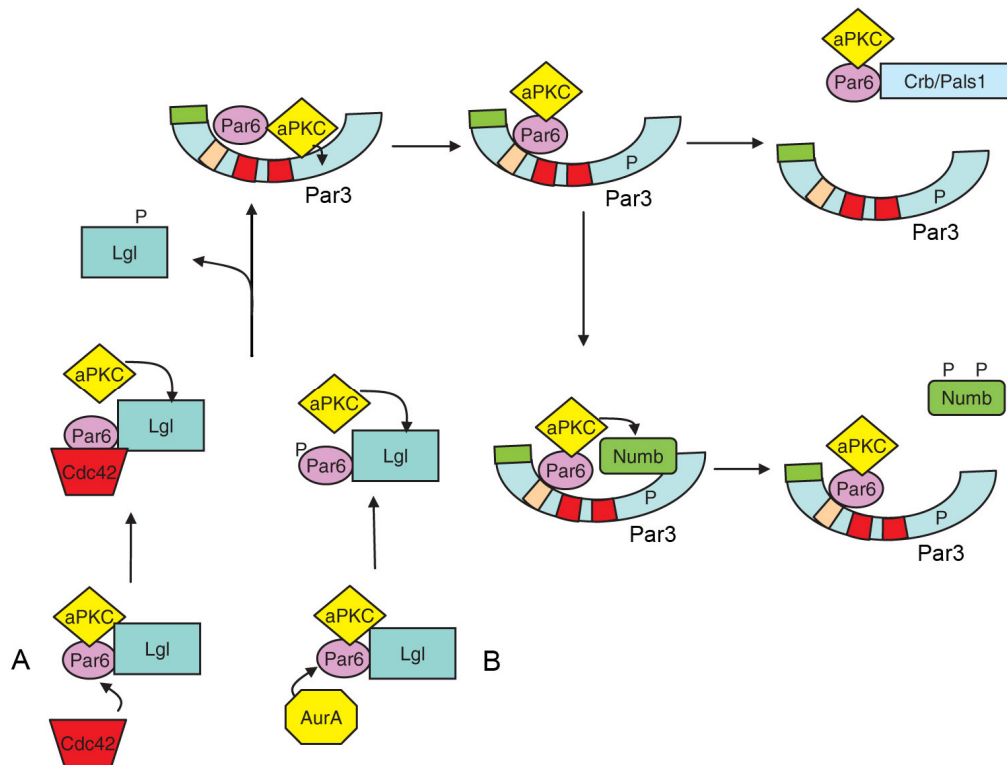


Abbildung 6. Modell für die Interaktion von Lgl mit dem Par-Komplex sowie dessen *Downstream-Funktionen*. Das dargestellte Modell umfasst die bisher bekannten Daten mehrerer Labore. (A) Während der Interphase bindet Lgl an einen Komplex aus aPKC und Par-6 und verhindert den Eintritt von Par-3 in diesen. Die GTPase Cdc42 aktiviert aPKC über das Effektorprotein Par-6, indem es möglicherweise den inhibitorischen Einfluss von Par-6 auf die Kinasefunktion von aPKC vermindert. Lgl wird durch aPKC phosphoryliert und in eine inaktive Form überführt. Es verliert seine apikale Lokalisation an der Membrankortex und wird in das Zytosol freigesetzt. (B) Die Freisetzung von Lgl aus dem Komplex kann auch durch die mitotische Kinase Aurora-A (AurA) erfolgen. Diese nimmt während der asymmetrischen Zellteilung eine Schlüsselfunktion ein. Mit Eintritt in die Mitosephase wird Par-6 durch AurA phosphoryliert und dadurch freigesetzt. Dies führt zur Aktivierung der aPKC und zur nachfolgenden Phosphorylierung und Freisetzung von Lgl aus dem Komplex mit Par-6 und aPKC. Die jeweils durch Cdc42 oder AurA induzierte apikale Freisetzung von Lgl aus dem Par-Komplex erlaubt die Interaktion des Komplexes mit Par-3. aPKC bindet entweder direkt oder indirekt über Par-3 an Par-6. Par-3 dient als Adapterprotein zwischen aPKC und der Schicksalsdeterminante Numb und sorgt für die apikale Phosphorylierung und kortikale Freisetzung von Numb. Da der Par-Komplex initial asymmetrisch verteilt vorliegt, ist auch Numb asymmetrisch in der mitotischen Zelle verteilt und wird ungleich in eine der beiden Tochterzellen abgetrennt. Der Crumbs/Pals-1 Komplex steht mit Numb und Lgl im Wettbewerb um die Bindung zum aPKC/Par-6/Par-3 Komplex. Modifiziert nach (McCaffrey und Macara, 2009).

1.6.5 Lgl als Tumorsuppressor

Neben der grundlegenden Funktion von *lgl* für den Erhalt und Etablierung der Zellpolarität in der epithelialen Morphogenese weisen inzwischen eine Vielzahl experimenteller Daten darauf hin, dass *lgl* einen suppressiven Einfluss auf die Genese neoplastischer Gewebe ausübt. Die Eigenschaft von *lgl* als Tumorsuppressor wurde zuerst im Modellsystem *Drosophila melanogaster* entdeckt. Homozygote *lgl* Mutationen führten dort zu einem Verlust der apiko-basalen Zellpolarität des Epithelgewebes, gefolgt von der Genese neoplastischer Tumore und einem

Verlust der Proliferationskontrolle (Bilder *et al.*, 2000; Agrawal *et al.*, 1995; Gateff, 1978). Mutationen in *lgl* induzierten Neoplasien der Imaginalscheiben in *Drosophila* sowie ein abnormales Wachstum der adulten Flügel und benachbarten wildtypischen Zellen (Agrawal *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde von dem Verlust der epithelialen Struktur sowie von einem überschießenden Wachstum von Imaginalscheiben und Gehirn in *Drosophila* Larven im Entwicklungsstadium berichtet (de Lorenzo *et al.*, 1999b). Woodhouse *et al.* untersuchten das invasive und metastatische Potenzial dieser Tumore (Woodhouse *et al.*, 1998). Durch Transplantation von Zellen mit einer *lgl* Mutation in das Abdomen adulter Tiere zeigten sie erstmals, dass die metastatischen und invasiven Fähigkeiten der entarteten Zellen durch den Verlust von Lgl erhöht werden und es daher häufig zu einer Ausbildung sekundärer Tumore kommt. Die Bedeutung der humanen *Drosophila* Homologen von Lgl, Hugel-1 und Hugel-2, als Suppressoren der Tumorigenese wurde auch im Menschen nachgewiesen (vergleiche Kapitel 1.6.2).

Lange Zeit war unklar, wie der Erhalt der Zellpolarität und die Regulation der Zellproliferation durch Lgl miteinander im Zusammenhang stehen. Neueste Studien zeigen jedoch, dass der Effekt des Polaritätsregulators Lgl sowie dessen Antagonisten aPKC und Crumbs auf Zellproliferation und -überleben über den Salvador/Warts/Hippo Tumorsuppressorsignalweg (SWH) vermittelt wird. Lgl und aPKC sorgen für die korrekte Lokalisation von Hippo/*Ras associated factor* (RASSF) und regulieren hierdurch die Aktivität des transkriptionellen Koaktivators Yorkie (Yki), welcher Zellproliferation und Apoptose beeinflusst. Depletion von Lgl oder Überexpression von aPKC begünstigen die Aktivität von Yki. Crumbs reguliert dagegen die Aktivität von Yki, indem es die Spiegel von Expanded (Ex)/Yki-Komplexen durch Freisetzung von Yki vermindert (Grzeschik *et al.*, 2010b; Grzeschik *et al.*, 2010a; Parsons *et al.*, 2010). Daten aus dem *Drosophila* Modell und Erkenntnisse aus Untersuchungen humaner Epithelgewebe demonstrieren zusammenfassend, dass ein Verlust von *lgl* einen Verlust der Zellpolarität, die Beeinträchtigung der strukturellen Gewebeorganisation sowie die Hyperproliferation, Invasivität und Metastasierung von Zellen hervorruft. Dies qualifiziert *lgl* somit als ein Tumorsuppressorgen (Vasioukhin, 2006; Bilder, 2004).

1.7 Gen-Silencing durch RNA-Interferenz

Die Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) geht auf das Jahr 1990 zurück, als das Einführen pigmentproduzierender Gene in Petunien nicht etwa zur Färbung, sondern – entgegen der Erwartungen – zum Verlust der Blütenfarbe führte (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Einen Durchbruch für das Verständnis dieser Beobachtungen lieferten erst Studien von Fire *et al.* (Fire *et al.*, 1998). Am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) konnte die Gruppe zeigen, dass doppelsträngige RNAs (dsRNAs) über einen *antisense*-Mechanismus sequenzspezifisch mit endogenen mRNA Transkripten hybridisieren und deren spezifischen Abbau verursachen. In den Folgejahren wurden dsRNAs intensiv zu Forschungszwecken in den Modellorganismen *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* eingesetzt. Erste Versuche in Säugerzellen verliefen hingegen erfolglos, bis man erkannte, dass lange, doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 25-30 bp eine unspezifische Interferonantwort in der Zelle auslösen. Diese Immunreaktion ist gegen Virusinfektionen und damit auftretende virale Partikel gerichtet und führt zur Aktivierung einer zellulären, dsRNA-abhängigen Proteinkinase (PKR). Diese verursacht eine vollständige Blockade der Proteinsynthese durch einen unspezifischen Abbau der mRNA (Williams, 1997). Einen bedeutenden Durchbruch auf diesem Gebiet erzielte die Arbeitsgruppe um Thomas Tuschl am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Sie wiesen nach, dass 21-23 Nukleotide umfassende *small interfering RNAs* (siRNAs) in Säugern ein sequenzspezifisches und posttranskriptionelles Gen-Silencing durch Degradation der mRNA hervorrufen (Elbashir *et al.*, 2001). Bei diesem auch als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichneten Mechanismus entstehen siRNA-Duplices aus der Spaltung längerer dsRNAs durch Ribonuklease-III. Diese sind in der Lage, die Expression endogener Gene spezifisch zu supprimieren.

In eukaryotischen Zellen stellt der Mechanismus der RNAi einen natürlichen Vorgang dar, der zur spezifischen Inaktivierung endogener Gene dient und die Expression parasitärer und pathogener Eindringlinge wie Transposons und Viren unterdrückt (Siomi und Siomi, 2009). Neben der RNAi-vermittelten spezifischen Inaktivierung von mRNA werden in der Zelle zum Stilllegen von Genen mindestens zwei weitere dsRNA-abhängige Mechanismen genutzt. Mikro-RNAs (miRNAs) sind endogene, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 19-25 Nukleotiden. Neben dem Abbau der Ziel-mRNA können diese auch die Translation der mRNA reprimieren (*translational silencing*) (Meister, 2007; Cannell *et al.*, 2008). siRNA- und miRNA-vermittelte Signalwege sind nicht strikt voneinander abgegrenzt, sondern können

miteinander wechselwirken. So können miRNAs auch die Degradation der mRNA hervorrufen, oder siRNAs umgekehrt in den Prozess der Translationshemmung eingreifen. Ein weiterer, weniger gut verstandener Signalweg umfasst die transkriptionelle Hemmung der Genexpression durch siRNAs (*transcriptional silencing*). Dieser ist gegen Promotorsequenzen gerichtet und inhibiert die Genexpression durch Chromatinmodifikation oder durch DNA-Methylierung (Lippman und Martienssen, 2004; Morris *et al.*, 2004). Auf den RNAi-Mechanismus zur spezifischen Degradation der mRNA wird im Folgenden näher eingegangen.

Mechanismus der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz

RNA-Interferenz kann durch RNA-Moleküle unterschiedlicher Herkunft ausgelöst werden. Zu diesen gehören etwa Viren-RNA, Transposons, exogen eingeführte dsRNAs, oder auch endogene, kleine nicht-kodierende miRNAs (Rana, 2007). Lange dsRNA, wie virale oder artifiziell eingeführte RNA, initiieren den Prozess der RNAi, indem sie durch das Ribonuklease III (RNase III) Enzym Dicer erkannt und in 21-23 nt kleine siRNA-Intermediate konvertiert werden (Abbildung 7) (Hamilton und Baulcombe, 1999; Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001). Das Säugerprotein Dicer interagiert in diesem Prozess mit dem RNA-Bindeprotein *HIV-1 transactivation responsive element (Tat) RNA-binding protein* (TRBP) und dem dsRNA-Bindeprotein *PKR activating protein* (PACT) und stimuliert auf diese Weise die Spaltung der dsRNA. Hierbei entstehende siRNAs tragen an ihrem 3'-Ende einen Überhang von zwei Nukleotiden und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe. Alternativ zu dsRNAs kann das Dicer Protein auch prä-mikro RNA- (prä-miRNA) oder *short hairpin* RNA- (shRNA)-Substrate zu funktioneller miRNA oder siRNA prozessieren und in den RNAi-Mechanismus integrieren. In einem weiteren Schritt bilden diese kleinen siRNAs zusammen mit Dicer, TRBP, PACT sowie dem katalytischen Enzym Argonaut-2 (Ago-2) den *RNA-induced silencing complex* (RISC) (Rana, 2007). Exogen eingeführte siRNA mit passender Länge von 19-21 Nukleotiden und einem Überhang von zwei Nukleotiden am 3'-Ende wird stattdessen ohne weitere Prozessierung durch Dicer in den RISC geladen (Abbildung 7). Im RISC werden beide Stränge der siRNA-Duplices durch die Helikase-Domäne von Dicer voneinander getrennt. Dabei wird der am 5'-Ende thermodynamisch instabilere Strang als *antisense*-Strang (Leitstrang) für die Degradation der mRNA bevorzugt (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Der *sense*-Strang (Passagierstrang) wird durch die RNase-H-ähnliche Aktivität der PIWI Domäne von Ago-2 gespalten (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004). Der RISC bildet

mit dem verbleibenden einzelsträngigen *antisense*-Strang einen aktivierten RISC, der auch als siRISC bezeichnet wird. Dieser bildet anschließend einen Effektor-Komplex mit der komplementären Ziel-mRNA (Zamore und Haley, 2005), durch deren endonukleolytische Spaltung die Genexpression verhindert wird (Abbildung 7). Die Spaltung erfolgt etwa 10 Nukleotide entfernt vom 5'-Ende der *antisense*-siRNA-Sequenz (Elbashir *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Der mit einzelsträngiger *antisense* siRNA beladene RISC kann in Folge mehrere Runden der RNA-Interferenz ausführen.

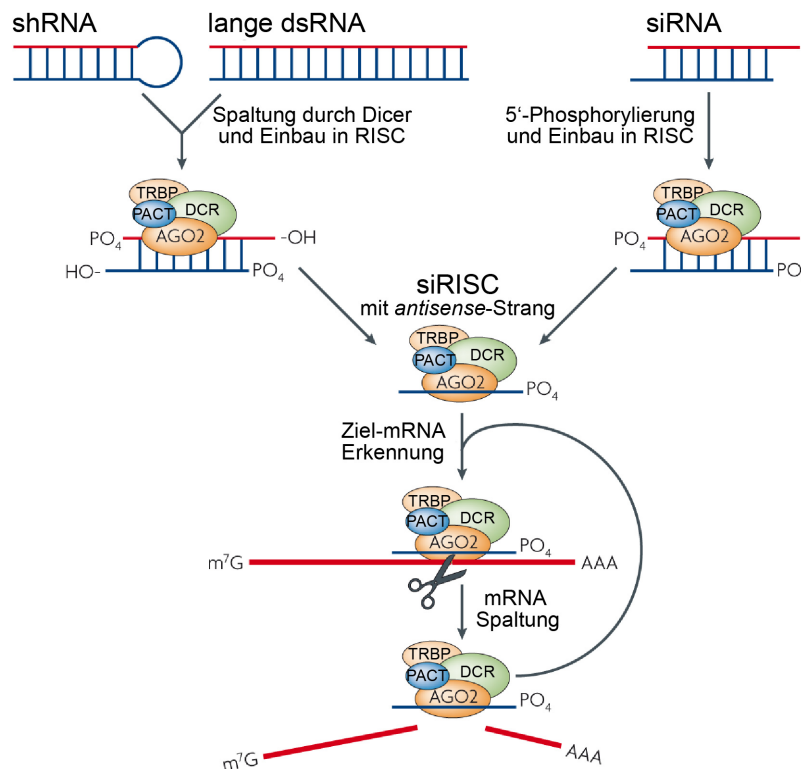


Abbildung 7. Prinzip der RNA-Interferenz. Lange doppelsträngige RNA (dsRNA) sowie *short hairpin* RNA (shRNA) werden durch das Ribonuklease III (RNase III) Enzym Dicer in 21-23 Nukleotide lange doppelsträngige Fragmente, den *small interfering* RNA (siRNA), prozessiert. Diese tragen an ihrem 3'-Ende einen Überhang von zwei Nukleotiden und eine Phosphatgruppe am 5'-Ende (Rana, 2007). Alternativ können siRNA-Duplicates zur posttranskriptionellen Stilllegung eines spezifischen Gens (*Gen-Silencing*) exogen in die Zelle eingeführt werden. Die siRNAs werden durch zelluläre Kinasen am 5'-Ende phosphoryliert und anschließend in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut, der aus den Hauptkomponenten Ago-2, Dicer, TRBP und PACT zusammengesetzt ist. Zur Vereinfachung sind nur die wichtigsten am RNAi-Prozess beteiligten Komponenten dargestellt. Nach Entwindung des siRNA-Doppelstrangs entscheiden thermodynamische Unterschiede darüber, welcher der beiden Stränge präferentiell in den RISC aufgenommen wird. Es bildet sich ein aktivierter RISC (siRISC), der den *antisense*-Strang enthält und im Anschluss mit der komplementären Ziel-mRNA einen Effektor-Komplex ausbildet. Die Ziel-mRNA wird endonukleolytisch gespalten und der siRISC für weitere Spaltungsereignisse wiederverwertet. Modifiziert nach (Rana, 2007).

RNA Interferenz durch shRNA-Expressionskonstrukte

Die Anwendung der RNAi ist häufig mit Effizienzproblemen bei der spezifischen Inaktivierung der Zielgene verbunden. Trotz Stabilisierung der siRNAs durch kovalente Modifikationen zum Schutz vor nukleolytischem Abbau ist die siRNA-vermittelte Reduktion der Genexpression transient und hält nur für eine Zeitdauer von wenigen Tagen an. Der genetische Ansatz zur Untersuchung von Genfunktionen ist daher erschwert, da stabile Funktionsverlust- (*loss-of-function*)-Phänotypen nicht effizient generiert werden können. Um dieses Problem zu umgehen, werden für eine längerfristige spezifische Suppression der Genexpression in Zellen Expressionsvektoren verwendet. Sie steuern die intrazelluläre Synthese von siRNA-ähnlichen, haarnadelförmigen Transkripten, den *short hairpin* RNAs (shRNAs). Diese werden durch das Dicer Enzym in funktionelle siRNAs prozessiert, was in einer funktionellen Inaktivierung des Zielgens resultiert. Da sich shRNAs an den endogenen miRNA-Weg anpassen, sind sie auf molarer Basis signifikant effizienter als siRNAs (McAnuff *et al.*, 2007; Siolas *et al.*, 2005). Unter Verwendung eines solchen Vektors wird eine fortwährende stabile Expression der siRNAs in der Zelle gewährleistet und eine Analyse von *loss-of-function*-Phänotypen ermöglicht, die sich erst über einen längeren Zeitraum ausbilden.

Die Transkription der shRNA vom kodierenden Expressionskonstrukt steht unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase II oder RNA-Polymerase III Promotors. Dieser ist für die Synthese kurzer RNA-Sequenzen geeignet, welche keinen Polyadenosin-Schwanz enthalten. Obwohl siRNA und shRNA ähnliche funktionelle Resultate in der Zelle hervorrufen, handelt es sich um intrinsisch unterschiedliche Moleküle, die sich in ihrem molekularen Wirkmechanismus unterscheiden können. Im Gegensatz zu siRNAs werden shRNA-kodierende Expressionskonstrukte nach Transfektion in die Zelle in den Zellkern transportiert und dort transkribiert. Das Primärtranskript (pri-shRNA) enthält eine haarnadelähnliche Struktur und wird im Zellkern durch einen Komplex aus dem RNase III Enzym Drosha und DGC8, einem dsRNA-Bindedomäne enthaltenden Protein, in prä-shRNA umgewandelt (Lee *et al.*, 2003). Die prä-shRNA wird über Exportin-5 in das Zytoplasma transportiert (Lee *et al.*, 2002b; Cullen, 2004), in den Dicer/TRBP/PACT Komplex aufgenommen und dort die Haarnadelschleife entfernt. Dadurch bildet sich eine funktionelle doppelsträngige siRNA, die in den RISC aufgenommen wird.

1.8 Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese in Mäusen

Ziel einer spezifischen Genmodifikation in der Maus ist es, die *in vivo* Funktionen bestimmter Gene durch Deletion oder Integration zu untersuchen und die Konsequenzen der Mutation für den mutanten Organismus zu studieren. Für die gezielte Inaktivierung von Genen zur Erzeugung transgener Mäuse werden unterschiedliche Verfahren angewendet.

Bei der konventionellen Methode wird eine gezielte Mutagenese in der Keimbahn der Maus vorgenommen, indem ein bestimmtes Gen im Genom einer embryonalen Stammzelle (ES) gegen eine mutante Version durch homologe Rekombination ausgetauscht und die ES anschließend in frühe Mausembryos transferiert wird (Thomas und Capecchi, 1987). Da ein Rekombinationsereignis selten auftritt, wird zusätzlich eine Neomycin-Kassette in den Genlokus eingeführt. Diese ermöglicht die Selektion und Inaktivierung des Zielgens (*Gen-Knockout*) (Abbildung 9 A). In der Keimbahn der Maus erzeugt diese Technik einen dauerhaften Verlust der Genfunktion, welche in allen Zellen des Tieres während der prä- und postnatalen Entwicklung auftritt. Eine Analyse der Genfunktion in spezifischen Zelltypen oder zu einem bestimmten Zeitpunkt ist nicht möglich. Hieraus ergeben sich mögliche Limitationen des Systems. So kann während der pränatalen Entwicklungsstadien der Maus eine zeitlich unkontrollierte Inaktivierung eines spezifischen Gens zur intrauterinen Letalität führen oder Artefakte hervorrufen, welche die Interpretation des *Knockout*-Phänotyps erschweren (Feil *et al.*, 1996). Neben einer möglichen Beeinträchtigung des mutanten Phänotyps durch das Selektionsmarker-Gen im Ziellokus, ist die Methode darüber hinaus nicht für die Untersuchung von großen Deletionen, Duplikationen, Inversionen oder Translokationen geeignet (Rajewsky *et al.*, 1996; Metzger und Feil, 1999).

Um diese Begrenzungen zu umgehen, wurde ein Verfahren entwickelt, bei welchem die konventionelle Gen-Inaktivierung mit einem ortsspezifischen Rekombinationssystem kombiniert wurde. Dieses auf Rekombinasen basierende System führt zu einer spezifischen Exzision des von zwei Erkennungssequenzen flankierten Zielgens. Bei dem am häufigsten eingesetzten konditionalen Cre/loxP-Rekombinasesystem handelt es sich um eine Methode, mit welcher Gene gewebespezifisch, aber auch zeit- und gewebespezifisch inaktiviert werden können.

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Das Cre-Rekombinase loxP (Cre/loxP)-System stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 (Sternberg und Hamilton, 1981; Sauer und Henderson, 1988). Das Enzym Cre (*cyclization recombination*) katalysiert die ortsspezifische Rekombination zwischen zwei loxP-Zielsequenzen (*locus of X-over P1*) von jeweils 34 bp Länge (Abbildung 8 A). Das loxP-Element besteht aus einer zentralen, 8 bp langen *Spacer*-Sequenz, welche von zwei umgekehrten Sequenzwiederholungen von 13 bp Länge flankiert ist. Die zentrale Sequenz bestimmt die Orientierung der loxP-Einheit und stellt gleichzeitig die Schnittstelle für die Cre-Rekombinase dar. Bei gleicher Orientierung der loxP-Elemente führt die Cre-vermittelte Rekombination zur Exzision des dazwischen liegenden DNA-Segmentes in Form eines ringförmigen Produktes (Abbildung 8 B). Auf jedem der beiden Reaktionsprodukte verbleibt jeweils eine loxP-Sequenz. Umgekehrt kann die DNA auch wieder in das Chromosom integriert werden. Dieser Prozess verläuft jedoch ineffizient, da das Reaktionsgleichgewicht zu Gunsten der intramolekularen Exzision verschoben wird. Bei umgekehrter Orientierung der loxP-Elemente führt die Cre-vermittelte Rekombination zur Inversion des flankierten DNA-Segmentes (Abbildung 8 C). Alle Reaktionen verlaufen reversibel, wobei der Ablauf der intramolekularen Exzision von DNA aus kinetischen Gründen stabiler verläuft als die Inversion und Integration von DNA (Metzger und Feil, 1999).

Zur konditionalen Gen-Inaktivierung mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems werden zwei unterschiedliche, transgene Mauslinien benötigt. Eine Mauslinie enthält das von loxP-Erkennungssequenzen flankierte Zielgen (flankiert von loxP, flox oder „gefloxtes Maus“), der andere Mausstamm exprimiert die loxP-spezifische Cre-Rekombinase, welche unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors steht. Das gefloxtes Zielgen bleibt in Abwesenheit der Cre-Rekombinase funktionell intakt und wird normal exprimiert. Bei Kreuzung beider Mauslinien kommt es dagegen zur Cre-vermittelten konditionalen Ausschaltung des Zielgens in der Nachfolgeneration (Abbildung 9 B).

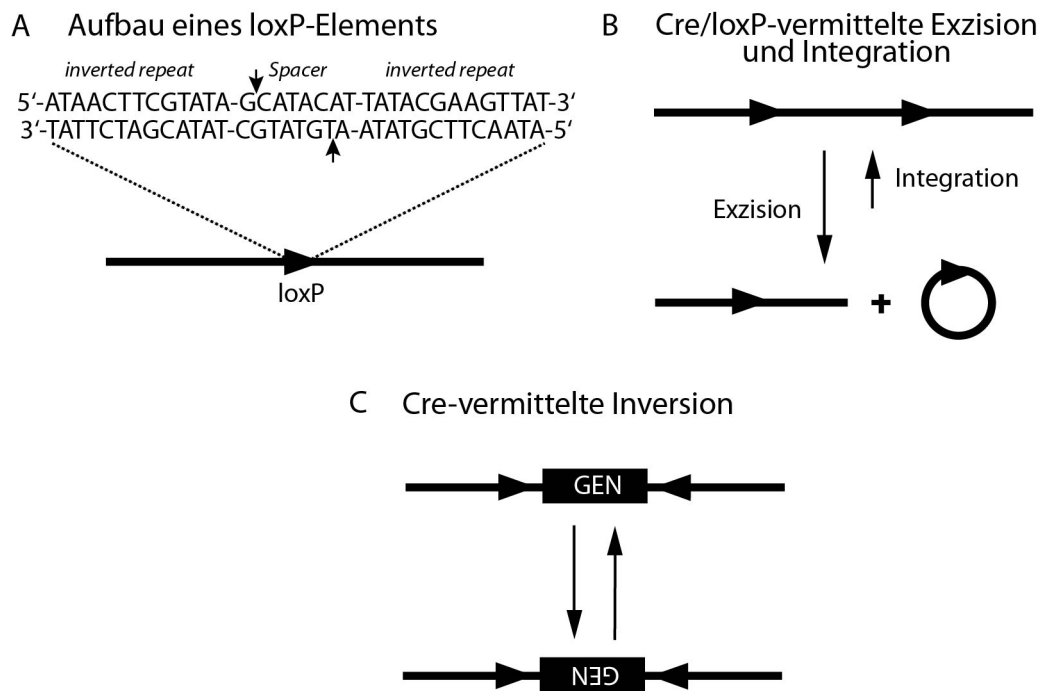


Abbildung 8. Cre/loxP-vermittelte Exzision, Integration und Inversion von DNA. (A) Aufbau eines loxP-Elements. Das aus dem Bakteriophagen P1 stammende loxP-Element hat eine Länge von 34 bp und besteht aus einer zentralen, 8 bp umfassenden *Spacer*-Sequenz, die von zwei palindromischen Sequenzen mit 13 bp Länge flankiert wird. Die Schnittstellen der Cre-Rekombinase sind durch Pfeile markiert. (B) Bei gleicher Orientierung zweier loxP-Sequenzen kommt es unter Bildung eines zirkulären Moleküls zur Cre-vermittelten Exzision des dazwischen liegenden DNA-Abschnitts. Die in Umkehrreaktion ablaufende intermolekulare Rekombination (Integration) ist aufgrund der Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes in Richtung der thermodynamisch begünstigten Exzisionsprodukte zu vernachlässigen. (C) Sind die loxP-Elemente in umgekehrter Orientierung angeordnet, so führt dies zu einer Inversion des loxP-flankierten DNA Abschnitts. Die loxP-Sequenzen sind als Dreieck dargestellt. Modifiziert nach (Metzger und Feil, 1999).

Liganden-induzierbare Cre-Rekombinasen

Die ortsspezifische Modifikation des Mausgenoms kann auch selektiv zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert werden. Hierdurch werden beispielsweise Erkenntnisse über die Funktion von Genen in bestimmten Stufen der Ontogenese oder in der adulten Maus ermöglicht. Die Regulation der Rekombinaseaktivität erfolgt posttranslational durch Verwendung von Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinasen (Feil *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996) (Abbildung 9 C). Die ortsspezifische Rekombinase wird zu diesem Zweck mit der Ligandenbindungsdomäne eines mutierten humanen Steroidrezeptors (wie beispielsweise dem Estrogenrezeptor, ER) fusioniert, welche keine Bindungsaffinität zum endogenen Liganden besitzt. Das chimäre Cre-Fusionsprotein (Cre-ER) wird ausschließlich durch die Applikation von synthetischen Liganden aktiviert wie dem kompetitiven ER-Antagonisten Tamoxifen oder dessen aktiven Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (Danielian *et al.*, 1993). Durch Einführung spezifischer Punktmutationen in die Ligandenbindungsdomäne sind verschiedene Cre-ER-Derivate

entstanden (Cre-ER^T und Cre-ER^{T2}) die sich in ihrer Tamoxifen-Sensitivität unterscheiden. So konnte an kultivierten Säugerzellen wie auch in *in vivo* Dosis-Wirkungsstudien gezeigt werden, dass das Cre-ER^{T2} Fusionsprotein eine 5-10 fach höhere Sensitivität gegenüber 4-OHT aufweist als Cre-ER^T (Feil *et al.*, 1997; Indra *et al.*, 1999). Die gewebespezifische Expression einer Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase ermöglicht daher eine genaue zeitliche Steuerung der Zielgen-Deletion und damit eine Analyse der möglichen Genfunktionen in späteren Entwicklungsstufen der Maus oder auch in adulten Tieren.

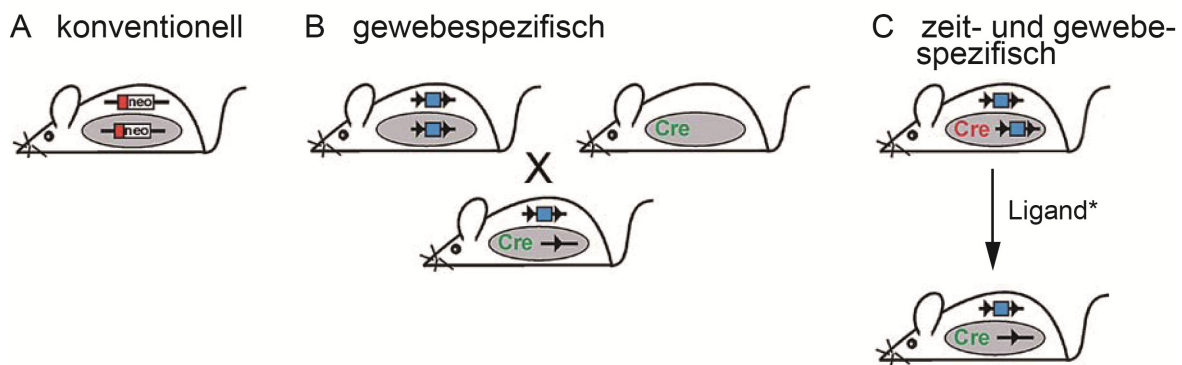


Abbildung 9. Konventionelle und konditionale Deletion von Mausgenen. (A) Konventionelle Deletion eines Exons (rotes Viereck) in der Keimbahn der Maus durch Einbau eines Neomycinresistenzgens (neo). (B) Bei der Cre-vermittelten, gewebespezifischen Gendeletion wird eine geflochte Zielmaus mit einer gewebespezifischen Cre-Maus verpaart. Die Cre-Expression steht unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors. Die Exzision erfolgt nur in Zellen, in denen der Promotor aktiv ist (graues Oval). Schwarze Dreiecke entsprechen loxP-Erkennungssequenzen. Das blaue Viereck repräsentiert ein Exon. (C) Eine zeitliche Kontrolle der gewebespezifischen Geninaktivierung kann durch Verwendung einer modifizierten, Liganden-abhängigen Cre-Rekombinase erreicht werden. Erst in Gegenwart eines synthetischen Liganden (*), wie beispielsweise Tamoxifen, wird die Cre-Rekombinase von einem inaktiven (rot) in einen aktiven Zustand (grün) überführt. Modifiziert nach (Lukowski *et al.*, 2005).

1.9 Aufgabenstellung

Die verminderte Expression der Tumorsuppressor- und Polaritätsgene *hugl-1* und *hugl-2*, humane Homologe des *Drosophila lethal giant larvae (lgl)* Gens, steht in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten und der Progression unterschiedlicher maligner Tumorerkrankungen. Die exakte Funktion der Homologe Hugl-1 und Hugl-2 bezüglich der Regulation und Aufrechterhaltung der epithelialen Zellpolarität sowie ihre Rolle in der Genese humaner Tumore ist trotz vieler Fortschritte auf diesem Gebiet weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Studie wurden daher funktionelle Analysen an *loss-of-function* Phänotypen durchgeführt, um die Einflüsse beider Homologe auf diese Prozesse zu verstehen. Für diese Experimente wurden shRNA-Expressionskonstrukte kloniert und stabile Hugl-supprimierte

Zelllinien mittels siRNA-vermitteltem Gen-*Silencing* etabliert. Besonderes Interesse galt darüber hinaus der Charakterisierung der biologischen Effekte von Hvgl-1 und Hvgl-2 auf Wachstumsverhalten, Migration und das metastatische Potenzial von Epithelzellen. Ebenso wurde der Einfluss der Homologe auf die Zellzyklusprogression und Zellproliferation analysiert. Weitere Untersuchungen sollten klären, ob Hvgl-1 und Hvgl-2 überlappende zelluläre Funktionen ausüben, und wie sich der gleichzeitige Verlust der beiden Homologe auf die Zellpolarität und Onkogenese von Epithelzellen auswirkt.

Trotz gravierender morphologischer und funktioneller Unterschiede treten die Proteinkomplexe, welche die Polarität von Epithelzellen regulieren, auch in T-Zellen auf. Dort sind sie von grundlegender Bedeutung für die T-Zellpolarisation (Ludford-Menting *et al.*, 2005). Welche Funktion und Rolle Hvgl-1 und Hvgl-2 in der anterior-posterioren Polarität und Morphologie von T-Zellen einnehmen, ist bislang gänzlich unerforscht. In der vorliegenden Studie wurde daher in siRNA-basierten *loss-of-function* Analysen untersucht, inwiefern T-Zellpolarität und -morphologie sowie auch T-Zellfunktion durch die Tumorsuppressor- und Polaritätsproteine Hvgl-1 und -2 moduliert werden. Besonderes Augenmerk galt hierbei der Polaritätsregulation und Aktinpolymerisation CD3/TCR- sowie Chemokin-stimulierter T-Zellen. Weiterhin wurde untersucht, wie Hvgl-1 und Hvgl-2 die Migrationspolarität der T-Lymphozyten beeinflussen.

Der Verlust von *lgl-1* in *Drosophila* verursacht eine Hyperplasie von Zellen der Imaginalscheiben und bestätigt daher die tumorsuppressiven Eigenschaften des Gens. In Mäusen bewirkt der Verlust von *mgl-1*, dem Säugerhomologen von *lgl-1*, schwere Dysplasien des Gehirngewebes und einen Verlust der neuroepithelialen Zellpolarität (Klezovitch *et al.*, 2004). Die Funktion von *mgl-2* (*lgl-2*) ist demgegenüber weitgehend unbekannt. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand daher in der Aufklärung der funktionellen Rolle von *mgl-2 in vivo*. Zu diesem Zweck wurden konditionale *mgl-2 Knockout*-Mäuse unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems generiert und analysiert. Diese Tiere exprimieren eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Villin-Promotors und ermöglichen eine zeitlich kontrollierte, darmspezifische Exzision des von loxP-Erkennungssequenzen flankierten *mgl-2* Gens.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1. Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
-20°C Tiefkühlschrank	Bosch, Deutschland
4°C Kühlschrank	Bosch, Deutschland
-80°C Ultratiefkühlschrank	Ultra-Low Technology of Laboratory Equipment, USA
Chemidoc XRS Molecular Imager	Bio-Rad, München, Deutschland
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese Netzteil (EPS 601)	Amersham Pharmacia Biotech, Sweden
Elektrophoreseapparatur (Agarosegele)	OWL Scientific of Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	OWL Scientific of Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Elektroporator (Nucleofector I)	Amaxa, Köln, Deutschland
Expositionskassette (Cutix ortho medium)	AGFA-Gaevert Gruppe, Leverkusen, Deutschland
Filmentwicklermaschine	Fujitsu, Japan
Fluorometer (Spectra FluorPlus)	Tecan, Salzburg, Österreich
Gel Dokumentationssystem (DH-30/32)	Biostep, Jahnsdorf, Deutschland
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Konfokales Laserscanmikroskop (CLSM 510-UV)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kreisschüttler (Heidolph unimax 1010)	Brinkmann Instruments, NY, USA
Kühlinkubator (Innova 4230)	New Brunswick Scientific, NJ, USA
Lichtmikroskop	Leica, Portugal
Luminometer (Safire)	Tecan, Salzburg, Österreich
Magnetrührer (Heidolph)	Brinkmann Instruments, NY, USA
pH-Meter (Toledo 320)	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
Realtime PCR-Maschine (Mx 3000P)	Stratagene, La Jolla, USA
SDS-Page Kammer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer (NanoDrop-1000)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Sterilwerkbank	Allerod, Dänemark
Sterilwerkbank (Typ S-2000 1.5)	Heto-Holten, Dänemark
Thermocycler (MyCycler)	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermomixer (ThermoStat)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Ultraschallgerät (S-250D)	Branson, Danbury, USA
UV/Spektralphotometer (Ultrospec 3000)	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Waage (Delta Range AG204)	Mettler Toledo, Schwerzenbach, Schweiz

Wasserbad (GFL Typ 1003)	Milian Labware, USA
Wasserbad (GFL Typ 1004)	Milian Labware, USA
Zellkulturinkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Zellkulturmikroskop (Wilovert 30, Standard)	Hund, Wetzlar, Deutschland
Zentrifuge (5415 R)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (5804)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Gebrauchsgegenstände und Plastikwaren

Tabelle 2. Verwendete Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Borosilikat-Objektträger (4-, 8-Kammern)	Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA
Einkanalpipetten	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Kryokonservierungsröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Roskilde; DK
Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kulturplatten Transwell (24-Lochplatte)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
LeucoSep (50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Deutschland
Mehrstufen-Pipette	Brand, Wertheim, Deutschland
Multikanal-Pipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Multiwell-Kulturplatten (6, 12, 24 oder 96 Vertiefungen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Objektträger (8 Kammern)	BD Biosciences, San José, USA
Pasteur Pipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Polyethylenröhrchen (Durchflusszytometrie)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ThinCert Transwells	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Fließpapier	Whatman International, Waitstone, England
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3. Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose für die Elektrophorese	CalBiochem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Aqua PolyMount	Polysciences, Warrington, USA
Artesunate	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Efferth, DKFZ, Heidelberg, Deutschland
Bacto Agar	CalBiochem, Darmstadt, Deutschland
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Bromophenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Butanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CDP-Star	Tropix, Bedford, USA
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Diethanolamin (DEA)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Apotheke Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Dinukleosidtriphosphat (dNTP)	Invitrogen, San Diego, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, <i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
I-Block	Tropix, Bedford, USA
IGEPAL (NP40)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumvanadat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitroblock II	Tropix, Bedford, USA

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PCR-Reaktionspuffer (10-fach)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, San Diego, USA
Permafluor Eindeckmedium	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Phenol-Isoamylalkohol (25:24:1)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Phorbol ester-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, St. Louis, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Poly-D-Lysin	Sigma, St. Louis, USA
Ponceau S	Sigma, St. Louis, USA
Primer	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis, USA
Protease Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
RNA Längenstandard (Century Marker)	Ambion, Huntingdon, GB
Roti Nanoquant	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saponin	Invitrogen, San Diego, USA
SDS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Sonnenblumenöl	Bombastus Werke, Freital, Deutschland
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Burlington, USA
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Trichloessigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TrisBase)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Invitrogen, San Diego, USA
Trypton	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Kits

Tabelle 4. Verwendete kommerzielle Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Absolutly RNA Mini Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Amaxa Nucleofector Kit V	Lonza, Köln, Deutschland
CellTiter-Glo Lumineszenz Kit	Promega, Madison, USA
Humane T-Zellen Nucleofector Kit	Lonza, Köln, Deutschland
iScript cDNA-Synthese Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
Luziferase Assay System Kit	Promega, Madison, USA
MACS LS/LD Separationssäulen	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS MicroBeads	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
PCR Core Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.5 Software

Adobe Acrobat 9.0 Pro	Microsoft Office 2003
Adobe Photoshop CS5	MiKTeX 2.7
Adobe Illustrator CS5	PDF ExChange Viewer 2.0
BD CellQuest Pro	Stratagene MxPro QPCR Software
MagicScan V 4.5	Tecan Xfluor
Quantity One	Zeiss LSM 510

2.1.6 Enzyme

Tabelle 5. Enzyme für die Genotypisierung und Klonierung

Bezeichnung	Bezugsquelle
Proteinase K	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase H	New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland
T4 DNA-Ligase, 1 U/ μ l	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA-Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.7 Plasmide

Tabelle 6. Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Bezugsquelle und Bemerkungen
pEF4-myc-His-V5	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Expressionsplasmid für Säugerzellen Zeocinresistenz zur Selektion stabiler Transfektanten in Säugerzellen Ampicillinresistenz zur Selektion von Transformanten in Bakterien
pGL3-basic	Promega, Mannheim, Deutschland Luziferase Reporter Vektor ohne Promotor oder Enhancer Sequenzen zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität in Säugerzellen Ampicillinresistenz in Bakterien
pSuper	OligoEngine, Seattle, USA Vektorsystem zur stabilen Expression von <i>short interfering RNA</i> (shRNA) Spezifische Suppression der Genexpression zur Erzeugung von <i>loss-of-function</i> -Phänotypen
pUB6-His	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

	Expressionsplasmid für Säugerzellen Basticidinresistenz zur Generierung stabiler Transfektanten in Säugerzellen Ampicillinresistenz zur Selektion von Transformanten in Bakterien
--	---

2.1.8 Primer

Tabelle 7. Für die PCR und Sequenzierung verwendete Primer

Primer		Sequenz	Annealing- temperatur	Produkt- größe (bp)
β-Aktin	<i>forward</i>	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTG CCCATCTA-3'	58°C	661
	<i>reverse</i>	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACG ATGGAGGG-3'		
E-Cad- herin	<i>forward</i>	5'-CAGCACGTACACAGCCCTAA-3'	58°C	691
	<i>reverse</i>	5'-GCTGGCTCAAGTCAAACCTCC-3'		
Hugl-1	<i>forward</i>	5'-AAGCTGTGGGCCCGCATTGTGA-3'	62°C	450
	<i>reverse</i>	5'-GTCCTGGAGGAGGTCTATGATA-3'		
Hugl-2	<i>forward</i>	5'-CTGTTCCGCCATCACCTGCTCT-3'	62°C	470
	<i>reverse</i>	5'-GCTCCGCTGCCTCGTCATTC-3'		
RP-II	<i>forward</i>	5'-GCACCACGTCCAATGACAT-3'	60°C	257
	<i>reverse</i>	5'-GTGCGGCTGCTTCCATAA-3'		
T3	-	5'-GAAATCACTCCCAATTA-3'		
T7	-	5'-TTATGCTGAGTGATATC-3'		

2.1.9 siRNAs

Tabelle 8. Verwendete siGENOME® SMARTpool siRNAs gegen Hugl-1- und Hugl-2 (Dharmacon, Lafayette, USA)

Name		Sequenz
siHugl-1, d1	<i>sense</i>	5'-CCACAGAGCCUUGAUGGAA-3'
	<i>antisense</i>	5'-UUCCAUCAAGGCUCUGUGG-3'
siHugl-1, d2	<i>sense</i>	5'-GGGAGAUUGUCCACCAUAA-3'
	<i>antisense</i>	5'-UUAUGGUGGACAAUCUCCC-3'
siHugl-1, d3	<i>sense</i>	5'-GAACUUCGCAUCAUGGCCA-3'
	<i>antisense</i>	5'-UGGCCAUGAUGCGAAGUUC-3'
siHugl-1, d4	<i>sense</i>	5'-GCAGCGUGCCAGACGACUA-3'
	<i>antisense</i>	5'-UAGUCGUCUGGCACGCUGC-3'
siHugl-2, d1	<i>sense</i>	5'-GCAAAGCGAUUACCAGAAU-3'
	<i>antisense</i>	5'-AUUCUGGUAUUCGCUUUGC-3'
siHugl-2, d2	<i>sense</i>	5'-CGAGAGUGGCAACGUGUUU-3'
	<i>antisense</i>	5'-AAACACGUUGCCACUCUCG-3'
siHugl-2, d3	<i>sense</i>	5'-GAUGAGAGCUUCACACUGC-3'
	<i>antisense</i>	5'-GCAGUGUGAAGCUCUCAUC-3'
siHugl-2, d4	<i>sense</i>	5'-CGGGACCUGUCCAGUUUA-3'
	<i>antisense</i>	5'-UAAACUGGAACAGGUCCCG-3'
siControl	<i>sense</i>	Non targeting siRNA d001810-01-05
	<i>antisense</i>	Non targeting siRNA d001810-01-05

Tabelle 9. Sequenzen verwendeter Accell SMARTpool siRNA gegen Hugl-1 (Dharmacon, Lafayette, USA)

Name		Sequenz
siHugl-1, d1	<i>sense</i>	5'-GUCUUCUUCUGGAUGUUA-3'
	<i>antisense</i>	5'-UAACAUC CAGGAAGAAGAC-3'
siHugl-1, d2	<i>sense</i>	5'-CCAUCAGAAUUUGAACGCU-3'
	<i>antisense</i>	5'-AGCGUUCAAAUUCUGAUGG-3'
siHugl-1, d3	<i>sense</i>	5'-GUGCGUUGCCUAUACUUUG-3'
	<i>antisense</i>	5'-CAAAGUAUAGGCAACGCAC-3'
siHugl-1, d4	<i>sense</i>	5'-GUGCUGGUACUGGAGCUUA-3'
	<i>antisense</i>	5'-UAAGCUCCAGUACCAGCAC-3'
siControl	<i>sense</i>	Accell nontargeting siRNA, D-001910-01-05
	<i>antisense</i>	Accell nontargeting siRNA, D-001910-01-05

2.1.10 Antikörper

Tabelle 10. Primäre Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Maus anti human β -Aktin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaninchen anti human E-Cadherin	R&D Systems, Minneapolis, USA
Kaninchen anti human Hvgl-1	zur Verfügung gestellt von Dr. D. Strand
Kaninchen anti human Hvgl-2	zur Verfügung gestellt von Dr. D. Strand

Tabelle 11. Sekundärantikörper für die Westernblot Analyse

Bezeichnung	Bezugsquelle
Ziege anti Kaninchen ALP-konjugiert	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ziege anti Maus ALP-konjugiert	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ziege anti Maus HRP-konjugiert	Pierce, Rockford, USA

Tabelle 12. Fluoreszierende Sekundärantikörper und fluoreszierende Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alexa-Fluor-488 Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, Holland
Texas Red-X Phalloidin	Molecular Probes, Leiden, Holland
Alexa-Fluor-488 Maus anti Kaninchen	Molecular Probes, Leiden, Holland
Alexa-Fluor-546 Maus anti Kaninchen	Molecular Probes, Leiden, Holland
Alexa-Fluor-488 Ziege anti Maus	Molecular Probes, Leiden, Holland
Alexa-Fluor-546 Ziege anti Maus	Molecular Probes, Leiden, Holland
Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, Holland

Tabelle 13. Verwendete fluoreszierende siRNAs zur Transfektionskontrolle

Bezeichnung	Bezugsquelle
Accell, grün fluoreszierende Kontroll-siRNA	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
siGlo Red, rot fluoreszierender Transfektionsindikator (Kontroll-siRNA)	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA

2.1.11 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

HEK293

Die HEK293-Zelllinie wurde aus humanen embryonalen Nierenzellen generiert und durch Adenovirustransfektion unsterblich gemacht. HEK-Zellen wachsen adhärent und sind in der zellbiologischen Forschung aufgrund der einfachen Handhabung weit verbreitet. Die Zellen zeichnen sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus und sind daher besonders für eine transiente oder stabile Transfektion mit unterschiedlichen Konstrukten geeignet.

HEK293-pSuper-Hugl-1 und HEK293-pSuper-Hugl-2 Zellen

Diese Zelllinie wurde etabliert, indem HEK293 Zellen mit pSuper-Hugl-1- oder pSuper-Hugl-2-Konstrukten und pEF4-myc-His-V5 kotransfiziert und im Anschluss in Medium selektioniert wurden, das 200 µg/ml Zeocin enthielt.

HEK293-pSuper-Hugl-1+2 Zellen

Diese Zelllinie wurde aus stabil transfizierten, Zeocin-selektionierten HEK293-pSuper-Hugl-1-Zellen generiert, die mit pSuper-Hugl-2-Konstrukten sowie pUB6-His kotransfiziert worden waren. Die Zellen wurden neben der fortlaufenden Behandlung mit Zeocin (200 µg/ml) mit Blasticidin (10 mg/ml) selektioniert.

Jurkat-16

Jurkat-16 ist eine humane T-Zelllinie, die ursprünglich 1976 aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) gewonnen wurde (Schneider *et al.*, 1977). Im Gegensatz zu normalen T-Zellen, zeigen Jurkat T-Zellen ein höheres konstitutives Maß an phosphoryliertem Tyrosin (Far *et al.*, 1994).

Jurkat-16 Aktin-GFP

Die Zelllinie Jurkat-16 Aktin-GFP wurde durch Transfektion von Jurkat-16 Zellen mit einem Aktin-GFP Konstrukt gewonnen und unter Selektion mit 200 µg/ml G418 kultiviert.

2.1.12 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 14. In der Zellkultur verwendete Reagenzien und Lösungen

Reagenzien / Lösungen	Bezugsquelle / Zusammensetzung
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Humanes AB-Serum	Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI-1640)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Erythrozyten-Lysepuffer	0,127 mM EDTA 10 mM KHCO ₃ 155 mM NH ₄ Cl in deionisiertem Wasser und anschließender Sterilfiltration
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
G418 (Geneticin), 20 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Gentamycin Sulfat, 50 mg/ml	BioWhittaker, Vervies, Belgien
HEPES Puffer, 1 mol/l in 0,85% NaCl	BioWhittaker, Vervies, Belgien
L-Glutamin, 200 mM	PAA, Cölbe, Deutschland
Lymphozytenseparationsmedium	PAA, Cölbe, Deutschland
Nicht-essenzielle Aminosäuren, 10 mg/l	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin 10000 U/ml Penicillin, 10000 U/ml Streptomycin Sulfat in 0,85% NaCl	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA, 1% in PBS	PAA, Cölbe, Deutschland
Zeocin, 100 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 15. Verwendete Zytokine

Rekombinante humane Zytokine	Bezugsquelle
C-C motif chemokine ligand 19 (CCL19)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Interleukin-1 β (IL-1 β)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-2 (IL-2)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-4 (IL-4)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Interleukin-6 (IL-6)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Tumor necrosis factor α (TNF- α)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland

Tabelle 16. In der Zellkultur verwendete Medien

Medium	Zusammensetzung (Angaben in Volumen oder Volumenprozenten)
DC-Medium	500 ml DMEM Medium 5% humanes AB-Serum 1% L-Glutamin, 200 mM 1% nicht essenzielle Aminosäuren, 10 mg/l 1% Natriumpyruvat, 1 mM 1% Penicillin/Streptomycin, 10 mg/ml
DC-Maturierungsmedium	x ml DC-Medium 500 U/ml IL4 1000 U/ml IL6 800 U/ml GM-CSF 10 ng/ml IL1- β 10 ng/ml TNF- α
DC-Medium mit Zytokinen	x ml DC-Zell-Medium 1000 U/ml IL4 1000 U/ml GM-CSF
DMEM Vollmedium (HEK293)	500 ml DMEM Medium 10% FBS 1% L-Glutamin, 200 mM 1% Penicillin/Streptomycin, 10 mg/ml 1% HEPES, 1 mol/l
Einfriermedium (HEK293, Jurkat-16, T-Zellen)	DMEM bzw. RPMI-1640 Vollmedium 20% FBS 10% DMSO
RPMI 1640 Vollmedium (Jurkat-16)	500 ml RPMI-1640 10% FBS 1% L-Glutamin, 200 mM 0,1% Gentamycin, 50 mg/ml
T-Zell-Medium (CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten)	500 ml RPMI-1640 10% humanes AB-Serum 0,1% Gentamycin Sulfat, 50 mg/ml

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Klonierung von shRNA-Expressionskonstrukten

Unter der Kontrolle des H1 RNA-Polymerase-III Promotors exprimiert der pSuper-Expressionsvektor shRNA, die in der Zelle durch das Enzym Dicer zu funktioneller siRNA umgewandelt wird (Brummelkamp *et al.*, 2002).

Es wurden Oligonukleotide mit folgender Sequenz synthetisiert:

Sense:

5'-GATCTG-Zielsequenz-TTCAAGAGA-Zielsequenz (invers)-TTTTTTACGCGTA-3'

Antisense:

5'-AGCTTACGCGTAAAAAA-Zielsequenz-TCTCTTGAA-Zielsequenz (invers)-CA-3'

Die Zielsequenz korrespondiert mit dem *sense*-Strang der durch pSuper exprimierten siRNA und entspricht der Zielsequenz der mRNA. Die inverse Zielsequenz, entsprechend des *antisense*-Strangs der siRNA-Duplex, hybridisiert mit dieser Sequenz und initiiert die Degradation der mRNA.

Hybridisierung der Oligonukleotide

Die *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide wurden zur Hybridisierung mit nukleasefreiem Tris-EDTA-Puffer (TE) auf eine Endkonzentration von 100 μ M eingestellt und im Volumenverhältnis von 1:1 miteinander gemischt. Der Ansatz wurde zur Beseitigung intramolekularer Sekundärstrukturen für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt. Dann wurde für 2 Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 37°C erwärmt. Es wurde bei 25°C Raumtemperatur (RT) für weitere 2 Minuten inkubiert und der Ansatz auf Eis gelagert oder alternativ bis zur Nutzung bei -20°C aufbewahrt.

TE-Puffer 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
 10 mM TRIS

2.2.1.2 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden 5 µg DNA zusammen mit 25-50 Units des jeweiligen Restriktionsenzym, 5 µl Bovinem Serumalbumin (BSA) und 5 µl des empfohlenen 10x Puffers in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde der Ansatz für 1-2 Stunden bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und im Anschluss hitzeinaktiviert. Die verwendeten Restriktionsenzyme erzeugten inkompatible Enden, die nicht wieder miteinander religieren konnten. Eine Behandlung der linearisierten DNA mit alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIAP) zur Entfernung der 5'-Phosphatgruppen war daher nicht erforderlich.

2.2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Methode wird zur Trennung von Proteinen, DNA und RNA angewendet. Das Verfahren beruht auf einer unterschiedlichen Löslichkeit der Komponenten in der jeweiligen Phase. Nukleinsäuren verbleiben in der wässrigen Phase und lassen sich von Proteinen abtrennen, die sich in der organischen Phase oder Interphase anreichern.

Die DNA-Lösung wurde mit nukleasefreiem Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und im gleichen Verhältnis mit Phenol-Isoamylalkohol (25:24:1; äquilibriert auf pH 7,5) versetzt. Die Lösung wurde zur Vermischung der Phasen gut geschüttelt und bei 5000 g für 1 Minute abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und die untere Phase verworfen. Die Phenol-Extraktion wurde zur Erzielung einer besseren Aufreinigung ein bis zwei Mal wiederholt. Zur Entfernung des restlichen Phenols wurde die Probe mit dem gleichen Volumen an Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und zur Phasenmischung gut geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lösung bei 5000 g für 1 Minute zentrifugiert und die obere Phase, welche die aufgereinigte DNA enthielt, in ein neues Röhrchen überführt.

2.2.1.4 DNA-Präzipitation

Die DNA-Lösung wurde mit dem 2,5-fachen Volumen an 100% Ethanol und 1/10 des Volumens an Natriumacetat (3 M; pH 5,2) versetzt. Die Präzipitation der DNA erfolgte für mehrere Stunden bei -20°C. Anschließend wurde die DNA bei 12000 g und 4°C für 20 Minuten durch Zentrifugation sedimentiert und das Pellet zur Entfernung von Salzen und organischen Molekülen mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde mit dem Nano-Drop-Spektralphotometer bestimmt und diese anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Ligation

Die Ligation des Inserts und des Vektors erfolgte im Verhältnis von 3:1 bis 10:1. Es wurden stets 250 ng des linearisierten Vektors in 50 µl Gesamtvolumen aufgenommen. Die verwendeten Volumina an 10x Ligasepuffer und T4 DNA-Ligase (1 U/µl) betragen 5 µl. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.1.6 Transformation

Die Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Hierzu wurden kompetente XL1-*E.Coli* Bakterien vorsichtig auf Eis aufgetaut und 100 µl der Zellen zur ligierten DNA pipettiert. Der Ansatz wurde durch vorsichtiges Schütteln vermischt und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen für exakt 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend für 5 Minuten erneut auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde mit 400 µl auf 37°C vorgewärmtem Luria-Broth-(LB)-Medium versetzt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche das Antibiotikum Ampicillin zur Selektion positiver Klone enthielten. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C. Von jeder Platte wurden 8-10 einzelne Bakterienkolonien mit autoklavierten Pipettenspitzen aufgenommen und in Kulturröhrchen überführt, die 2 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion enthielten. Die Kulturen wurden über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

LB-Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid 10 g/l Trypton der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt und das LB-Medium autoklaviert
LB-Agarplatten	wie LB-Medium 15 g/l Agar die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 55°C 100 mg/l Ampicillin hinzu gegeben

2.2.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Prokaryoten

Minipräparation

Die Minipräparation von Plasmid-DNA basiert auf einer Methode nach Birnboim und Doly, bei der die Bakterien alkalisch lysiert werden (Birnboim und Doly, 1979). Kontaminierende Makromoleküle wie Proteine, RNA und chromosomale DNA mit sehr hohem Molekulargewicht werden bei dieser Vorgehensweise selektiv denaturiert und kopräzipitiert. Durch Zentrifugation können diese Präzipitate schließlich von zirkulärer DNA abgetrennt werden.

Von den über Nacht inokulierten Kulturmedien wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension für die Plasmid-Extraktion in Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 8500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Puffer I resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer II zum Aufschließen der Zellen wurde der Ansatz für 5 Minuten auf Eis belassen und anschließend zur Fällung der Proteine mit 200 µl Puffer III versetzt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert und die Präzipitate durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g und 4°C abgetrennt. Der Überstand (600 µl) wurde in neue Reaktionsgefäße transferiert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 420 µl Isopropanol ausgefällt. Der Ansatz wurde im Anschluss für 30 Minuten bei 4°C und 12000 g zentrifugiert und das DNA-Pellet nach Verwerfen des Überstandes mit 100 µl eiskaltem, 70% Ethanol gewaschen, um restliche Salze und Kontaminationen zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde getrocknet, in 30 µl DNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Posi-

tive Klone wurden im Restriktionsverdau analysiert und im Agarosegel anhand der jeweiligen Fragmentgröße identifiziert.

Puffer I	50 mM Tris 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
Puffer II	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer III	3 M Natriumacetat, pH 5,2

Midipräparation von Plasmid-DNA

Es wurden 25 ml LB-Medium mit transformierten *E. Coli* Bakterien inokuliert, um Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab zu gewinnen. Die über Nacht inkubierten Kulturen wurden bei 6000 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit gemäß der Anleitung des Herstellers isoliert und aufgereinigt.

2.2.1.8 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA wurde von der Firma GENterprise Genomics (Mainz, Deutschland) nach der auf Frederick Sanger basierenden Didesoxymethode durchgeführt, dem Sanger-Verfahren. Die DNA wurde mit DNase-freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 200 ng/µl gebracht. Für jede Sequenzierung wurde eine DNA-Menge von mindestens 0,5 µg benötigt, die Konzentration des jeweiligen Primers betrug 10 pmol/µl. Die Basenabfolge wurde von der Firma nach dem ShortRun-Programm bestimmt, das eine Leseweite von 350 bp umfasst. Zur Analyse der Basensequenz wurde das frei verwendbare Programm „BlastN“ auf der Internetseite www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed verwendet.

2.2.1.9 RNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Die Gesamt-RNA wurde aus adhärennten Zellen, Suspensionszellen oder Tumorgewebe isoliert. Hierzu wurde das Absolutely RNA Mini Kit (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet und alle Arbeitsschritte nach den Angaben des Herstellers ausgeführt. Gewebekulturzellen wurden geerntet, durch Zentrifugation sedimentiert und in Lysepuffer aufgeschlossen, der neben dem starken Proteindenaturans Guanidinthiocyanat β -Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken enthielt. Das Lysat wurde durch vorsichtiges Resuspendieren homogenisiert. Tumor- oder Organproben wurden im Mikro-Homogenisator und durch anschließendes Resuspendieren mit einer dünnen, auf einer 2 ml Spritze befindlichen Kanüle (0,45 x 25 mm) lysiert. Die Probe wurde in einer Vorfiltersäule von Zelltrümmern und Verunreinigungen befreit und das Filtrat mit dem gleichen Volumen an 70% Ethanol versetzt. 700 μ l der Mischung wurden auf eine RNA-Bindungssäule transferiert und diese für 30 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der verbleibende Rest der Mischung erneut auf die Bindesäule gegeben und zentrifugiert. Die an der Säule gebundene RNA wurde anschließend nach Entfernung des Filtrates mit einem Waschpuffer mit niedriger Salzkonzentration gewaschen. DNA-Kontaminationen wurden mit 50 μ l DNase bei 37°C für 15 Minuten verdaut. Die an der Silikamatrix der Säule gebundene RNA wurde anschließend mit 600 μ l Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration gewaschen und für 30 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Waschvorgang zweimal mit Puffer niedriger Salzkonzentration wiederholt. Die Bindesäule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die aufgereinigte RNA mit 30 μ l Elutionspuffer und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 g eluiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde die Absorption der Gesamt-RNA bei 260 nm im Spektralphotometer vermessen und nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Konzentration (RNA)} = A_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,040 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Die Reinheit wurde aus dem Quotienten aus $A_{260 \text{ nm}}$ und $A_{280 \text{ nm}}$ bestimmt. Ein Quotient von 1,8 - 2,1 korrelierte mit einem hohen Reinheitsgrad der RNA. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.10 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der isolierten RNA wurde mit dem iScript cDNA-Synthese Kit durchgeführt (Bio-Rad, München, Deutschland). Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA in 20 µl Reaktionsvolumen verwendet und alle weiteren Schritte nach Angaben des Herstellers durchgeführt:

Reaktionsbedingungen

25°C	5 Minuten
42°C	45 Minuten
85°C	5 Minuten
4°C	10 Minuten

2.2.1.11 Semi-quantitative PCR

Für die semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1 µl cDNA (50 ng) als Vorlage in 25 µl PCR Reaktionsvolumen verwendet und mit dem PCR Core Kit nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Für die Amplifizierung wurde ein Thermocycler PCR-Thermostat benutzt. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Die PCR wurde in 28-35 Zyklen durchgeführt und 20 µl der Produkte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.1.13). Die Banden wurden nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Nachfolgend ist die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes wie auch ein typisches PCR-Programm dargestellt:

PCR-Ansatz für 10 Proben	10x PCR Puffer	25 µl
	MgCl ₂ (25 mM)	6,25 µl
	dNTPs Mix (je 10 mM)	10 µl
	Taq DNA-Polymerase	1,25 µl
	Primer A (10 pmol/µl)	10 µl
	Primer B (10 pmol/µl)	10 µl
	DNA-Vorlage (50 ng/µl)	10 µl
	H ₂ O, destilliert	177,5 µl

PCR-Programm	Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten
3-Stufen Zyklus (28-35 Zyklen)			
	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	58-62°C	45 Sekunden
	Elongation	72°C	45 Sekunden
	Terminale Elongation	72°C	10 Minuten

2.2.1.12 Quantitative *Real-Time*-PCR

Die Methode der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative real-time-PCR*, qRT-PCR) beruht auf einer sequenzunabhängigen Interkalierung des Cyanin-Farbstoffes Sybr-Green in doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenzintensität des entstehenden DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes ist proportional zur Menge des amplifizierten Produk-tes.

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem Mx3000P QPCR System durchgeführt. Hierzu wurde der Absolute 2x QPCR Sybr-Green Mix verwendet und die Reaktionen nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Abgene, Hamburg, Deutschland). Zur Kompensierung von Variationen in der Versuchsführung wurde als Referenz der Passivfarbstoff Rox verwen-det. Es wurde 1 µl cDNA (50 ng) in 25 µl Reaktionsvolumen eingesetzt und die PCR für 40 Zyklen durchgeführt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Quantifizie-rung erfolgte durch Normalisierung der Genexpression mit der Expression der RNA Poly-merase II (RPII). Zusätzlich wurden die PCR-Produkte auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht analysiert.

Die Zusammensetzung des qRT-PCR-Ansatzes und das entsprechende Programm für das Mx3000P QPCR System sind nachfolgend aufgeführt:

Ansatz für die qRT-PCR	Sybr-Green (2x)	120 µl
	ROX (1:80)	5,6 µl
	Primer A (10 pmol/µl)	8,5 µl
	Primer B (10 pmol/µl)	8,5 µl
	DNA-Vorlage (50 ng/µl)	10 µl
	H ₂ O, destilliert	97,4 µl

qRT-PCR Programm	Initiale Denaturierung	94°C	15 Minuten
	3-Stufen Zyklus (40 Zyklen)		
	Denaturierung	94°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	58-62°C	45 Sekunden
	Elongation	72°C	1 Minute

2.2.1.13 Agarose-Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Hayward und Smith (Hayward und Smith, 1972) wurden 1% Agarosegele hergestellt und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis von 6:1 mit 6 x Ladepuffer versehen und nebst einem Größenstandard in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70-100 V in 1x TBE-Puffer. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

DNA-Ladepuffer (6x)	100 mM EDTA, pH 8,0 0,2% (w/v) Bromphenolblau 30% (w/v) Glycerol
TBE-Puffer	90 mM Tris-HCl, pH 8,0 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA, pH 8,0
DNA-Größenstandard	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland Gene Ruler 100 bp plus DNA-Leiter

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion von Proteinen aus humanen Zellen für den Westernblot wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz verwendet. Diese waren zuvor in 6- oder 12-Lochplatten ausgesät worden. 48-96 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen einmal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen, durch Trypsinieren geerntet und bei 16000 g für 5 Minuten und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl kaltem Lysepuffer/10⁶ Zellen aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde zur Abtrennung von Zelltrümmern für 20 Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem gleichen Volumen an 2x Gel-Ladepuffer versetzt. Zum Verdau der Zell-DNA wurden die Proben mit 0,5 µl Benzonase versehen und die Proteinlösung für 5 Minuten bei 95°C im Thermoschüttler erhitzt. Die Lysate wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert oder längerfristig bei -80°C aufbewahrt.

Lysepuffer 1% (v/v) NP40 in PBS
 4% (v/v) Protease Inhibitor-Cocktail, 25x
 25 mM Natriumfluorid
 1 mM Natriumvanadat

Gel-Ladepuffer (2x) 120 mM Tris-HCl, pH 6,8
 10% (v/v) Glycerin
 4% (w/v) SDS
 4% (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,02% (w/v) Bromphenolblau

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Das Prinzip der Messung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250 an Aminosäuren und der damit verbundenen Überführung des Farbstoffes in einen anionischen Zustand. Die daraus resultierende Verschiebung des Absorpti-

onsmaximums von 450 nm nach 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration und kann photometrisch quantifiziert werden.

Die Standard-Eichreihe und die Proben wurden in Dublikaten vermessen. Die Probe wurde 1:50 (v/v) in deionisiertem Wasser verdünnt und jeweils 50 µl in die Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte pipettiert. Das Bradford-Reagenz (Roti Nanoquant 5x; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde mit Wasser im Verhältnis von 1:5 (v/v) verdünnt und 200 µl des Reagenzes mit den Proben vermischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Ansätze bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer vermessen. Als Referenz diente eine Messung der Proben bei 450 nm, dem Absorptionsmaximum des kationischen Zustandes des noch ungebundenen Farbstoffes. Der Quotient OD_{595}/OD_{450} wurde gebildet und die Konzentration der Proteinlösungen mittels einer Eichgeraden bestimmt.

2.2.2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Zur Überlagerung der intrinsischen Protein-Eigenladungen wurden die Proben zuvor mit dem anionischen Detergens SDS behandelt. Proteine erhalten somit ein gleichbleibendes Ladungszu Masse Verhältnis. Ebenso wurden die Disulfid-Brücken der Proteine mit β -Mercaptoethanol reduktiv gespalten, um eine bessere Auftrennung im elektrischen Feld zu erreichen.

Die Polymerisationsinitiation der Trenngel-Mischung für die Gelelektrophorese (siehe Tabelle 17) erfolgte mit dem Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) sowie Tetramethylethyldiamin (TEMED). Das flüssige Gel wurde zügig zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen, welche durch einen Abstandshalter voneinander getrennt wurden. Das noch flüssige Trenngel wurde mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um die Bildung von Gasblasen während der Polymerisation zu verhindern. Das polymerisierte Gel wurde anschließend mit einem Sammelgel überschichtet, um die SDS-beladenen Proteine durch einen eintretenden Stapeleffekt vorzutrennen und diese an der Grenzschicht zum Trenngel aufzukonzentrieren. Im Gel kommt es durch eine radikalische Kettenreaktion zur dreidimensionalen Vernetzung der Polyacrylamid-Moleküle. Der Vernetzungsgrad des Gels ist dabei direkt von der Konzen-

tration des beigesetzten Acrylamids/Bisacrylamids abhängig. Da große Proteine aufgrund der erhöhten Wechselwirkung mit der Netzstruktur des Gels länger im Gel verweilen als kleine Proteine, bewegen sich diese im elektrischen Feld langsamer, weshalb die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Es wurden in jede Tasche des SDS-PAGE Gels 30-40 µg Protein aufgetragen und der Größenstandard PageRuler (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) als Referenz verwendet. Die Proben wurden bei Raumtemperatur bei 30 mA/Gel im Sammelgel und bei 40 mA/Gel im Trenngel aufgetrennt.

Tabelle 17. Zusammensetzung des Sammelgels und der Trenngele für die Gelelektrophorese (für 4 Gele)

Reagenzien	Trenngel 8%	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel 5%
30% Polyacrylamid	10,8 ml	13,3 ml	15,5 ml	3 ml
1,8 mol/l Tris-HCl (pH 8,8)	8,0 ml	8,0 ml	8,0 ml	-
0,8 mol/l Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	-	4 ml
H ₂ O	20,6 ml	18,1 ml	15,9 ml	12,7 ml
10% (w/v) SDS	400 µl	400 µl	400 µl	200 µl
10% (w/v) APS	200 µl	200 µl	200 µl	100 µl
TEMED	8,0 µl	8,0 µl	8,0 µl	10 µl

Laufpuffer (10x) 250 mM Tris
1,9 mol/l Glycin
35 mM SDS

2.2.2.4 Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot)

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) zur proteinchemischen Analyse erfolgte mittels des *Semidry*-Verfahrens nach Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984). Whatman Fließpapiere wurden in Transferpuffer getränkt und die PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach, Deutschland) zur Aktivierung mit 100% Methanol angefeuchtet. Der Aufbau in der Transferkammer erfolgte wie folgt:

Anode, 3 Whatman Fließpapiere, PVDF-Membran, Gel, 3 Whatman Fließpapiere, Kathode.

Die Proteine wurden nach Angaben des Herstellers in einem Multiphor-II-Blotter (Millipore, Schwalbach, Deutschland) vom Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfervor-

gang erfolgte bei Raumtemperatur für 90 Minuten und einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Blotfläche.

Transferpuffer (1x)	27 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% (v/v) Methanol

2.2.2.5 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer wurde der Westernblot für 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in I-Blocklösung inkubiert. Die Membran wurde mit Primärantikörper in I-Blocklösung mit der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung und Inkubationsdauer unter vorsichtigem Schütteln bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde diese dreimal für jeweils 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen und bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit Alkalischer Phosphatase-(ALP)-gekoppeltem Sekundärantikörper in I-Blocklösung inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in Waschpuffer für jeweils 5 Minuten entfernt, die Membran für zweimal 5 Minuten mit Assaypuffer behandelt und daraufhin zur Steigerung der Signalintensität für 10 Minuten mit Nitro-Block-II in Assaypuffer inkubiert. Die Inkubation mit dem Chemilumineszenzsubstrat CDP-Star erfolgte anschließend verdünnt in Assaypuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Der Westernblot wurde mit einer transparenten Membran vor dem Austrocknen geschützt und die Chemilumineszenz mit einem lichtempfindlichen Film in einer Expositionskassette detektiert. Der Film wurde anschließend in einer Entwicklermaschine entwickelt. Alternativ wurde ein digitales Detektionssystem verwendet. Die Expositionszeiten variierten je nach Signalstärke zwischen 1 Minute und 1 Stunde. Die densitometrische Analyse der Westernblot-Banden wurde mit der Software Quantity One (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Bandendichte wurde der Quotient aus Bande/Bande Aktin gebildet und auf den entsprechenden Quotienten der Kontrolle bezogen.

Block-Lösung	1 g I-Block 500 ml PBS Erhitzen auf 60°C für 2 Stunden, danach Zugabe von 1% (v/v) Tween 20
Waschpuffer	PBS 0,1% (v/v) Tween 20
Assaypuffer	100 mM Diethanolamin 200 mM MgCl ₂ mit HCl auf pH 9,5 einstellen
CDP-Star Detektionssystem	Nitro-Block-II: 1:200 in Assaypuffer CDP-Star: 1:1000 in Assaypuffer

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Suspensionszellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre sowie 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet und mit frischem Vollmedium versetzt. Je nach Zelllinie und Zelldichte wurden 50-90% (1:2 bis 1:10) der Zellsuspension verworfen. Der Rest wurde in eine neue Gewebekulturflasche überführt und unter Zusatz entsprechender Additive mit Vollmedium auf das ursprüngliche Gesamtvolumen aufgefüllt.

2.2.3.2 Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

Adhäsiv wachsende, humane Zellen wurden im Inkubator in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen wurden die zu 80-90% konfluenten Zellen trypsinisiert und erneut ausgesät. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS/EDTA gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit 1 ml einer 0,1% Trypsin/EDTA Lösung. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zum Abbruch der Trypsinierung mit 5 ml Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt, 0,5 ml der Zellsuspension (1:10) mit 14,5 ml Vollmedium in eine neue Gewebekulturflasche (75 cm²) überführt. Stabil transfizierte Zelllinien wurden mit 200 µg/ml Zeocin und/oder 10 µg/ml Blasticidin unter Selektionsdruck gehalten. Die Zellen wurden im Inkubator für 2-3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert und später im Verhältnis von 1:10 passagiert.

2.2.3.3 Kryokonservieren und Auftauen von Zellen

Die Zelllinien wurden für die langfristige Aufbewahrung in Flüssigstickstoff bei -196°C kryokonserviert. Die Zellen wurden dazu wie zuvor beschrieben geerntet und bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Einfriermedium mit einer Konzentration von 3-5 x 10⁶ Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu jeweils 1 ml in Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert, bei -80°C

gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt. Nach dem Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium gewaschen und für 5 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 15 ml supplementiertem Kulturmedium aufgenommen und für die Kultivierung in eine Gewebekulturflasche ausgesät.

2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden die Zellen nach dem Ernten pelletiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:4 mit einer 0,4% Trypanblaulösung verdünnt und 10 µl der Mischung auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Der anionische Diazofarbstoff Trypanblau diffundiert durch die Zellmembran abgestorbener Zellen und färbt diese im Zytoplasma dunkelblau an. Durch das Ausschlussverfahren lässt sich die Zellviabilität intakter Zellen, die den Farbstoff nicht aufgenommen haben, lichtmikroskopisch bestimmen. Die Zellzahlen in allen vier Großquadranten der Kammer wurden unter dem Mikroskop ermittelt und das arithmetische Mittel gebildet. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension errechnete sich durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Verdünnungsfaktor (4) und dem Kammerfaktor der Neubauerkammer (10^4).

2.2.3.5 Präparation humaner PBMCs

Humane periphere, mononukleäre Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus venösem Blut gesunder Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Für die Verarbeitung wurden Leukozytenfilme von Spendern verwendet, in denen mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten und Monozyten, angereichert vorliegen. In LeucoSep-Röhrchen (50 ml) wurden jeweils 17,5 ml Lymphozytenseparationsmedium vorgelegt, welches ein hydrophiles Ficoll Polymer mit hoher Molmasse zur Erzeugung eines Dichtegradienten enthielt. Der Leukozytenfilm wurde im Verhältnis von 1:1 mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, DPBS) verdünnt und vorsichtig über die Separationslösung in den LeucoSep-Röhrchen geschichtet. Der Separationsprozess wurde durch Zentrifugation bei 800 g für 15 Minuten und Raumtemperatur durchgeführt. Die PBMCs konzentrierten sich dabei in der Interphase in Form eines weißlichen Rings zwischen dem Blutplasma und der Separationslösung. Die Interphase wurde mit einer

sterilen Transferpipette abgesaugt und die Zellen zweimal in DPBS gewaschen. Die Zellen wurden hierzu jeweils für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet zur Entfernung verbliebener Erythrozyten in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zellaggregate wurden durch Filtration unter sterilen Bedingungen abgetrennt, das Filtrat mit DPBS auf ein Gesamtvolumen von 40 ml gebracht und die Suspension nach Bestimmung der Zellzahl bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

2.2.3.6 Isolierung CD4- oder CD8-positiver T-Lymphozyten aus PBMCs

Die Separation von CD4- oder CD8-positiven T-Lymphozyten aus PBMCs erfolgte nach Angaben des Herstellers Milteny Biotec. Das Prinzip der Zelltrennung beruht auf der Depletion von nicht-CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen durch indirekte magnetische Markierung. Dieses Verfahren wird als Negativselektion bezeichnet. Die Zellen werden mit einem Cocktail Biotinkonjugierter, monoklonaler Antikörper inkubiert, die gegen die Oberflächenantigene der zu depletierenden Zellen gerichtet sind. In einem zweiten Schritt werden die Zellen mit anti Biotin Antikörpern behandelt, an welche supraparamagnetischen MicroBeads konjugiert sind. Die magnetisch markierten Zellen werden über eine magnetische Zellsortierungs-Säule (*magnetic cell sorting*, MACS) zurückgehalten, während die CD4- oder CD8-positiven T-Zellen die Säule passieren können.

Zur Isolierung der jeweiligen Zellfraktionen wurden 1×10^7 PBMCs in 40 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde mit 10 µl Biotin Antikörper Cocktail versetzt, vorsichtig resuspendiert und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Der Antikörper Cocktail ist gegen folgende Zelloberflächenmoleküle von nicht-CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen gerichtet:

CD4⁺ T-Zell Selektion: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und Glycophorin A.

CD8⁺ T-Zell Selektion: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ und Glycophorin A.

Die Zellsuspension wurde mit 30 µl MACS-Puffer versetzt und nach Zugabe von 20 µl Anti Biotin MicroBeads für weitere 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml MACS-Puffer gewaschen und bei 300 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl Puffer resuspendiert. Zur Negativselektion der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen wurde die Zellsuspension vorsichtig auf eine in einem starken Magnetfeld befindli-

che Trennsäule gegeben, in der die magnetisch markierten und nicht gewünschten Zellen zurückgehalten wurden. CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen befanden sich hoch angereichert im Eluat der Säule. Die separierten Zellen wurden mit T-Zell Kulturmedium unter Zugabe von 50 U/ml IL-2 im Feuchtinkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

MACS-Puffer PBS/EDTA
 0,5% (w/v) Bovines Serum Albumin (BSA)

2.2.3.7 *In vitro* Generierung von humanen Dendritischen Zellen

Humane Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) wurden mit Hilfe der Adhärenzmethode aus isolierten PBMCs gewonnen. Hierzu wurden die Zellen mit DC-Medium auf eine Zellzahl von 1×10^7 /ml eingestellt und 40 ml der Zellsuspension in einer Gewebekulturflasche (175 cm²) für 45 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Gegensatz zu Lymphozyten adhären Monozyten, Vorläuferzellen der Antigen-präsentierenden DCs, an die Plastikoberfläche der Gewebekulturflasche und können auf diese Weise isoliert werden. Der Überstand wurde verworfen und die adhärenierten Monozyten zur Entfernung der Lymphozyten dreimal vorsichtig mit 20 ml DPBS gewaschen. Der Waschvorgang wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Die verbliebenen Monozyten wurden anschließend für 7 Tage in zytokinsupplementiertem DC-Medium kultiviert. Verbrauchtes Medium wurde an den Tagen 2, 5 und 7 durch frisches Medium ersetzt. Für die Tage 7-10 wurden die Zellen zur Ausreifung in Maturierungsmedium kultiviert. An Tag 10 wiesen reife DCs (*mature dendritic cells*, mDCs) charakteristische, bäumchenartige Ausläufer auf.

2.2.3.8 Transfektion humaner T-Zellen mit synthetischen siRNAs

Die Transfektion von Jurkat-16 T-Zellen erfolgte mit dem Nucleofector Kit V durch Elektroporation nach den Angaben des Herstellers. In die Vertiefungen einer 6-Lochplatte wurde supplementiertes RPMI-1640 Medium vorgelegt und bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator mit wassergesättigter Atmosphäre äquilibriert. Jurkat-16 T-Zellen wurden geerntet und die Zelldichte bestimmt. Für jeden Ansatz wurden 2×10^6 Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos verworfen und das Zellpellet in 100 µl Nucleofector Lösung zusammen mit 100 nM siRNA resuspendiert. Nach Transfer der Suspension in eine Küvette wurden die

Zellen im Elektroporator (Nucleofector I; Programm X-01) transfiziert. Die Zellen wurden in äquilibriertem Medium aufgenommen und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. T-Lymphozyten (5-10 x 10⁶ Zellen pro Ansatz) wurden unter Verwendung der T-Zell Nucleofector Lösung mit Programm U-014 transfiziert.

Accell siRNA Transfektion

Da T-Zellen häufig empfindlich auf Elektroporation und Transfektion mit kationischen Lipiden reagieren, wurden diese alternativ mit Hilfe der Accell siRNA Technologie transfiziert. Dieses Verfahren kommt aufgrund chemischer und bioinformatischer Modifikationen der siRNA ohne Zusätze aus. Die zelluläre Aufnahme der siRNA wird somit begünstigt. Durch die passive Aufnahme der siRNAs in die Zielzellen kommt es im Gegensatz zur Elektroporation zu keinem signifikanten negativen Einfluss auf die Zellphysiologie. CD4- oder CD8-positive T-Lymphozyten wurden in ein Reaktionsgefäß transferiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten und 800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in Accell siRNA Transfermedium resuspendiert und die Zellen in Triplikaten zu je 2,5 x 10⁵ Zellen/100 µl Volumen in eine 96-Mikrotiterplatte überführt. Die Zellen wurden mit 1 µM Accell Hvgl-1-oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und bis zur Ernte für 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur transienten Transfektion von Jurkat-16 T-Zellen mit Accell siRNA wurden je Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte 5 x 10³ Zellen ausgesät und nach dem obigen Protokoll behandelt.

2.2.3.9 Lipotransfektion von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 6-Lochplatte mit einer Dichte von 6 x 10⁵ Zellen ausgesät und in supplementiertem DMEM Kulturmedium über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für jeden Transfektionsansatz wurden 2 µl TransFectin in 100 µl serumfreiem Medium vorgelegt, mit einer Lösung aus 100 µl serumfreiem Medium und 1 µg DNA vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand der ausplattierten Zellen wurde mit 800 µl supplementiertem Medium substituiert und tropfenweise 200 µl des DNA-TransFectin Komplexes hinzugegeben. Nach 4-6 Stunden wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.3.10 Generierung stabil transfizierter Zelllinien

HEK293 Zelllinien

Zur Generierung stabil transfizierter Zellen wurden HEK293 Zellen mit Expressionsplasmiden und Vektoren, die für eine Blastocidin- (PEF4-myc-His-V5) oder Zeocinresistenz (PUB6) kodieren, kotransfiziert. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ ohne Zugabe von Antibiotika inkubiert, anschließend passagiert und im Verhältnis 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 mit Kulturmedium in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Zellen mit stabil integriertem Plasmid wurden unter Zugabe von 200 µg/ml Zeocin oder 10 µg/ml Blastocidin für 4 Wochen bei 37°C und 5% CO₂ selektioniert und das Selektionsmedium alle 3-4 Tage erneuert. Zur Isolation einzelner Zellkolonien wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden zum Schutz vor dem Austrocknen mit PBS überschichtet, einzelne Kolonien (= Klone) mit einem sterilen Plastikring isoliert und zur Ablösung der Zellen für 5 Minuten mit 2-3 Tropfen einer 0,1% Trypsin/EDTA Lösung inkubiert. Die Zellkolonien wurden daraufhin mit 200 µl Medium versetzt, vorsichtig resuspendiert und in eine 24-Lochplatte mit 2 ml Antibiotika-supplementiertem Kulturmedium transferiert. Für jede zu etablierende Zelllinie wurden 10-12 Zellkolonien isoliert, expandiert und positive Klone im Westernblot oder semiquantitativer PCR identifiziert. Stabil transfizierte Zelllinien wurden anschließend in Flüssigstickstoff kryokonserviert.

Jurkat-16 GFP-Aktin Zelllinie

Zur Herstellung einer stabilen Zelllinie, die ein mit β -Aktin fusioniertes, grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert, wurden 2×10^6 Jurkat-16 T-Zellen mit 1 µg GFP-Aktin cDNA transfiziert (siehe 2.2.3.8). Neben dem Fusionsprotein kodiert die cDNA für ein G418 Resistenzgen, das eine Selektion von nicht-transfizierten Zellen ermöglicht. Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ ohne Zusatz von Selektionsantibiotikum in Medium inkubiert und nach Beurteilung der Transfektionseffizienz unter dem Laserscanmikroskop in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 250 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zum Waschen in 5 ml PBS/2 mM EDTA resuspendiert. Die Jurkat-16 Zellen wurden zu 1×10^6 Zellen/ml in PBS/2 mM EDTA aufgenommen. Die Sortierung der Zellen nach dem grün-fluoreszierenden Protein erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 5000 Zellen/s im Durchflusszytometer. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Die

Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ unter Zusatz von 200 µg/ml G418 Selektionsantibiotikum kultiviert.

2.2.3.11 Induktion der Aktinpolymerisation durch Okt-3

Für die Untersuchung der Polymerisation des zellulären F-Aktins wurden Jurkat-16 GFP-Aktin T-Lymphozyten transient mit 100 nM Kontroll- oder Hvgl-1-siRNA transfiziert (siehe 2.2.3.8) und mit immobilisiertem anti CD3 Antikörper (Okt-3) stimuliert. Hierzu wurde ein 8-Kammerobjektträger mit 150 µl/Vertiefung einer Poly-D-Lysin (PDL) Lösung (10 µg/ml) in PBS versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und der Kammerobjektträger zweimal mit PBS gewaschen. Zur Immobilisierung des stimulatorischen anti CD3 Antikörpers wurde der Kammerobjektträger über Nacht bei 4°C mit 150 µl/Vertiefung Okt-3 (50 µg/ml) in Natriumcarbonatpuffer (pH 9) inkubiert. Für die Kontrolle wurde Natriumcarbonatpuffer ohne Antikörper verwendet.

Der Überstand wurde abpipettiert und 150 µl einer Zellsuspension siRNA-transfizierter Jurkat-16 GFP-Aktin T-Zellen in den Okt-3-beschichteten oder unbeschichteten Kammerobjektträger überführt. Die Zellen wurden für 5 oder 10 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Kammer inkubiert und über einen Zeitraum von 15 Minuten alle 15 Sekunden ein Foto mit dem konfokalen Laserscanmikroskop angefertigt. Die Zellen wurden anschließend mit 200 µl 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bei 4°C gelagert. Um die durch Okt-3 induzierte Aktinpolymerisation und daraus resultierende Polarisierung der Zellen zu quantifizieren, wurden für jede Probe unter dem konfokalen Laserscanmikroskop zufällige Bereiche auf dem Kammerobjektträger ausgewählt und insgesamt mindestens 200 individuelle Zellen in die Kategorien polarisiert und nicht polarisiert eingeteilt.

2.2.3.12 Chemokin-induzierte Aktinpolymerisation

Chemokine sind 8-10 kDa kleine, proinflammatorische und chemotaktisch aktive Proteine, die eine Schlüsselrolle in der Immunantwort, Hematopoiese und Pathogenese infektiöser Agentien einnehmen (Vicente-Manzanares *et al.*, 1999; Worbs *et al.*, 2007; Vlahakis *et al.*, 2002). Die korrespondierenden Chemokinrezeptoren werden in CC und CXC Subtypen eingeteilt. Sie sind als G-Protein-gekoppelte, heptahelikale Rezeptoren auf einer Vielzahl von Zellen wie Lymphozyten, Monozyten, prä B-Zellen, Neuronen, Endothel- und Epithelzellen exprimiert (Strand, 1998; Bilder *et al.*, 2000).

Das Chemokin *Stromal cell-derived factor-1 α* (SDF-1 α , CXCL12) gehört zur CXC Subfamilie und induziert als natürlicher Ligand der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 die Polarisation und Chemotaxis von T- und B-Zellen. Das CC Chemokin *C-C motif ligand 19* (CCL19) und der Chemokinrezeptor CCR7 spielen eine zentrale Rolle in der gerichteten Migration von T-Zellen und Dendritischen Zellen in Lymphknoten.

Zur Analyse der durch Chemokine induzierten Aktinpolymerisation wurden Jurkat-16 oder primäre T-Lymphozyten mit 1 μ M Accell Hugi-1- oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Alternativ wurden die Zellen mit 100nM Hugi-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden im Anschluss entweder unbehandelt belassen oder für 120 Sekunden mit 200 ng/ml der Chemokine SDF-1 α (Jurkat-16) oder CCL19 (primäre T-Zellen) stimuliert und mit 200 μ l einer 4% PFA-Lösung für 10 Minuten fixiert. Für die spezifische, intrazelluläre Färbung des polymerisierten F-Aktins wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 0,1% Saponin permeabilisiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 30 nM Alexa-Fluor-546- oder Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und zur Analyse der Polymerisierung und Reorganisation des F-Aktins unter dem Laserscanmikroskop quantifiziert oder durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3.13 Adhäsions-Assay

Für den Adhäsionsversuch wurde eine 96-Mikrotiterplatte mit 1 μ g/Vertiefung Fibronectin bei 4°C über Nacht beschichtet und unspezifische Bindungsstellen mit PBS/2,5% BSA für 30 Minuten blockiert. Jurkat-16 T-Zellen wurden mit 100 nM Hugi-1- oder Kontroll-siRNA

transfiziert, für 48 Stunden inkubiert und anschließend bei 1500 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in RPMI-1640 Medium ohne Zusätze resuspendiert und auf eine Zelldichte von $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Für die CD3-Stimulation wurden die Zellen in Suspension mit jeweils 3 $\mu\text{g/ml}$ des anti CD3 monoklonalen Antikörpers Okt-3 für 30 Minuten auf Eis inkubiert oder für die Kontrolle unbehandelt belassen. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit Medium gewaschen. Die mit Fibronectin beschichtete 96-Mikrotiterplatte wurde zur Kreuzvernetzung von Okt-3 mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Ziege anti Maus IgG versetzt und je 8×10^4 Zellen in die Vertiefungen der Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden für 60 Minuten bei 4°C inkubiert und unmittelbar danach für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad erhitzt. Nicht adhärierte Zellen wurden durch zweimaliges Waschen mit RPMI Medium entfernt. An Fibronectin adhärierte Zellen wurden schließlich mit dem CellTiter-Glo Lumineszenz Zellviabilitätsassay quantifiziert. Werte für CD3-unstimulierte, Kontroll- oder Hugi-1-siRNA transfizierte Zellen wurden für die Auswertung gleich 1 gesetzt. Die Werte CD3-stimulierter Zellen verhalten sich in Relation dazu.

2.2.3.14 Migationsstudien

In vitro Zellmigrationsassays wurden nach Boyden in einem Zwei-Kammer System durchgeführt (Boyden, 1962) (Abbildung 10). Beide Kammern sind durch einen Polyethylen-(PET)-Filter voneinander abgetrennt, welcher Poren mit einem von der Zellgröße abhängigen Durchmesser enthält (3, 5 oder 8 μm). In die untere Kammer wurde mit 20% Fötalem Bovinem Serum (FBS) supplementiertes Zellkulturmedium (600 μl) gegeben und mit 200 ng/ml des Chemoattractans SDF-1 α (Jurkat-16, HEK293 Zellen) oder CCL19 (primäre T-Zellen) versetzt. 2×10^5 Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden in einem Volumen von 200 μl Kulturmedium und 1% FCS auf die obere Kammer gegeben. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend für 4 Stunden (primäre T-Zellen), 14 Stunden (Jurkat-16) oder 24 Stunden (HEK293 Klone) bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und die durch die Membran migrierten Zellen im CellTiter-Glo Assay quantifiziert. Der prozentuale Anteil migrierter Zellen wurde wie folgt bestimmt: Migration [%] = (Migrierte Zellen im unteren Kompartiment)/(Zellen, die initial auf das obere Kompartiment ausgesät wurden). Alternativ dazu wurde die Zellmigration in Relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) dargestellt.

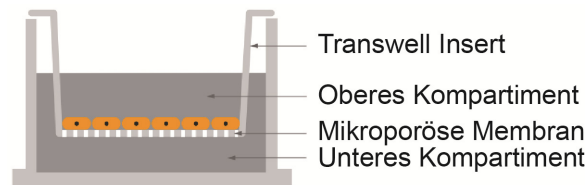


Abbildung 10. Aufbau eines Zweikammer Systems nach Boyden. Modifiziert nach Corning Incorporated, Corning, USA.

2.2.3.15 Cyclin D1 Reporter-Gen-Assay

Genreporter Assays werden häufig zur quantitativen Analyse der Genexpression in zellulären Systemen angewendet. Die Promotorregion des zu untersuchenden Gens, hier das Cyclin D1 Gen, wird dabei stromaufwärts vor einer auf dem pGL3 Basic Reporter Vektor befindlichen Luziferase Gensequenz einkloniert. Diese besitzt keinen eigenen Promotor und Enhancer. In Zellen transfiziert, gibt die Cyclin D1 Promotor-vermittelte Expression der Luziferase unter Zugabe eines Substrats Aufschluss über die endogene Expression der Cyclin D1 mRNA. Das exprimierte Luziferase Enzym katalysiert in einer Biolumineszenzreaktion das Substrat Luciferin in Gegenwart der Cosubstrate ATP und Mg^{2+} zu Oxyluciferin. Die bei der Oxidation frei werdende Energie führt zu einem Übergang von Elektronen in einen angeregten Zustand und zur Emission detektierbarer Lichtquanten.

5×10^5 Zellen/Vertiefung wurden, wie zuvor unter Abschnitt 2.2.3.9 beschrieben, in einer 12-Lochplatte ausgesät und am Folgetag mit $1 \mu\text{g}$ des Cyclin D1 Promotor-Luziferase Reporterkonstruktes oder mit pA3-Leervektor als Kontrolle transfiziert. 83 ng/Vertiefung eines β -Galactosidase (β -Gal) Konstruktes diente als Transfektions- und Normierungskontrolle. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert, das Medium anschließend vorsichtig abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. $200 \mu\text{l/Vertiefung}$ eines $1\times$ Lysepuffers (Promega, Madison, USA) wurde hinzugegeben und die Zellen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Lysierte Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet, in $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäße transferiert und zum Pelletieren von Zellfragmenten bei 12000 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt. Alle hier verwendeten Konstrukte wurden von Dr. D. Strand zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte in Triplikaten in einer weißen 96-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland). In jede Vertiefung wurden $20 \mu\text{l}$

Lysat und 60 µl Luziferase-Substrat pipettiert und die Lumineszenz sofort in einem Spectra Fluor Plus Gerät gemessen. Die β-Gal Messung zur Normalisierung der Messergebnisse wurde in schwarzen 96-Mikrotiterplatten durchgeführt. Das β-Gal Substrat o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (oNPG) wurde im Verhältnis 1:400 in Z-Puffer verdünnt und 20 µl Lysat mit 30 µl der Verdünnung in jede Vertiefung pipettiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte nach 30-minütiger Inkubation der Proben bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Zur Normalisierung der Daten wurde der Quotient aus den Messwerten für die Luziferase- und β-Gal-Aktivität gebildet.

Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄
	40 mM NaH ₂ PO ₄
	10 mM KCl
	1 mM MgSO ₄

2.2.3.16 Durchflusszytometrie (FACS)

Analyse der Zellzyklusverteilung

Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der mit einer Stöchiometrie von einem Farbstoffmolekül per 4-5 Basenpaare in die DNA interkaliert (Waring, 1965). Bei einem Überschuss von PI in der Probe besteht daher ein linearer Zusammenhang zwischen dem zellulären DNA-Gehalt und der Fluoreszenzintensität. Da PI ebenfalls an zelluläre RNA bindet, ist es notwendig, diese durch Behandlung mit Nukleasen zu beseitigen. Durch Messung der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer kann nun auf den DNA-Gehalt der Zelle und damit auf die Verteilung im Zellzyklus geschlossen werden.

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wurden stabil transfizierte HEK293 Klone geerntet, abzentrifugiert (300 g, 5 Minuten, RT) und einmal mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Die Zellen wurden zur Permeabilisierung in 500 µl kaltem Ethanol (75%) resuspendiert und für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS/0,1% BSA gewaschen, in 100 µl Nicolettipuffer aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C in der Dunkelheit inkubiert. Die Proben wurden mit jeweils 300 µl PBS versetzt und in FACS Röhren transferiert. Bis zur Messung im FACSCalibur Durchflusszytometer (FL1) wurden die Proben auf Eis aufbewahrt. Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklusses wurden mit Hilfe

der CellQuest Pro Analysesoftware quantifiziert. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Nicolettipuffer	100 µg/ml PI
	50 µg/ml RNase
	0,1% (w/v) Natriumcitrat
	0,1% (v/v) Triton X-100

Analyse der chemokin-induzierten Aktinpolymerisation

Die Zellen wurden zur Quantifizierung der Aktinpolymerisation wie unter 2.2.3.12 beschrieben behandelt. Die Messung erfolgte im FACSCalibur Durchflusszytometer. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Zur Berechnung der prozentualen Veränderung der F-Aktinspiegel wurde die mittlere Fluoreszenzintensität über den basalen Spiegeln bestimmt und auf 100% normalisiert.

2.2.3.17 Zweidimensionaler (2D) Koloniebildungs-Assay (Colony Formation Assay)

Im 2D Koloniebildungs Versuch wurde der Einfluss der Hugi-1- und Hugi-2-shRNA auf das Wachstum und Koloniebildungsverhalten stabil transfizierter HEK293 Zelllinien untersucht. Nach stabiler Transfektion wurden je Vertiefung einer 6-Lochplatte 5×10^3 Zellen ausgesät und unter Selektion mit dem jeweiligen Antibiotikum für 1 Woche bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Kulturmedium wurde alle 3 Tage erneuert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 5 Minuten mit 100% Methanol fixiert. Einzelne Zellkolonien wurden durch 10-minütige Färbung mit einer 1,5% Giemsa-Lösung visualisiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS mit der Quantity One Software quantifiziert. Alle Platten wurden mit gleichen Softwareeinstellungen für Sensitivität und Hintergrundrauschen analysiert.

Giemsa-Lösung	1,5% (w/v) Giemsa
	Methanol

2.2.3.18 Dreidimensionale (3D) Matrigel Kultur

Zellen der 3D Matrigel Kultur wurden in einer Matrigel Basalmembranmatrix (BD Bioscience, Bedford, USA) kultiviert, einem gallertartigen Gel, das aus solubilisierter, aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkom gewonnener Basalmembran besteht. Gegenüber dem 2D System ermöglicht die 3D Kultur sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Kontakte sowie ein dreidimensionales Zellwachstum, welches auf planaren Kulturplatten nicht möglich ist. Die Matrigel Basalmembranmatrix enthält extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat, Entactin, Nidogen sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren (Vukicevic *et al.*, 1992; Kleinman *et al.*, 1986; Kleinman *et al.*, 1982) und imitiert daher *in vivo* Bedingungen. Zellen, die in einer 3D Matrigel Umgebung wachsen, bilden sphäroide Zellcluster und ermöglichen die Untersuchung von Metastasierungsprozessen, der Zellmorphologie und -polarität.

Matrigel wurde bei -20°C gelagert und vor der Nutzung auf Eis aufgetaut. 8-Kammerobjektträger und Pipettenspitzen wurden auf Eis vorgekühlt und 100 µl/Kammer einer mit kaltem Kulturmedium 1:3 verdünnten Matrigel Basalmembranmatrix ausplattiert. Zur gleichmäßigen Verteilung und Vermeidung von Blasen wurde das Matrigel vorsichtig mit einer vorgekühlten Pipettenspitze verteilt und der 8-Kammerobjektträger anschließend zur Polymerisierung des Gels für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Stabil transfizierte HEK293 Zelllinien wurden geerntet und je Kammer 5×10^3 Zellen in 150 µl supplementiertem Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden zur Anheftung für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 150 µl 10% Matrigel in DMEM Kulturmedium überschichtet und mit Selektionsantibiotika versetzt. Die Zellen wurden für 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und mit 4% PFA fixiert. Die Färbung der Zellcluster erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.3.23 beschrieben. Die Morphologie der Sphäroide wurde in zufällig ausgewählten Feldern im konfokalen Laserscanmikroskop beurteilt und die Prozentzahl abnormaler Zellaggregate wie folgt bestimmt: (Abnormale Zellaggregate)/(Gesamtzahl der Zellaggregate) x 100. Repräsentative Zellformationen wurden zur Dokumentation abfotografiert.

2.2.3.19 CellTiter-Glo Lumineszenz Zellviabilitätsassay

Die Methode des CellTiter-Glo Lumineszenz Zellviabilitätsassays dient zur direkten Bestimmung des intrazellulären ATP-Spiegels von lebenden und metabolisch aktiven Zellen unter

Beteiligung einer rekombinanten Luziferase. Die Zugabe des Reagenzes resultiert in einer Lyse der Zellen und einer Emission eines Lumineszenzsignals. Dieses ist proportional zum intrazellulären ATP-Gehalt und korreliert mit der Zellzahl (Crouch *et al.*, 1993).

Für die Durchführung des Assays wurden in eine 96-Mikrotiterplatte ausgesäte Zellen mit 25 µl/Vertiefung CellTiter-Glo Reagenz versetzt und zur Induktion der Lyse für 2 Minuten auf dem Orbital-Schüttler vermischt. Die Platte wurde zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 80 µl/Vertiefung des Lysates in eine weiße 96-Mikrotiterplatte transferiert. Die Lumineszenzsignale wurden anschließend im Luminometer detektiert. Alle Messungen wurden bei gleichen Geräteeinstellungen (Lesezeit: 400 ms; Empfindlichkeit: 150) durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

2.2.3.20 Proliferations-Assay

Um das Proliferationsverhalten adhärent wachsender HEK293 oder HEK293 Zellklone zu untersuchen, wurden je Vertiefung einer 96-Mikrotiterplatte 1×10^4 Zellen in 100 µl Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden für 0-72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und das Wachstumsverhalten alle 24 Stunden durch eine Viabilitätsmessung mit dem CellTiter-Glo Lumineszenzassay bestimmt. Der Versuch wurde in Quadruplikaten durchgeführt.

2.2.3.21 Zytotoxizitätsversuche

Stabil transfizierte HEK293 Zellklone wurden geerntet und in Quadruplikaten zu je 1×10^4 Zellen/Vertiefung in eine 96-Mikrotiterplatte mit 100 µl Kulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden für den Kontrollwert entweder unbehandelt belassen oder mit Artesunate (200 µM, 18 Stunden) oder Doxorubicin (2 mM, 24 Stunden) versetzt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen mit CellTiter-Glo Reagenz versetzt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die emittierte Lumineszenz in einem Luminometer detektiert.

Bei dem Chemotherapeutikum Artesunate handelt es sich um einen Anti-Malaria Wirkstoff, der zudem profunde Toxizität gegenüber Tumorzellen besitzt (Efferth *et al.*, 2001). Doxoru-

bicin, ein Anthracyclinderivat, gehört dagegen zur Wirkgruppe der Interkalantien und wird als Zytostatikum in der Chemotherapie eingesetzt.

2.2.3.22 Konfokale Zeitraffer-Mikroskopie

Für die Untersuchung des Abtastverhaltens von CD4⁺ T-Zellen auf mDCs wurden die Zellen wie unter Abschnitt 2.2.3.6 und 2.2.3.7 beschrieben aus PBMC isoliert. In jede Vertiefung eines 8-Kammerobjektträgers wurden $1,5 \times 10^5$ mDCs ausgesät und zum Adhärenieren für 15 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. CD4⁺ T-Zellen wurden wie zuvor unter Abschnitt 2.2.3.8 beschrieben mit Accell siRNA transfiziert, nach Inkubation für 48 oder 72 Stunden zu den mDC hinzugegeben und mit diesen für 1 Stunde koinkubiert. Die Kokultur wurde zur Untersuchung der Wechselwirkungen autologer CD4⁺ T-Zellen mit mDCs in einer befeuchteten Kammer bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Unter Verwendung des konfokalen Laserscanmikroskops wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 30 Sekunden eine Zeitrafferaufnahme gemacht.

2.2.3.23 Immunfluoreszenzfärbungen für die konfokale Laserscanmikroskopie

Das Prinzip dieser Art von Mikroskopie besteht darin, dass nur ein bestimmter Teil des vom Präparat reflektierten Lichtes, der „konfokale“, von der Schärfenebene stammende Anteil, eine im Strahlengang des Mikroskops befindliche Lochblende passiert. Hierdurch ist es möglich, sehr dünne optische Schnitte des Präparates in hoher Auflösung zu betrachten. Ein weiterer Vorteil der Methode liegt darin, dass bestimmte zelluläre Strukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und mit einem stark fokussierten Laserstrahl angeregt werden können. Die Zellen wurden in Kammerobjektträgern ausgesät und behandelt wie angegeben. Die Fixierung erfolgte mit 4% PFA in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindestellen und Permeabilisierung für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert. Der Erstantikörper wurde für die Immunfärbung nach Angaben des Herstellers in Blocklösung verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit fluoreszenzmarkiertem Sekundäntikörper (1:200 verdünnt in Blocklösung) und einem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (1:10000) für 1 Stunde bei Raumtem-

peratur und Dunkelheit inkubiert. Unspezifisch bindender Sekundärantikörper und überschüssiger Farbstoff wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Zellen wurden mit PermaFluor Medium präpariert und über Nacht bei 4°C getrocknet. Die Färbungen wurden schließlich mit einem konfokalen Laserscanmikroskop analysiert. Fluoreszenzbilder wurden zur Dokumentation aufgenommen und mit Adobe Photoshop CS5 prozessiert.

Waschpuffer PBS
 0,1% (v/v) Tween-20

Blocklösung PBS
 0,1% (v/v) Tween-20
 3% (w/v) BSA

2.2.4 Tierexperimente

2.2.4.1 Haltung von Experimentaltieren

Alle Tierversuche wurden nach Vorgaben des Tierschutzgesetzes in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz, Deutschland durchgeführt. Die Tiere wurden zu je 5 Individuen in transparenten Plastik Käfigen mit einem Deckel aus Edelstahl und standardisierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 22°C, Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden, Kunstlicht 300 lx). Entkeimtes Trinkwasser und pelletiertes Futter stand allen Versuchstieren zur Verfügung. Die Tiere standen während der gesamten Haltungszeit unter tierärztlicher Kontrolle.

Verwendete Mausstämm

$mgl-2^{flox/flox}$	Transgene Mäuse mit integrierten loxP Sequenzen innerhalb des <i>mgl-2</i> Gens. Verwendet für die konditionale Deletion des <i>mgl-2</i> Gens
$mgl-2^{flox/flox}$ Villin ^{Cre/+}	Verwendet für die darmspezifische Deletion des loxP flankierten (flox) <i>mgl-2</i> Gens
NOD-SCID	Immunsupprimierte Mäuse für Xenograft Studien

2.2.4.2 Transgene Mäuse

2.2.4.2.1 Verpaarung von Experimentaltieren

Für die Verpaarung von Versuchstieren wurden jeweils zwei Weibchen mit einem Männchen in einem transparenten Plastik Käfig mit Edelstahldeckel gehalten. Nach der Paarung wurde das Männchen separiert und die Weibchen bis zur Geburt der Nachkommenschaft weitergehalten. Die Jungtiere wurden 3 Wochen nach der Geburt nach Geschlecht separiert und zu je 5 Individuen pro Käfig aufgeteilt. Die Mäuse wurden individuell markiert und zur Bestimmung des Genotyps eine Mausschwanz-Biopsie durchgeführt. Basierend auf dem Genotyp wurden die Tiere ein weiteres Mal separiert.

2.2.4.2.2 Maus Genotypisierung

Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien

Für die Gewinnung genomischer DNA wurden 5 mm Schwanzspitze von mindestens 3 Wochen alten Mäusen biopsiert und in 200 µl *Tail*-(Mausschwanz)-Puffer und 100 µg Proteinase K bei 55°C über Nacht inkubiert. Nach vollständigem Verdau der Proben wurde die Proteinase K für 5 Minuten bei 99°C inaktiviert und die Ansätze anschließend mit 250 µl H₂O aufgefüllt. Zur Abtrennung von unverdauten Geweberesten wurden die Proben bei 10000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand für die Durchführung der PCR in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Tail-Puffer	200 mM NaCl
	100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
	10 mM EDTA
	7 mM SDS

PCR von genomischer Maus-DNA

Die PCR wurde mit dem Ampliqon III Taq DNA-Polymerase Mastermix (Biomol, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 1 µl DNA-Lösung mit 100 nM Primer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet und die PCR für 36 Zyklen durchgeführt. Die Sequenzen der Primer, Annealingtemperaturen und Produktgrößen der zu erwartenden Fragmente sind in Tabelle 18 dargestellt. 10 µl der PCR Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und zu Analyse der Banden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

Tabelle 18. Verwendete Primer für die Maus Genotypisierung.

Primer		Sequenz	Annealingtemperatur (°C)	Produkt (bp)
554	<i>forward</i>	5'-CTGAAGGTCAAGGGCGG-3'	61	380 (Wt) 550 (flox)
557	<i>reverse</i>	5'-CCCTGAGAGTCTTGGCTG-3'		
555	<i>forward</i>	5'-TAGGGAGGCAGTGGCAGG-3'	60	670 (-/-) 2800 (Wt)
557	<i>reverse</i>	5'-CCCTGAGAGTCTTGGCTG-3'		
Cre	<i>forward</i>	5'-ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT-3'	61	330
	<i>reverse</i>	5'-ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT-3'		

PCR-Ansatz für die Genoty- pisierung (10 Proben)	Ampliqon III (1,1x)	180 µl
	Primer A (100 pmol/µl)	1 µl
	Primer B (100 pmol/µl)	1 µl
	DNA-Vorlage	10 µl
	H ₂ O	8 µl

2.2.4.2.3 Konditionale Deletion von *mgl-2*

Zur Untersuchung der raumzeitlichen und kolonspezifischen Deletion von *mgl-2* wurden 6-8 Wochen alte *mgl-2^{flox/flox} Vii^{Cre/+}* Mäuse verwendet und in Gruppen zu je 5 Tieren eingeteilt. Flox homozygote Tiere, die das Tamoxifen-induzierbare Cre-ER^{T2} Fusionsprotein nicht exprimierten (*mgl-2^{flox/flox}*), dienten als Versuchskontrolle. Den transgenen Mäusen wurde in 5 aufeinanderfolgenden Tagen 100 µl einer Tamoxifen Stammlösung (10 mg/ml) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Körpergewicht, Befindlichkeit und Fellbeschaffenheit der Tiere wurden in einem Intervall von 3 Tagen überwacht. 5 Wochen nach der Injektion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, das Darmgewebe seziiert und in PBS gewaschen. Aus Teilen des Darms (*Jejunum*, *Ileum*, proximaler Kolon, distaler Kolon), Niere und Milz wurde genomische DNA präpariert und eine PCR-Analyse zur Detektion der Rekombination durchgeführt. Die Organe wurden unmittelbar in 4% PFA Lösung fixiert oder in Flüssigstickstoff eingefroren.

Für die Erstellung der Tamoxifen Stammlösung wurden 10 mg Tamoxifen in Ethanol aufgenommen, mit Sonnenblumenöl versetzt und anschließend sterilfiltriert. Die Tamoxifen Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml wurde anschließend für 30 Minuten mit einem Ultraschallgerät homogenisiert und für die Dauer der Injektionen für eine Woche bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4.3 Maus Xenograft Versuche

Für die Tumorigenizitätsstudien wurden 10 Wochen alte NOD-SCID Mäuse verwendet, bei welchen eine schwere Immundefizienz (*severe combined immunodeficiency*; SCID) mit einem nicht fettleibigen, diabetischen Typus (*non-obese diabetic*; NOD) kombiniert ist. 293-pSuper oder 293-pSuper-Hugl-1 Klone wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit

PBS gewaschen, nach der Trypsinierung geerntet und im Anschluss bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden erneut für 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert und das Pellet zu einer Zelldichte von $37,5 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS resuspendiert.

Jeweils 200 μl der Suspension mit $7,5 \times 10^6$ Zellen wurden subkutan in die rechte Leistengegend von NOD-SCID Mäusen injiziert, die zuvor in zwei Gruppen zu je 4 Tieren gleichen Geschlechts und Alter eingeteilt worden waren. Das Tumorstadium wurde alle 3 Tage mit einem digitalen Messschieber (Vernier) überwacht. Die Mäuse wurden nach 39 Tagen *post injectionem* durch cervikale Dislokation getötet und der Tumor sowie Leber und Lunge entfernt. Die Tumorstadien wurden nach folgender Formel berechnet: $\text{Tumorstadium} = (axb^2)/2$, wobei a die längere und b die kürzere Seite des Tumors bezeichnet.

2.2.5 Statistische Analyse

Ergebnisse dieser Arbeit sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten oder Quadruplikaten. Die statistische Analyse zwischen Gruppen wurde mit dem zweiseitigen Student's t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden als signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Hugl-1 und Hugl-2 auf Erhalt und Modulation der Zellpolarität in T-Lymphozyten

Zellpolarität ist für viele Prozesse in T-Zellen erforderlich wie beispielsweise der trans-endothelialen Migration, Proliferation, Zellaktivierung als Antwort auf die Präsentation von Antigenen, oder der Zytotoxizität (Gérard *et al.*, 2007; Russell, 2008). In T-Lymphozyten wie auch in anderen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass die Zellpolarität hauptsächlich von den drei konservierten Polaritätskomplexen Partitioning Defective (Par), Scribble und Crumbs reguliert wird. Die Depletion einzelner Komponenten des Scribble-Komplexes, wie beispielsweise Scribble oder Dlg, führen zum Aussetzen der T-Zellpolarität (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Nelson, 2003; Krummel und Macara, 2006). Ein weiterer Bestandteil des Scribble-Komplexes ist das zu *Drosophila* Lgl homologe Tumorsuppressor- und Polaritätsprotein Human Giant Larvae (Hugl) (Strand *et al.*, 1994b; Strand *et al.*, 1994a). Die zwei wichtigsten Formen dieses Proteins sind Hugl-1 und Hugl-2. In T-Zellen ist die genaue Funktion dieser beiden Polaritätsproteine unbekannt. Auch wurde der direkte Einfluss von Hugl-1 und Hugl-2 auf Erhalt und Modulation der anterior-posterioren T-Zellpolarität und der T-Zellmorphologie bislang nicht analysiert. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher mittels RNA-Interferenz (RNAi)-vermitteltem Gen-Silencing ein Funktionsverlust (*loss-of-function*) in T-Lymphozyten erzeugt, um die funktionelle Rolle von *hugl-1* und *hugl-2* in diesen Prozessen zu untersuchen. Hierzu wurden mit einer entarteten humanen T-Zelllinie, Jurkat-16, sowie mit primären T-Lymphozyten, die aus Humanblut gesunder Spender isoliert wurden, zwei unterschiedliche Zellsysteme analysiert.

3.1.1 Einfluss von Hugl-1 und -2 auf den Erhalt und die Modulation der Zellpolarität von Jurkat-16 T-Zellen

3.1.1.1 Expression von Hugl-1 und Hugl-2 in Jurkat-16 T-Zellen

Im Folgenden wurde mit der humanen T-Zelllinie Jurkat-16 gearbeitet, die 1976 aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) gewonnen worden war (Schneider *et al.*, 1977). Diese Zelllinie ist unsterblich und kann daher leicht kultiviert werden. Um die Expression der Homologe *hugl-1* und -2 auf mRNA Ebene zu

untersuchen, wurde zunächst eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurde die Zell-RNA von Jurkat-16 T-Lymphozyten isoliert und eine cDNA-Synthese mit 1 µg in 20 µl Reaktionsvolumen vorgenommen. Die PCR erfolgte mit spezifischen Primern für Hugl-1 (450 bp), Hugl-2 (470 bp) und β-Aktin (660 bp) mit 1 µl cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Hybridisierungstemperatur betrug für 30 Zyklen 58°C. 20 µl des amplifizierten Produktes wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und die Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert. Das in Abbildung 11 dargestellte Ergebnis zeigt, dass Jurkat-16 Zellen *hugl-1*-, jedoch kaum *hugl-2*-mRNA exprimieren.

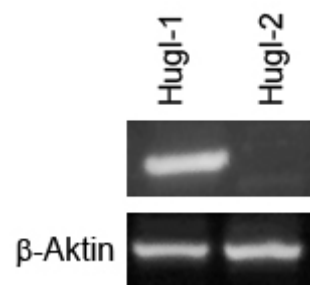


Abbildung 11. Expression von *hugl-1* und *hugl-2* Transkripten in wildtypischen Jurkat-16 T-Zellen. Jurkat-16 Zellen exprimieren *hugl-1*-mRNA. Die Expression von *hugl-2*-mRNA ist dagegen kaum detektierbar. Die Zellen wurden lysiert und 1 µg der isolierten RNA revers transkribiert. Die anschließende PCR wurde mit Hugl-1-, Hugl-2- und β-Aktin-spezifischen Primern für 30 Zyklen und einer Hybridisierungstemperatur von 58°C durchgeführt.

3.1.1.2 Transiente Transfektion von Jurkat-16 T-Zellen mit Hugl-1- oder Kontroll-siRNA

Um den Einfluss von Hugl-1 auf die Regulation der Zellpolarität sowie der Zellmorphologie von Jurkat-16 T-Zellen zu untersuchen, wurde dessen Expression transient mit spezifischer siRNA gehemmt. Hierdurch wurde ein *loss-of-function* Phänotyp generiert, der in funktionellen Studien Rückschlüsse auf die Bedeutung von Hugl-1 für die Zellpolarität ermöglichte. Zunächst wurden Zeitkinetiken mit HEK293 Epithelzellen durchgeführt, um die Funktionalität der in den folgenden Versuchen verwendeten Hugl-1 siRNA zu überprüfen und um den Zeitpunkt der bestmöglichen Suppression der Hugl-1 Expression zu ermitteln. HEK293 Zellen wurden hierzu in Zellkulturschalen ausgesät und mit jeweils 100 nM Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transient transfiziert. Die Inkubation erfolgte für verschiedene Zeitpunkte. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteine in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Hugl-1 sowie gegen β-Aktin als Ladekontrolle inkubiert. Die Banden

wurden mit dem Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem visualisiert. Die in Abbildung 12 dargestellten Daten zeigen, dass die stärkste Suppression von Hugi-1 nach 48 Stunden erreicht wird. Die Expression des Proteins in Kontroll-siRNA inkubierten Zellen bleibt dagegen unbeeinflusst. Alle folgenden siRNA Versuche in dieser Arbeit wurden aus diesem Grund für eine Zeitdauer von 48 Stunden durchgeführt.

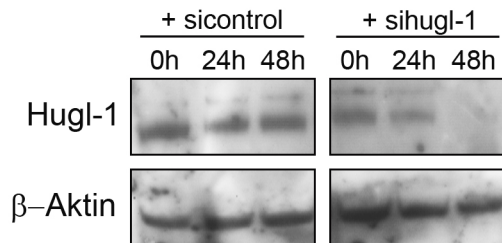


Abbildung 12. Zeitkinetik Hugi-1- und Kontroll-siRNA transfizierter HEK293 Epithelzellen zur Ermittlung der optimalen Transfektionsdauer. Die stärkste siRNA-vermittelte Inhibierung der Hugi-1 Expression wird nach einer Zeitdauer von 48 Stunden erreicht. HEK293 Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und mit jeweils 100 nM Hugi-1- oder unspezifischer Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte inkubiert (0, 24, 48h) und anschließend eine Westernblot Analyse mit Hugi-1- und β-Aktin-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Um die siRNA-vermittelte Hemmung der Hugi-1 Expression auf Transkriptebene in Jurkat-16 T-Zellen zu untersuchen, wurde im Anschluß eine qRT-PCR durchgeführt. Jurkat-16 Zellen wurden im Elektroporator mit 100 nM Hugi-1-siRNA oder 100 nM einer unspezifischen Kontroll-siRNA als Negativkontrolle transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde die Zell-RNA isoliert und 1 µg der RNA in einer reversen Transkriptase Reaktion transkribiert. Die quantitative RT-PCR wurde in einem Lightcycler-Gerät mit Sybr-Green und 1 µl cDNA in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Die relative Expression von *hugi-1* in Kontroll- und Hugi-1-siRNA inkubierten Zellen nach Normalisierung mit der Expression des Haushaltgens *RNA-Polymerase II (RP-II)* ist in Abbildung 13 A dargestellt.

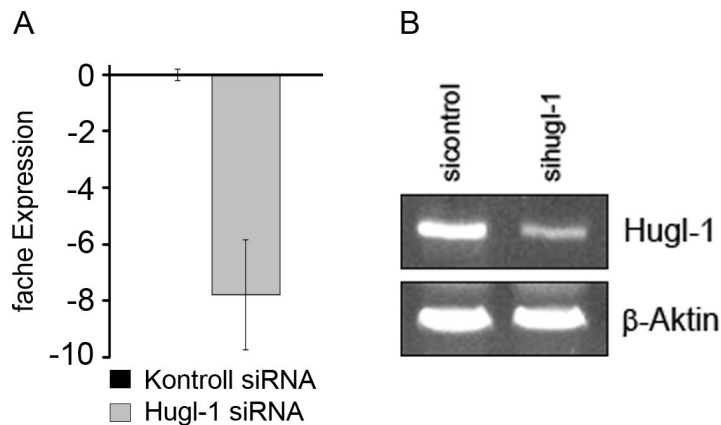


Abbildung 13. Hemmung der *hugl-1* Expression auf Transkriptebene nach Behandlung von Jurkat-16 Zellen mit Hugl-1-spezifischer siRNA. Die Expression von *hugl-1* Transkripten ist im Vergleich zur Kontrolle RNAi-vermittelt um das 7,8-fache reduziert. Jurkat-16 Zellen wurden mit 100 nM Hugl-1- oder 100 nM Kontroll-siRNA transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde eine RNA-Isolation durchgeführt und 1 μ g der RNA in einer reversen Transkriptase Reaktion in cDNA überführt. (A) Eine quantitative RT-PCR mit Sybr-Green wurde durchgeführt und die Expression von *hugl-1* Transkripten mit dem Expressionsniveau von RP-II normalisiert. (B) Das Expressionsniveau von *hugl-1* wurde ebenfalls in einer PCR untersucht. Die Reaktion wurde bei 30 Zyklen und einer Hybridisierungstemperatur von 58°C durchgeführt und die Reaktionsprodukte in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Im Vergleich zur Kontrolle war Hugl-1 in Zellen, die mit Hugl-1-spezifischer siRNA inkubiert wurden, um das 7,8-fache herunterreguliert. Dieser Befund wurde ebenfalls durch Ergebnisse aus der PCR bestätigt, die mit den gleichen Proben vorgenommen wurde (Abbildung 13 B). Die PCR wurde für 28 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 58°C durchgeführt, die Proben in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und zur Visualisierung mit Ethidiumbromid angefärbt.

Als Nächstes wurde die Hemmung der Hugl-1 Expression auf Proteinebene analysiert. Jurkat-16 T-Zellen wurden ausgesät und mit jeweils 100 nM Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert und anschließend einer Westernblot Analyse mit Hugl-1- oder β -Aktin-spezifischen Antikörpern unterzogen.

Aus Abbildung 14 geht hervor, dass die Expression von Hugl-1 in Hugl-1-siRNA-transfizierten Jurkat-16 Zellen fast vollständig gehemmt wird, während die Kontroll-siRNA keinen Einfluss auf die Expression von Hugl-1 ausübt. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass die Hugl-1-siRNA eine Hemmung der *hugl-1* Transkripte bewirkt und die Translation zu einem funktionalen Protein verhindert.

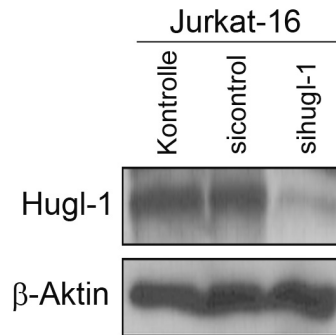


Abbildung 14. Hemmung der Hugl-1 Expression in Jurkat-16 T-Zellen durch Hugl-1-spezifische siRNA. Jurkat-16 Zellen wurden entweder mit 100 nM Hugl-1- oder 100 nM Kontroll-siRNA transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und darauf eine Westernblot Analyse mit Hugl-1-, Hugl-2- und β -Aktin-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Banden wurden mit einem Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem dargestellt.

3.1.1.3 Generierung von Jurkat-16 Aktin-GFP Zellen

Um den Einfluss von Hugl-1 auf die T-Zellpolarität und Aktinpolymerisierung in funktionellen Studien zu untersuchen, wurde zunächst eine Jurkat-16 T-Zelllinie etabliert, die ein mit Aktin fusioniertes, grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Auf diese Weise wird eine Echtzeitbetrachtung der intrazellulären Aktindynamik während der Zellpolarisierung im konfokalen Laserscanmikroskop (LSM) ermöglicht. Jurkat-16 Zellen wurden transient mit 1 μ g cDNA transfiziert, die für GFP-Aktin sowie für das G418 Resistenzgen kodiert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden inkubiert, gewaschen, in PBS-EDTA aufgenommen und im Anschluss im Durchflusszytometer nach dem grün leuchtenden GFP-Protein sortiert und schließlich mit G418 selektioniert. Die jeweiligen Histogramme der FACS-Messung vor und nach der Sortierung sind in Abbildung 15 A, B dargestellt und zeigen eine Anreicherung GFP-positiver Zellen von 12,2% vor und 98,1% nach der Sortierung.

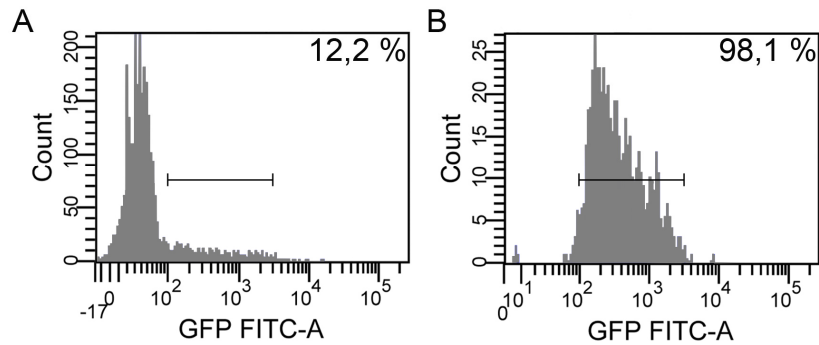


Abbildung 15. Isolation von Jurkat-16 GFP-Aktin Zellen im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Histogramme GFP-sortierter Zellen vor (A) und nach der Sortierung (B). Jurkat-16 Zellen wurden mit 1 µg GFP-Aktin cDNA transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Nach Waschen und Aufnahme in PBS-EDTA wurden die Zellen im Durchflusszytometer nach GFP sortiert.

3.1.1.4 Einfluss von Hugl-1 auf die CD3/TCR Komplex-vermittelte Aktinpolymerisation in Jurkat-16 GFP-Aktin Zellen

Werden T-Zellen über den CD3/T-Zellrezeptor (CD3/TCR) Komplex stimuliert, wird eine unmittelbare Zellreaktion eingeleitet, die eine temporäre Veränderung der Zellmorphologie, wie auch eine Reorganisation bzw. Polymerisation des F-Aktinzytoskeletts zur Folge hat (Parsey und Lewis, 1993; Gallego *et al.*, 1997). Biochemische und genetische Untersuchungen an *Drosophila* und humanen Zellen haben gezeigt, dass Lgl/Hugl-Proteine einen regulatorischen Einfluss auf das F-Aktinzytoskelett durch Interaktion mit dem Nicht-Muskel Myosin-II Motorprotein ausüben können (Strand *et al.*, 1994a; Strand *et al.*, 1994b; Betschinger *et al.*, 2005).

Unter Verwendung des stimulatorischen CD3-spezifischen Antikörpers Okt-3 wurde in diesem Versuch analysiert, inwiefern eine siRNA-vermittelte Suppression von Hugl-1 in aktivierten Jurkat-16 GFP-Aktin Zellen spezifische Änderungen in der Zellform und der F-Aktinmorphologie induziert. Hierzu wurden Jurkat-16 GFP-Aktin T-Zellen mit 100 nM Hugl-1- oder 100 nM Kontroll-siRNA transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden zur Induktion der TCR/CD3-vermittelten Aktinpolymerisation auf einen Kammerobjekträger gegeben. Dieser war zuvor mit Poly-D-Lysin (PDL) und 50 µg/ml des stimulatorischen anti CD3 Antikörper Okt-3 beschichtet worden. Für den direkten Vergleich wurden wildtypische Jurkat-16 T-Zellen mit immobilisierten Okt-3 Antikörpern stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden mit 4% PFA fixiert, der Nukleus mit Hoechst 33342 angefärbt und die Zellen unter dem konfokalen Laserscannmikroskop fotografiert. Die Zellform sowie der Grad der Aktinreorganisation wurden anhand der Aufnahmen ausgewertet.

Abbildung 16 A zeigt lichtmikroskopische Differentialkontrastaufnahmen von Okt-3-stimulierten und -unstimulierten Jurkat-16 T-Zellen. Als Reaktion auf den äußeren Stimulus wiesen Jurkat-16 T-Zellen durch Ausbildung einer ringförmigen lamellipodialen Struktur im Kontrast zu unstimulierten T-Lymphozyten starke Veränderungen der Zellmorphologie auf. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen siRNA-transfizierter und Okt-3-stimulierter Jurkat-16 GFP-Aktin T-Zellen sind dem gegenüber in Abbildung 16 B dargestellt. Kontroll-siRNA behandelte T-Zellen wiesen eine radial angeordnete F-Aktinverteilung auf, die sich als intensiv gefärbter Ring darstellte. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit einer siRNA-vermittelten Hemmung der Hugl-1 Expression überwiegend einen dünnen, kortikalen Aktinring auf. Dieser Befund wurde durch eine quantitative Analyse der zellulären Aktinreorganisation bestätigt (Abbildung 16 C). Aus dieser geht hervor, dass Hugl-1-supprimierte Jurkat-16 T-Zellen in Reaktion auf eine Stimulation mit dem anti CD3 Antikörper Okt-3 einen signifikant geringeren Anteil von Zellen mit vollständig polymerisiertem F-Aktin aufweisen als Kontrollzellen (46% vs. 62%; $p = 0,02$). Zusammenfassend weist das Ergebnis darauf hin, dass das Polaritätsprotein Hugl-1 möglicherweise für die TCR/CD3-vermittelte Reorganisation des Aktinzytoskeletts sowie für die Ausbildung stabiler Lamellipodien erforderlich ist.

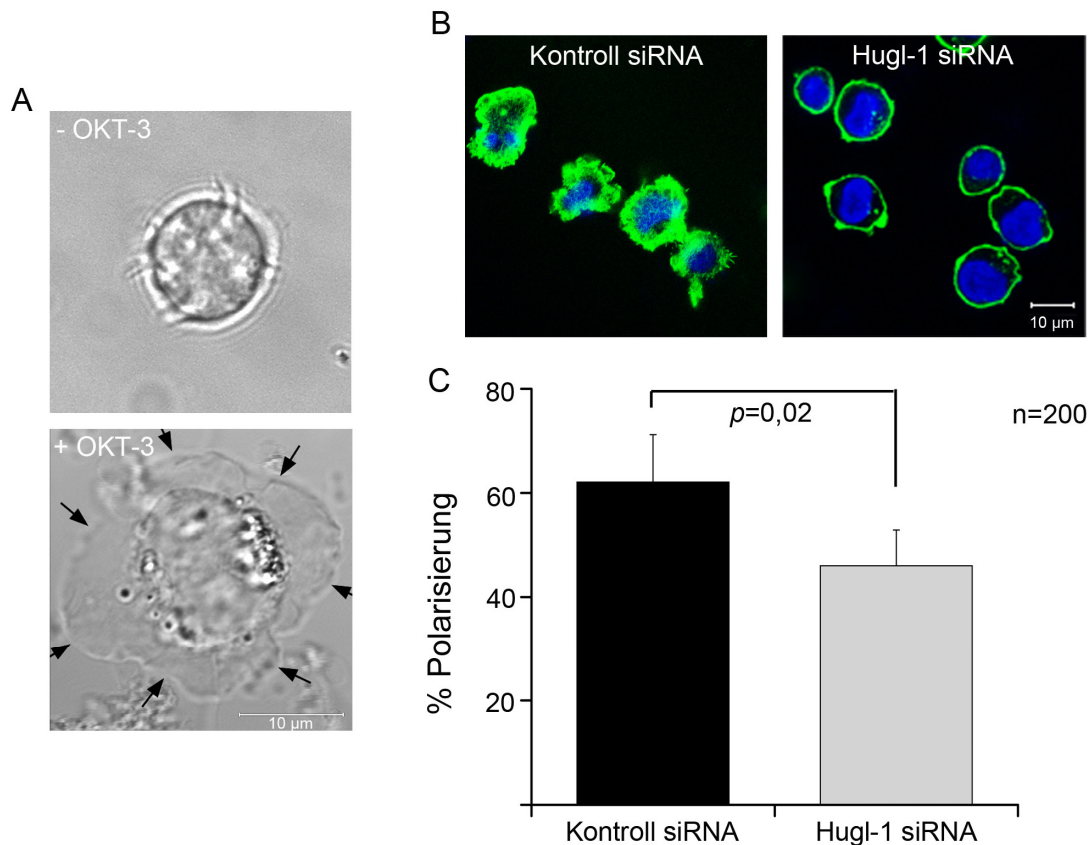


Abbildung 16. Einfluss von Hugl-1 auf die CD3/TCR-vermittelte Ausbildung lamellipodialer Strukturen in Jurkat-16 GFP-Aktin Zellen. Hugl-1-supprimierte Jurkat-16 GFP-Aktin Zellen zeigen eine gehemmte F-Aktinpolymerisierung und Lamellipodien-Bildung als Antwort auf eine CD3/TCR-Stimulation mit Okt-3. (A) Lichtmikroskopische Differentialkontrast-Aufnahmen unstimulierter oder Okt-3 stimulierter Jurkat-16 T-Zellen. Schwarze Pfeile deuten auf Lamellipodien, die sich als Reaktion auf eine Stimulation des CD3/T-Zellrezeptors mit Okt-3 ausbilden. (B) Repräsentative Aufnahmen Okt-3 stimulierter Hugl-1- und Kontroll-siRNA transfizierter Jurkat-16 GFP-Aktin T-Zellen; grün: F-Aktin, blau: Zellkern. (C) Quantitative Auswertung des Versuchs. Es wurden zufällige Bereiche im Laserscanmikroskop ausgewählt und für jede Probe insgesamt 200 polarisierte und nicht-polarisierte Zellen ausgezählt. Jurkat-16 GFP-Aktin Zellen wurden mit 100 nM Kontroll- oder mit 100 nM Hugl-1-siRNA transfiziert, für 48 Stunden inkubiert und anschließend zur Aktivierung auf einen mit PDL und 50 µg/ml Okt-3 beschichteten Kammerobjektträger gegeben. Die Zellen wurden nach 5 Minuten mit 4% PFA fixiert, unmittelbar danach unter dem LSM fotografiert und sowohl die Zellform als auch der Grad der Aktinreorganisation analysiert. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. Der dargestellte Balken entspricht einer Länge von 10 µm.

3.1.1.5 Einfluss von Hugl-1 auf das Adhäsionsverhalten

Die Aktivierung von T-Zellen im Immunsystem erfolgt über den antigenspezifischen CD3/T-Zellrezeptor Komplex, eine Reihe von Korezeptoren der Zelle oder über inflammatorische Chemokine (Romzek *et al.*, 1998). Innerhalb kürzester Zeit führt dies zu einer vorübergehenden Modulation der funktionellen Aktivität von Integrin-Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen. Dieser Vorgang ist abhängig von der Dynamik des Zytoskeletts und dem *inside-out signaling* der Zellen (Agrawal *et al.*, 1995). Die rapide Steigerung der In-

tegrin-vermittelten Adhäsionsfähigkeit befähigt die Zelle, sich an Endothelzellen der Blutgefäße zu binden, mit Antigen-präsentierenden Zellen zu interagieren oder mit der Mikroumgebung des Gewebes in Wechselwirkung zu treten (Romzek *et al.*, 1998).

Jurkat-16 T-Zellen exprimieren Integrine aus der Gruppe der β_1 -Subfamilie, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ (Mechler *et al.*, 1985). Diese vermitteln T-Zellinteraktionen mit Komponenten der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Fibronectin oder Laminin (Shimizu *et al.*, 1990). In aktivierten und migrierenden Zellen werden Integrinrezeptoren über das Aktinzytoskelett rekrutiert und asymmetrisch in der Zellfront sowie in Laufrichtung lokalisiert (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009a). Da die F-Aktin-vermittelte Rekrutierung von Adhäsionsproteinen möglicherweise durch Polaritätsproteine gesteuert wird, wurde im folgenden Versuch untersucht, welchen Effekt Hvgl-1 auf die CD3/TCR-abhängige Regulation der β_1 -Integrin-vermittelten Adhäsion von Jurkat-16 T-Zellen an Fibronectin ausübt.

Für den Adhäsionsversuch wurden Jurkat-16 T-Zellen jeweils mit 100 nM Hvgl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert, für 48 Stunden inkubiert und mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Okt-3 für 30 Minuten bei 4°C stimuliert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in eine 96-Mikrotiterplatte transferrt, die zuvor mit 1 $\mu\text{g/Vertiefung}$ Fibronectin und 1 $\mu\text{g/ml}$ eines Ziege anti Maus IgG Antikörpers als Kreuzvernetzer beschichtet worden war. Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 4°C inkubiert, 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad erhitzt und nicht adhärenzte Zellen abgewaschen. Die an Fibronectin gebundenen Zellen wurden mit dem CellTiter-Glo Kit quantifiziert.

Abbildung 17 veranschaulicht, dass Jurkat-16 T-Zellen mit einem siRNA-vermittelten Hvgl-1-Funktionsverlust eine geringere Adhäsion an Fibronectin aufweisen als Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen (1,3-fach gesteigerte vs. 1,8-fache gesteigerte Adhäsion an Fibronectin; $p = 0,03$). Dies lässt darauf schließen, dass der Verlust von Hvgl-1 über einen noch unbekanntem Mechanismus einen negativen Einfluss auf die Rekrutierung und Aktivität von β_1 -Integrinrezeptoren ausübt.

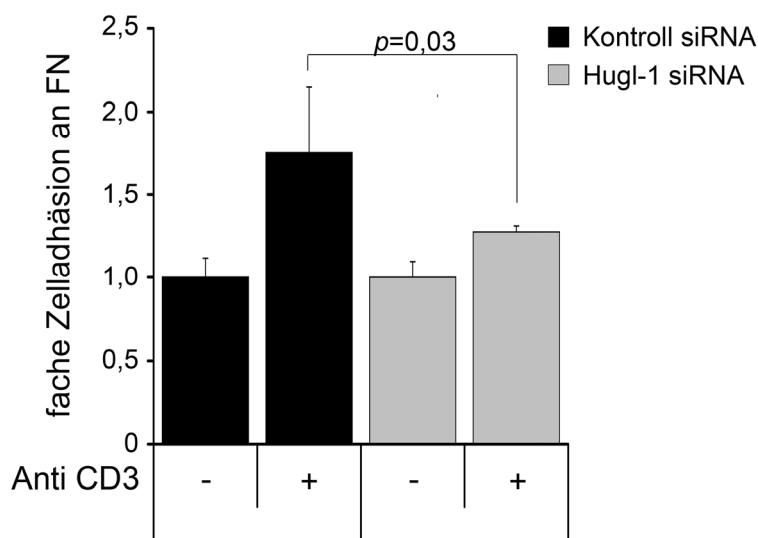


Abbildung 17. Einfluss von Hugel-1 auf die β -Integrin-vermittelte Adhäsion von Jurkat-16 T-Zellen an Fibronectin. TCR/CD3-stimulierte und Hugel-1-siRNA-transfizierte Zellen weisen eine signifikant geringere Bindefähigkeit an Fibronectin auf als Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden (1,3-fach vs. 1,8-fach; $p = 0,03$). Eine 96-Mikrotiterplatte wurde mit 1 μg /Vertiefung Fibronectin über Nacht beschichtet, unspezifische Bindestellen mit PBS/2,5% BSA blockiert und mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ziege anti Maus IgG als Kreuzvernetzer behandelt. Jurkat-16 Zellen wurden für 48 Stunden mit 100 nM Hugel-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert und bei 4°C für 1 Stunde mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Okt-3 stimuliert. Im Anschluss wurden diese auf die vorbereitete 96-Mikrotiterplatte gegeben, 1 Stunde bei 4°C inkubiert, 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad erhitzt und nicht adhärerende Zellen abgewaschen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem CellTiter-Glo Kit. Der Wert adhärierter, unstimulierter Zellen wurde gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte dazu in Relation gesetzt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt und ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

3.1.1.6 Aktinpolymerisation Hugl-1-supprimierter Zellen nach Stimulation mit SDF-1 α

In den vorigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Hugl-1-inhibierte Zellen nach Stimulation mit einem CD3-agonistischem Antikörper eine verminderte Polymerisierung des F-Aktins sowie eine verringerte β_1 -Integrin-vermittelte Adhäsion an Fibronektin aufweisen. Im Vergleich zum CD3/TCR Signalweg ist der Chemokinrezeptor-vermittelte Weg sehr unterschiedlich in Kinetik und Funktion. Im Zusammenhang von Zellpolarität und Migration zeigt dieser zudem eine schnelle und transiente Signaltransduktion, während die CD3/TCR-Signalkaskade über einen Zeitraum von Stunden erhalten bleibt (Dustin und Chan, 2000). In diesem Versuch wurde weiterführend untersucht, welche Rolle Hugl-1 in der durch das Chemokin SDF-1 α induzierten F-Aktinpolymerisierung einnimmt, die über einen G-Proteingekoppelten CXCR4-Rezeptor, und damit über einen vom CD3-Rezeptor unabhängigen Signalweg initiiert wird.

Zur Durchführung des Versuchs wurden Jurkat-16 Zellen mit 1 μ M Accell Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei der verwendeten Accell siRNA handelt es sich um eine chemisch kovalent modifizierte siRNA, die passiv und ohne Elektroporation in die Zelle aufgenommen wird. Die Zellen wurden im Anschluss an die Transfektion entweder nicht behandelt oder für 120 Sekunden mit 200 ng/ml SDF-1 α stimuliert und danach mit 4% PFA fixiert. Für die spezifische Färbung des polymerisierten F-Aktins wurden die Zellen mit 0,1% Saponin permeabilisiert, mit Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin inkubiert und unter dem Laserscannmikroskop quantifiziert. Zur Auswertung wurden die Zellen gemäß der Morphologie und der F-Aktinverteilung klassifiziert und in die Kategorien „vollständig polarisiert“, „teilweise polarisiert“ oder „rund“ eingeteilt (Abbildung 18 A).

Die in Abbildung 18 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass SDF-1 α stimulierte, Hugl-1-supprimierte Zellen signifikant weniger vollständig polarisierte Zellen aufweisen als Kontrollzellen (13,8% vs. 24,0%; $p = 0,027$). Zusätzlich liegt der prozentuale Anteil der zufällig polarisierten, Hugl-1 defizienten Zellen höher als bei Kontrollzellen (79,3% vs. 63,9%; $p = 0,035$). Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Polaritätsprotein Hugl-1 im CXCR4-Rezeptor-vermittelten Signalweg eine wichtige Rolle bei der Polymerisierung des F-Aktinzytoskeletts einnimmt.

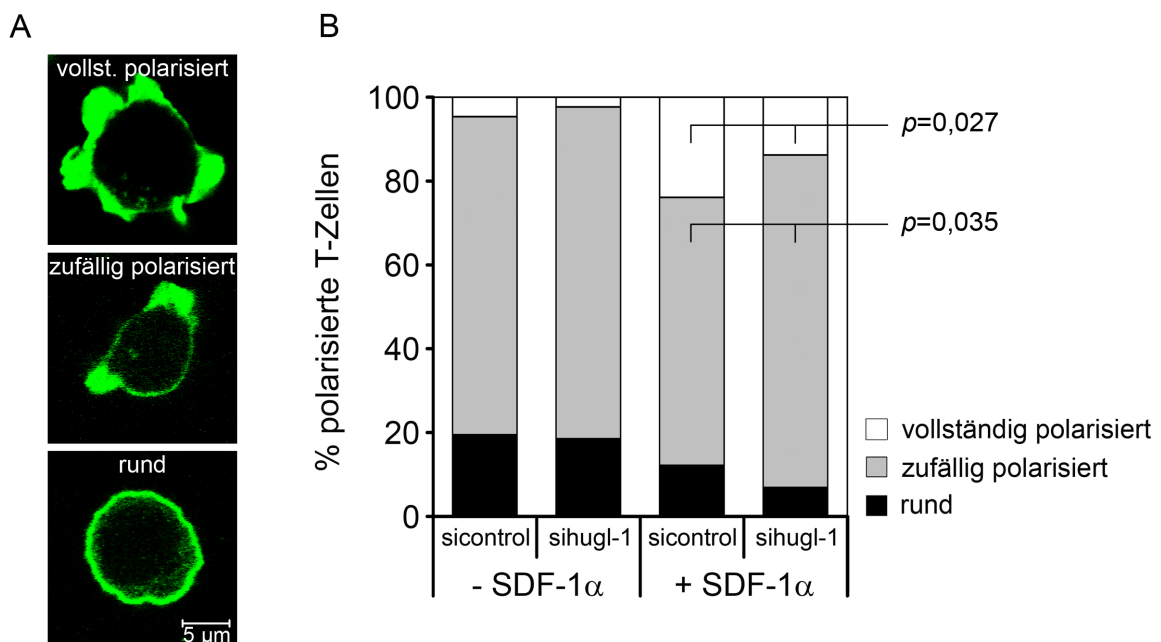


Abbildung 18. Einfluss von Hugl-1 in der CXCR4-Rezeptor-vermittelten Polymerisierung des F-Aktinzytoskeletts von Jurkat-16 T-Zellen. SDF-1 α -stimulierte Zellen mit einem Verlust an Hugl-1 zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen eine abgeschwächte CXCR4-vermittelte Aktinpolymerisierung. (A) SDF-1 α -stimulierte Jurkat-16 T-Zellen wurden der Morphologie und F-Aktinverteilung entsprechend in drei Kategorien eingeteilt: vollständig polarisierte Zellen, Zellen mit zufällig verteiltem F-Aktin und Zellen mit runder Morphologie und basalem F-Aktin Spiegel. (B) Auswertung des Versuchs. Jurkat-16 Zellen wurden mit 1 μ M Accell Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 72 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Chemokin SDF-1 α (200 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen, mit 4% PFA fixiert, mit Alexa-Fluor-488 Phalloidin gefärbt und analysiert. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Versuche.

Zur Visualisierung der Hugl-1 Verteilung wurden die Zellen in einem weiteren Versuch wie zuvor beschrieben behandelt und mit einem gegen Hugl-1 gerichteten Antikörper sowie einem Alexa-488-markierten Zweitantikörper inkubiert. Das F-Aktin wurde mit Alexa-Fluor-546-gekoppeltem Phalloidin sichtbar gemacht und die Zellen im Anschluss unter dem Laserscanmikroskop betrachtet. Die in Abbildung 19 repräsentativ dargestellten Aufnahmen zeigen eine reduzierte Intensität der Hugl-1 Färbung in Hugl-1-siRNA-behandelten Zellen und eine damit verbundene verminderte Polarisierung und Aktinpolymerisierung im Vergleich zur Kontrolle. Einen verminderten Hugl-1 Expressionsstatus weisen daher verstärkt diejenigen Zellen auf, deren F-Aktin vermehrt *zufällig* polarisiert ist. Die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen die zuvor gemachte Entdeckung, dass Hugl-1 eine Rolle in der Zellpolarisation und Aktinpolymerisierung in Jurkat-16 T-Zellen spielt.

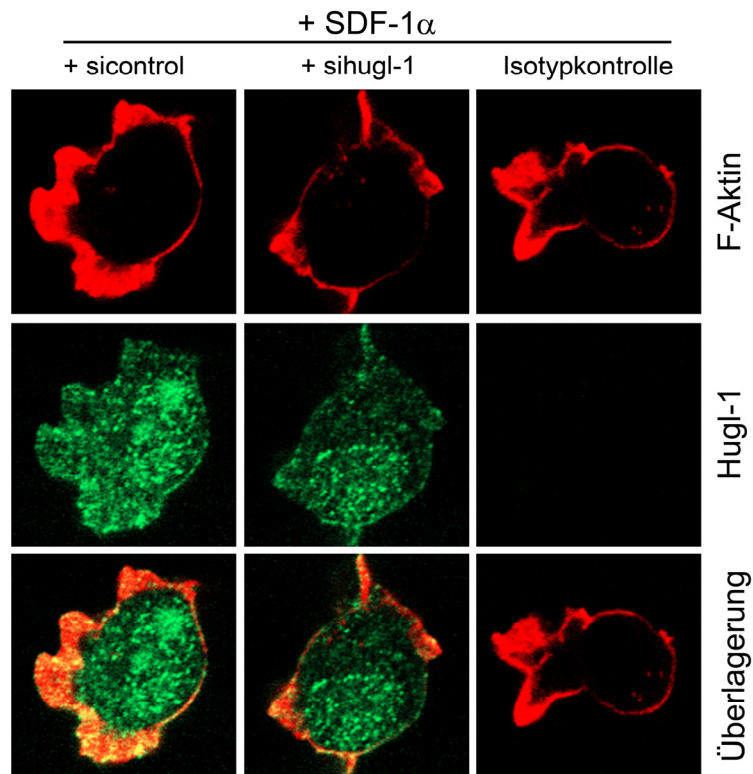


Abbildung 19. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Kontroll- und Hugl-1-siRNA-transfizierter Jurkat-16 T-Zellen. Zellen mit geringer Hugl-1 Expression weisen eine verminderte Zellpolarisierung und Aktinpolymerisierung auf (siehe mittlere Spalte). Alexa-546 Phalloidin-gefärbte Zellen (F-Aktin, rot) wurden zusätzlich mit Hugl-1-spezifischem Antikörper inkubiert. Die Hugl-1 Färbung wurde mit einem anti Kaninchen Alexa-488 Zweitantikörper visualisiert (grün). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen.

3.1.1.7 Durchflusszytometrische Analyse der Aktinpolymerisation in Hugl-1-supprimierten Zellen

Zur Verifizierung der im vorigen Abschnitt erhaltenen Daten wurde die SDF-1 α -induzierte Aktinpolymerisierung und -verteilung in Jurkat-16 Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Hierzu wurden Jurkat-16 Zellen jeweils mit 100 nM Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transient für 48 Stunden transfiziert. Um eine Polymerisierung der F-Aktinfilamente zu induzieren wurden die Zellen mit 200 ng/ml SDF-1 α stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden anschließend mit 4% PFA fixiert, gewaschen und mit 0,1% Saponin permeabilisiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Alexa-Fluor-488-gekoppeltem Phalloidin. Die Messung der Fluoreszenz wurde danach im FACSCalibur Durchflusszytometer durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten je nach Zellprobe Kontroll- oder Hugl-1-siRNA-transfizierte, unstimulierte Zellen. Diese wurden ebenfalls mit Alexa-Fluor-488-gekoppeltem Phalloidin angefärbt.

Die in Abbildung 20 A dargestellten Daten der durchflusszytometrischen Analyse zeigen den F-Aktinspiegel in ruhenden (schwarze Linie) und SDF-1 α -stimulierten Jurkat-16 Zellen (farbige Linie). Stimulierte, Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen weisen im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine schwache Rechtsverschiebung im Histogramm auf. Diese korreliert mit einer Zunahme der SDF-1 α -induzierten Aktinpolymerisation. Im Gegensatz dazu zeigen Hvgl-1-supprimierte Zellen keine oder eine minimale Linksverschiebung gegenüber unstimulierten Zellen. Im direkten Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen sind die F-Aktinspiegel in Hvgl-1-supprimierten Zellen deutlich verringert (88% vs. 129%; Abbildung 20 B). Die Ergebnisse der Messung deuten daher darauf hin, dass die in vorigen Versuchen beobachteten Defekte in der Zellpolarisation Hvgl-1-defizienter Zellen möglicherweise in Verbindung mit dem Prozess des F-Aktin Aufbaus stehen.

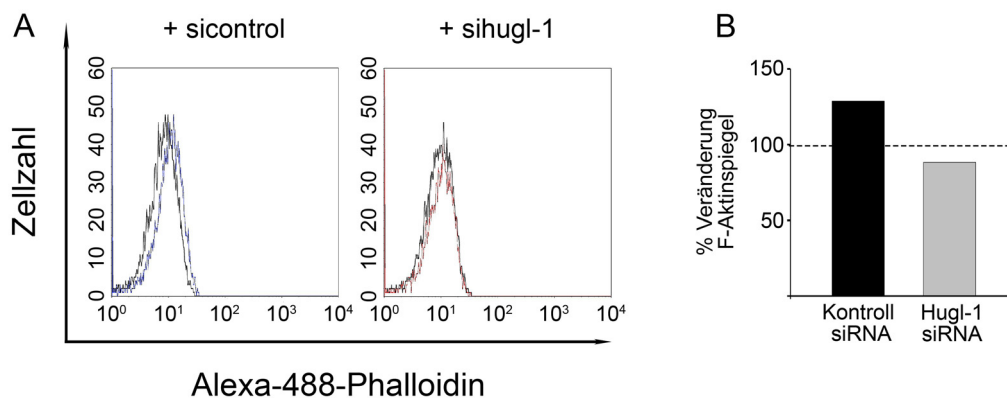


Abbildung 20. Durchflusszytometrische Quantifizierung der Aktinpolymerisation in Jurkat-16 T-Zellen nach Transfektion mit Hvgl-1- oder Kontroll-siRNA und Stimulation mit SDF-1 α . Zellen mit einem Hvgl-1-Verlust weisen einen geringeren Anstieg der F-Aktinspiegel auf als Kontrollzellen und belegen daher, dass Defekte in der Zellpolarität Hvgl-1-supprimierter Zellen möglicherweise in Verbindung mit dem Prozess des F-Aktin Aufbaus stehen. (A) Jurkat-16 Zellen wurden mit 100 nM Hvgl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen entweder nicht behandelt (schwarz) oder mit 200 ng/ml SDF-1 α stimuliert (farbig). Die Zellen wurden fixiert und das F-Aktin mit Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin angefärbt. Die Messung erfolgte im FACSCalibur Durchflusszytometer. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte, mit Alexa-488-Phalloidin gefärbte Zellen (schwarz). (B) Darstellung der Histogramme als prozentuale Veränderung der F-Aktinspiegel. Zur Berechnung der Veränderung der F-Aktinspiegel wurde die mittlere Fluoreszenzintensität über den basalen Spiegeln bestimmt und auf 100% normalisiert.

3.1.1.8 Effekt von Hvgl-1 auf die chemokin-induzierte Migration

Zellmigration ist ein grundlegender polarisierter Prozess. Zentral hierfür ist die Polymerisation und Reorganisation des zellulären F-Aktins. Dieser Vorgang sorgt für eine hohe Zellplastizität und -dynamik und spielt für die Reaktion der Zelle auf äußere Reize, wie beispielsweise auf Chemokine, eine wichtige Rolle (Etienne-Manneville, 2008; Parsey und Lewis, 1993).

Nachfolgend wurde daher der Frage nachgegangen, inwiefern das Polaritätsprotein Hugel-1 die chemokin-induzierte, gerichtete Migration von T-Lymphozyten beeinflusst.

Für den Migrationsversuch wurde eine Boyden Kammer verwendet, die aus zwei durch eine perforierte Membran voneinander abgetrennten Kompartimenten besteht. Jurkat-16 T-Lymphozyten wurden mit 100 nM Hugel-1- oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin auf das obere Kompartiment der Boyden Kammer gegeben, während das untere Kompartiment für die Kontrolle mit Zellkulturmedium und 200 ng/ml des Chemoattraktans SDF-1 α versehen wurde. Die Zellen wurden für 14 Stunden inkubiert und die in das untere Kompartiment migrierten Zellen mit dem CellTiter-Glo Kit quantifiziert.

Die Ergebnisse des Versuchs in Abbildung 21 zeigen, dass die Migration von Zellen mit einem Hugel-1 Verlust, im Vergleich zu Kontrollzellen, signifikant vermindert ist (14,6% vs. 31,7%; $p = 6 \times 10^{-6}$). Die Daten legen daher nahe, dass ein Verlust des Polaritätsproteins Hugel-1 mit einer signifikant reduzierten chemotaktischen Migration von Jurkat-16 T-Zellen korreliert und die Polymerisierung und Dynamik des F-Aktinzytoskeletts abschwächt ist.

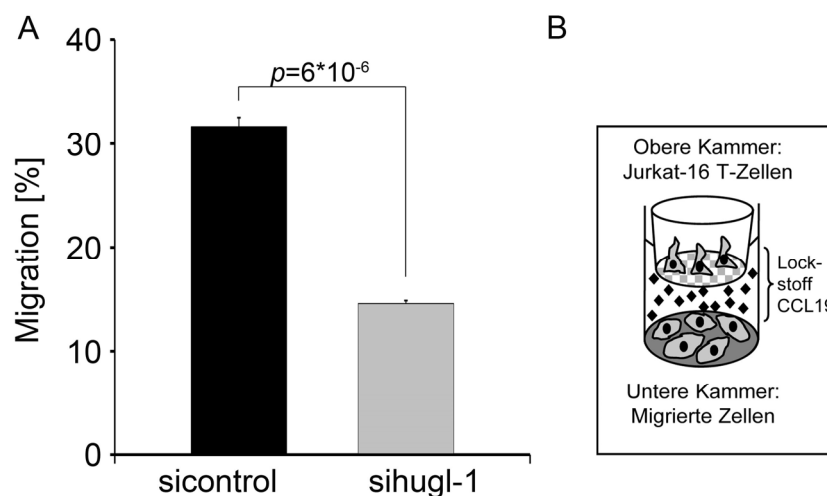


Abbildung 21. Chemotaktische Migration von Kontroll- und Hugel-1-siRNA transfizierten Jurkat-16 T-Zellen. Hugel-1-depletierte Zellen weisen im Vergleich zu Kontrollzellen eine signifikant verminderte migratorische Kapazität auf (14,6% vs. 31,7%; $p = 6 \times 10^{-6}$). (A) Jurkat-16 Zellen wurden mit 100 nM Hugel-1- oder Kontroll-siRNA transient für 48 Stunden transfiziert und im Anschluss für 14 Stunden in einer Boyden Kammer mit 200 ng/ml des Chemoattraktans SDF-1 α inkubiert. Migrierte Zellen wurden im CellTiter-Glo Assay quantifiziert. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für vier voneinander unabhängige Versuche. (B) Schematischer Aufbau des Migrationsversuches. Jurkat-16 T-Zellen werden auf das obere Kompartiment der Kammer gegeben, das untere Kompartiment enthält Medium, welches mit CCL19 als Lockstoff versetzt wurde. T-Zellen, die in die untere Kammer migriert waren wurden mit dem CellTiter-Glo Kit quantifiziert.

3.1.2 Einfluss von Hugl-1 und -2 auf den Erhalt und die Modulation der Zellpolarität primärer T-Zellen

Nach Analyse des Einflusses von Hugl-1 auf entartete Jurkat-16 Tumor-T-Zellen sollte nun die Rolle des Tumorsuppressor- und Polaritätsproteins Hugl-1 in primären T-Zellen gesunder Spender untersucht werden. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden hierzu aus mit Leukozyten und Thrombozyten angereichertem Humanblut isoliert und transient mit Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Zur Identifikation des Einflusses von Hugl-1 auf diese Zellen wurden nachfolgend funktionelle Assays durchgeführt.

3.1.2.1 Expression von Hugl-1 und -2 in primären CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Um die Expression der *hugl-1*- und *hugl-2*-mRNA in primären T-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst eine RT-PCR durchgeführt. Periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden hierzu in einem Ficoll-Dichtegradienten aus Humanblut isoliert. PBMCs wurden zur Isolierung von CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten einer magnetischen Zellseparation (*magnetic cell sorting*, MACS) unterzogen und die Gesamtzell-RNA aus den so erhaltenen Zellen isoliert. 1 µg der isolierten RNA wurde unter Verwendung des cDNA-Synthesekits in 20 µl Reaktionsvolumen zu cDNA transkribiert. Es wurde 1 µl der cDNA mit Hugl-1-, Hugl-2- und β-Aktin-spezifischen Primern in 25 µl Gesamtvolumen in der RT-PCR amplifiziert. Diese wurde für 30 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 58°C durchgeführt und 20 µl des amplifizierten Produkts in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die Banden wurden im Anschluss nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse von *hugl-1* und -2 dargestellt. Primäre CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten exprimieren gleichermaßen *hugl-1*-mRNA, jedoch kaum *hugl-2*-mRNA.

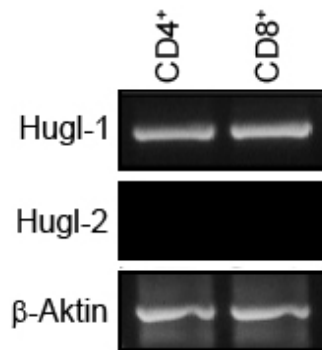


Abbildung 22. Analyse der endogenen Expression von *hugl-1*- und *hugl-2*-mRNA in primären CD4- und CD8-positiven T-Zellen. Die aus Humanblut isolierten primären CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimieren *hugl-1*-mRNA, jedoch kaum *hugl-1* Transkripte. Zur Isolierung primärer T-Zellen wurde Humanblut verwendet, das mit Leukozyten und Thrombozyten angereichert ist. In einem Ficoll-Dichtegradienten wurden PBMCs abgetrennt und zur Isolierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen einer magnetischen Zellseparation unterzogen. Die Zell-RNA wurde isoliert und 1 µg der RNA revers transkribiert. Zur Durchführung der RT-PCR wurde 1 µl der cDNA in 25 µl Reaktionsvolumen verwendet sowie spezifische Primer für Hugl-1, Hugl-2 und β-Aktin.

3.1.2.2 Transiente Transfektion primärer CD4-positiver T-Lymphozyten mit Hugl-1- oder Kontroll-siRNA

Vor Untersuchung der Effekte von Hugl-1 auf die Zellpolarisierung und Aktinpolymerisierung von primären T-Zellen mittels RNAi, sollte zunächst die Spezifität der siRNA-vermittelten Hemmung von Hugl-1 nachgewiesen werden. Die Expression von *hugl-1* Transkripten in Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transfizierten CD4⁺ T-Zellen wurde daher in einer semiquantitativen RT-PCR analysiert. CD4⁺ T-Zellen wurden hierzu im Elektroporator mit 100 nM Hugl-1- oder 100 nM Kontroll-siRNA transient transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zell-RNA wurde extrahiert und 1 µg in der Reverse Transkriptase Reaktion umgesetzt. 1 µg der cDNA wurde in 25 µl PCR-Probenpuffer aufgenommen und unter Verwendung von Hugl-1- und β-Aktin-spezifischen Primern amplifiziert. Die PCR wurde für 30 Zyklen bei 58°C durchgeführt und 20 µl des Produktes in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte nach einer Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht. Aus den in Abbildung 23 A dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass *hugl-1*-kodierende Transkripte in CD4⁺ T-Zellen spezifisch durch Hugl-1-siRNA gehemmt werden.

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die Expression von Hugl-1 in siRNA-inkubierten CD4⁺ T-Zellen auch auf Proteinebene untersucht. Zur Durchführung eines Westernblots wurden CD4⁺ T-Zellen mit 100 nM Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transient transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Proteine in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Membran geblottet und eine Western-

blot Analyse mit Hugl-1- und β -Aktin-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Visualisierung der Banden erfolgte nach Inkubation mit dem Nitro-Block-II CDP-Star Chemilumineszenz-Detektionssystem. Wie aus Abbildung 23 B hervorgeht, führte die Behandlung primärer $CD4^+$ T-Zellen mit Hugl-1-siRNA zur Inhibition der Hugl-1 Proteinexpression. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus RT-PCR und Westernblot eine konsistente, siRNA-vermittelte Reduktion der Hugl-1 Expression auf mRNA- und Proteinebene.

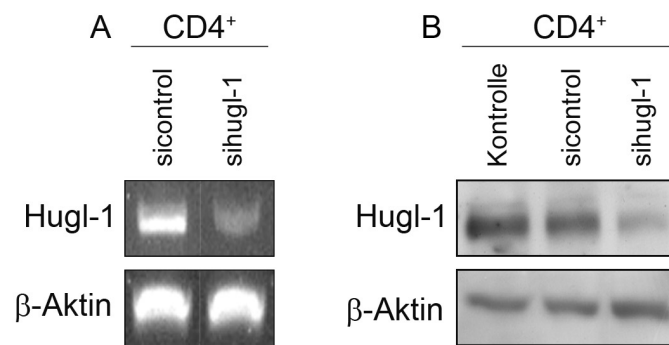


Abbildung 23. Hemmung der Hugl-1 Expression in $CD4^+$ T-Zellen auf Transkriptions- und Translations-ebene nach Transfektion mit Hugl-1-siRNA. $CD4^+$ T-Zellen wurden mit 100 nM Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und die Expression von *hugl-1* auf (A) Transkriptions- (RT-PCR) und (B) Translations-ebene (Westernblot) analysiert. Für die Durchführung der PCR wurde die gesamte Zell-RNA extrahiert und 1 μ g der RNA für die reverse Transkriptase Reaktion verwendet. 1 μ l der cDNA wurden in 25 μ l Reaktionsvolumen aufgenommen und die PCR mit spezifischen Primern für Hugl-1 und β -Aktin durchgeführt. Die Amplifikation wurde für 30 Zyklen bei 58°C durchgeführt und 20 μ l des Produktes in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid. Für die Westernblot Analyse wurden die Zellen lysiert und die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit den Antikörpern anti Hugl-1 und anti β -Aktin inkubiert und ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Die Banden wurden mit dem Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem sichtbar gemacht.

3.1.2.3 Effekt von Hugl-1 auf die F-Aktinpolymerisation und Zellpolarisation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen nach Stimulation mit CCL19

Bis heute ist unbekannt, welche Rolle das Tumorsuppressor- und Polaritätsprotein Hugl-1 in der Morphodynamik – den Änderungen in der Zellmorphologie und Zellpolarität – und der F-Aktinpolymerisation von nicht entarteten, primären T-Zellen spielt. Im folgenden Versuch wurde daher analysiert, wie Hugl-1 diese in T-Zellen beeinflusst, welche mit dem Chemokin C-C Motiv Ligand 19 (*C-C motif ligand 19*, CCL19) stimuliert wurden.

Zuerst wurde untersucht, auf welche Weise das F-Aktinzytoskelett in wildtypischen $CD4^+$ T-Zellen durch CCL19-Stimulation verteilt wird, und welchen Phänotyp sie in Abhängigkeit von der Zeit annehmen. Hierzu wurden primäre $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -T-Zellen mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Negativselektion aus Humanblut

gesunder Spender isoliert und in Suspension mit 200 ng/ml des Chemokins CCL19 stimuliert oder für die Negativkontrolle unbehandelt belassen. Um den optimalen Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die T-Lymphozyten maximal polarisiert sind, wurde eine Zeitkinetik (0, 60, 120, 300 Sekunden) durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend mit 4% PFA fixiert, mit 0,1% Saponin permeabilisiert und das F-Aktinzytoskelett mit Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin angefärbt. Aufnahmen der Zellen wurden unter dem Laserscanmikroskop angefertigt.

In Abbildung 24 A ist die Zeitkinetik der CCL19-stimulierten CD4⁺ T-Lymphozyten dargestellt. Es stellte sich heraus, dass die Zellen nach einer Stimulationsdauer von 120 Sekunden am stärksten polarisiert waren. Nachfolgende Stimulationsversuche in dieser Arbeit wurden daher jeweils für diese Zeitdauer durchgeführt. Die genauere Betrachtung von T-Zellmorphologie und F-Aktinverteilung der CCL19-stimulierten Zellen ergab, dass die Zellen während der Polarisierung etwa vier unterschiedliche Phasen durchlaufen (Abbildung 24 B). In der Ruhephase weisen die meisten der Zellen eine runde Zellmorphologie auf (I). Unmittelbar nach der Stimulation der Zellen mit CCL19 ist erkennbar, dass sich das F-Aktin in zufällig polarisierten Pseudopodien anreichert (II). Viele der Zellen weisen ungefähr 1 Minute nach der Stimulation eine deutliche seitliche Verteilung des F-Aktins auf (III). Bereits nach 2 Minuten bildet eine signifikante Anzahl der Zellen einen torpedoähnlichen Phänotyp mit deutlich sichtbarer Polaritätsachse (IV). Die Ergebnisse zeigen daher, dass der Prozess der CCL19-induzierten T-Zellpolarisierung in aufeinanderfolgenden Schritten verläuft.

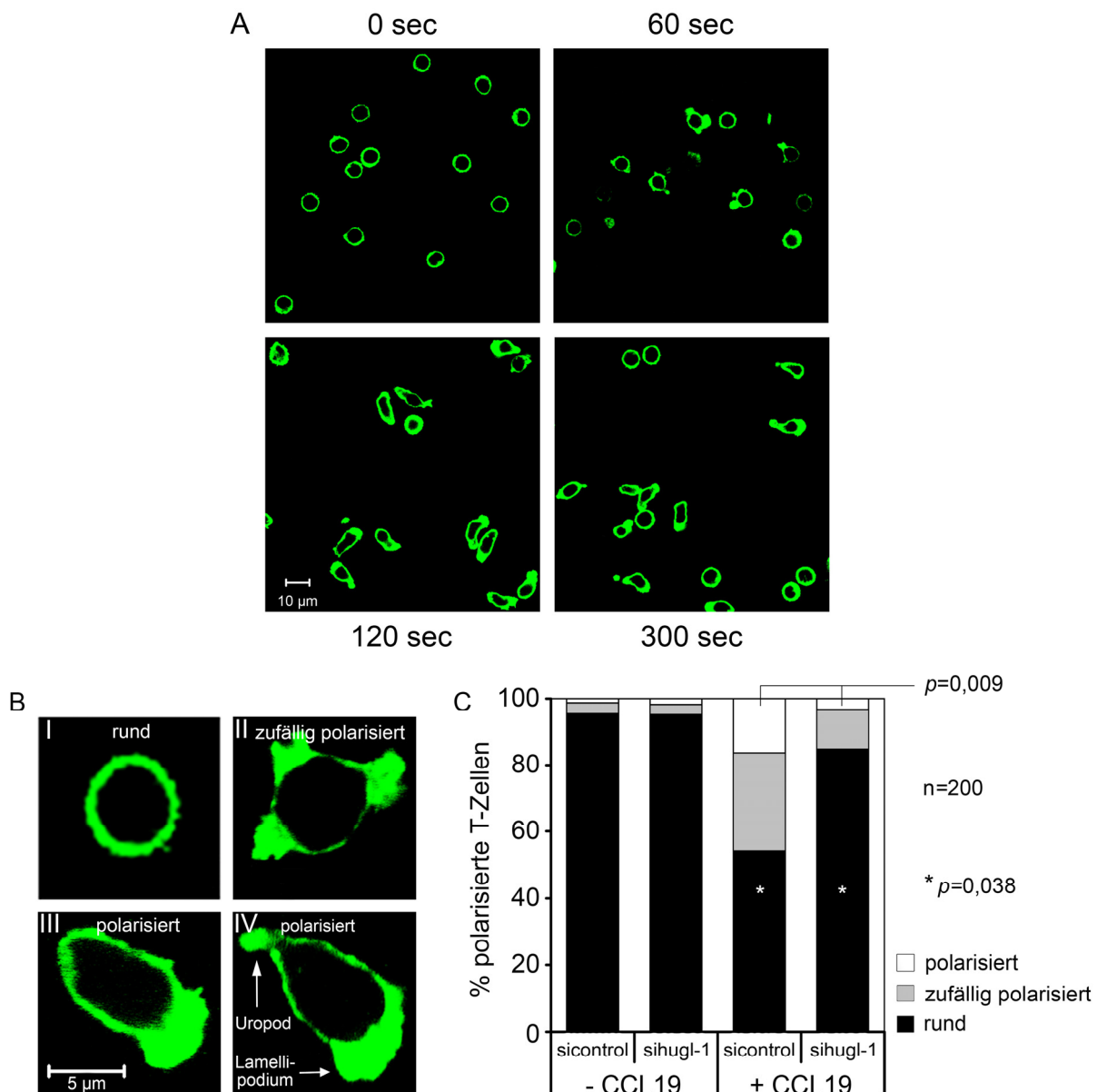


Abbildung 24. F-Aktinpolymerisation und Zellpolarisierung von wildtypischen und siRNA-transfizierten primären T-Lymphozyten nach Stimulation mit CCL19. Die RNAi-vermittelte Suppression von Hugi-1 in CCL19-stimulierten primären T-Zellen führt zur verschlechterten Aktinpolymerisierung und verhindert die Ausbildung eines vollständig polarisierten Phänotyps. Primäre CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten wurden mittels Ficoll-Dichtezentrifugation und magnetischer Zellseparation aus Humanblut isoliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. (A) Die Zellen wurden anschließend für unterschiedliche Zeitpunkte (0, 60, 120, 300 Sekunden) mit 200 ng/ml CCL19 in Suspension inkubiert und mit 4% PFA fixiert. Nach Permeabilisierung der Zellen und Anfärbung des F-Aktinzytoskeletts mit Alexa-Fluor-488-konjugiertem Phalloidin wurden mit dem Laserscannmikroskop zu den jeweiligen Zeitpunkten repräsentative Aufnahmen gemacht. Der dargestellte Balken entspricht einer Länge von 10 μ m. (B) Während der Polarisierung der Zellen wurden vier morphologisch unterschiedliche Phasen durchlaufen (siehe Text). Uropod und Lamellipodium der Zelle sind durch Pfeile markiert. Der Balken entspricht einer Länge von 5 μ m. (C) T-Zellen wurden mit 1 μ M Accell Hugi-1- oder KontrollsiRNA transfiziert und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit 200 ng/ml CCL19, für die Kontrolle wurden die Zellen unstimuliert belassen. Die Färbung des F-Aktins der Zellen wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Für die Analyse der Zellmorphologie und F-Aktinverteilung unter dem Laserscannmikroskop wurden je Bedingung mindestens 200 Zellen untersucht und in drei Kategorien klassifiziert: weiß, vollständig polarisierte Zellen; grau, Zellen mit zufällig verteiltem F-Aktin; schwarz, Zellen mit runder Morphologie und basalem Spiegel an F-Aktin. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Versuche.

Für die weitere Analyse des Einflusses von Hvgl-1 auf die T-Zellmorphologie und F-Aktinpolymerisation während der CCL19-induzierten T-Zellpolarisierung wurden die T-Zellen wie zuvor beschrieben aus Humanblut isoliert. Die Zellen wurden mit 1 μ M Accell Kontroll- oder Hvgl-1 siRNA transient transfiziert und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit 200 ng/ml CCL19 für 120 Sekunden, gefolgt von einer Fixierung mit 4% PFA und Färbung mit F-Aktin-spezifischem und Alexa-488-gekoppeltem Phalloidin. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Analyse der Zellen erfolgte unter dem Laser-scannmikroskop. Zur näheren Klassifizierung der Morphologie wurden die T-Zellen in unterschiedliche Kategorien eingeteilt („rund“, „zufällig polarisiert“ und „polarisiert“; für repräsentative Beispiele siehe auch Abbildung 24 B).

Aus den in Abbildung 24 C dargestellten Daten geht hervor, dass primäre T-Zellen mit einem RNAi-vermittelten Verlust von Hvgl-1 nach Stimulation mit CCL19 eine signifikant schlechtere Aktinpolymerisierung aufweisen als Kontrollzellen und daher verstärkt eine nicht-polarisierte, runde Morphologie zeigen (84,8% vs. 53,8%; $p = 0,038$). Darüber hinaus ist die Fraktion der Zellen mit einem vollständig polarisierten Phänotyp im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert (3,3% vs. 16,3%; $p = 0,009$). In unstimulierten Zellen (- CCL19) hat die siRNA-vermittelte Depletion von Hvgl-1 weder einen Einfluss auf die F-Aktinverteilung noch auf die Morphologie von primären T-Zellen. Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass Hvgl-1 eine Rolle in der Chemokin-vermittelten Aktinpolymerisierung und Polarisierung primärer T-Lymphozyten spielt.

Zur Visualisierung der endogenen Hvgl-1 Expression in Hvgl-1- und Kontroll-siRNA transfizierten T-Lymphozyten wurden die Zellen mit CCL19 stimuliert und mit 4% PFA fixiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Zellen wurden permeabilisiert und das F-Aktinzytoskelett mit Alexa-Fluor-546-konjugiertem Phalloidin sowie Hvgl-1 mit einem Hvgl-1-spezifischen Antikörper angefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342. Die Ergebnisse in Abbildung 25 demonstrieren, dass Hvgl-1 in stimulierten wie auch in unstimulierten Zellen primär am Zellkortex lokalisiert ist. Ein Teil des Proteins ist darüber hinaus zytosolisch verteilt. Die Fluoreszenzintensität von Hvgl-1 in Hvgl-1-supprimierten Lymphozyten ist im Vergleich zur Kontrolle und in Übereinstimmung mit den Daten aus RT-PCR und Westernblot (Abbildung 23) signifikant verringert. Dieser Befund korreliert mit einer abgeschwächten Aktinpolymerisierung und einer gehemmten Polarisierung CCL19-stimulierter Zellen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass Hugl-1 möglicherweise eine wichtige Funktion beim Umbau des zellulären F-Aktinskeletts inne hat sowie bei der CCL19-induzierten Polarisierung von T-Lymphozyten. In Übereinstimmung mit den in Abbildung 24 C dargestellten Daten legen die Ergebnisse zudem nahe, dass Hugl-1 in ruhenden, unstimulierten Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Polymerisation von F-Aktin ausübt, sondern erst nach Stimulation mit CCL19.

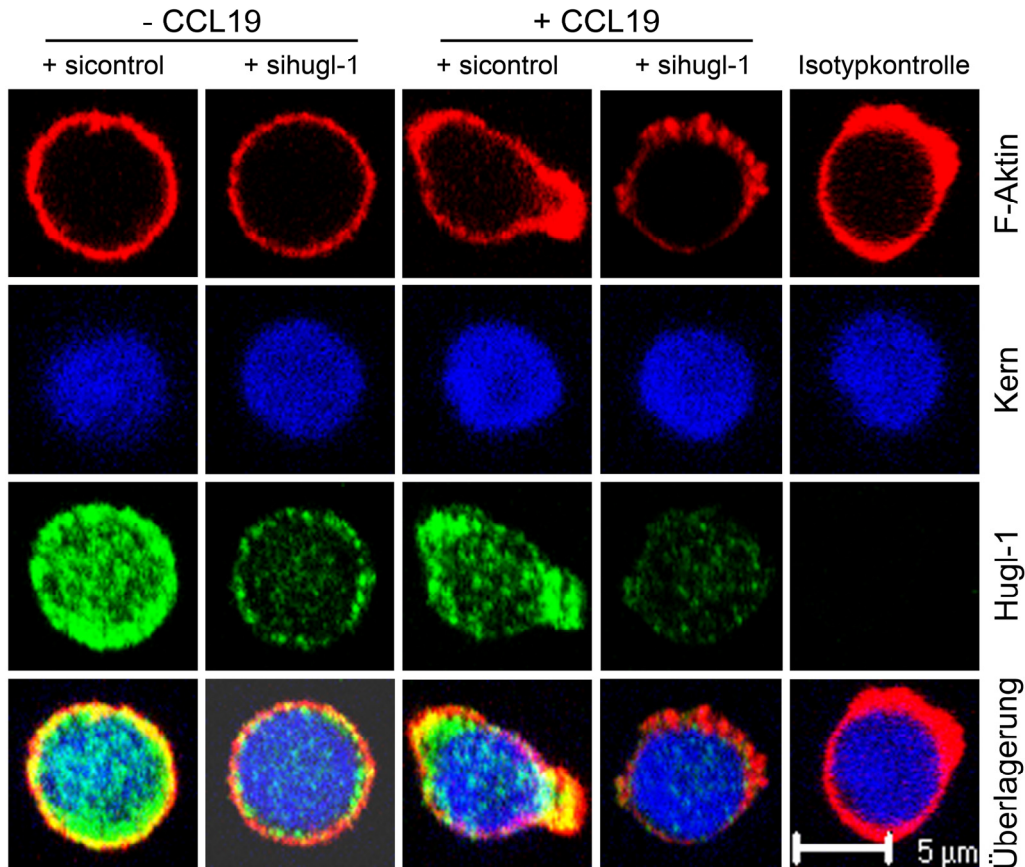


Abbildung 25. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen CCL19-stimulierter primärer T-Zellen nach Transfektion mit Hugl-1- oder Kontroll-siRNA. Die siRNA-vermittelte Hemmung der Hugl-1 Expression in CCL19-stimulierten T-Lymphozyten korreliert mit einer abgeschwächten F-Aktinpolymerisierung und Zellpolarisierung. Primäre T-Lymphozyten wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender magnetischer Zellseparierung aus Humanblut isoliert und mit 1 µM Accell Hugl-1- oder Kontroll-siRNA für 72 Stunden transfiziert. Die Zellen wurden für 120 Sekunden mit 200 ng/ml CCL19 stimuliert oder als Negativkontrolle unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, permeabilisiert und das F-Aktinzytoskelett mit Alexa-Fluor-546-konjugiertem Phalloidin und Hugl-1-spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Zellnuklei wurden mit dem Kernfarbstoff Hoechst 33342 sichtbar gemacht.

3.1.2.4 Einfluss von Hvgl-1 auf die Kontaktaufnahme von naiven CD4⁺ T-Zellen und Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) kommen in den meisten Geweben vor und nehmen im Immunsystem eine wichtige Stellung ein. Unter den Immunzellen repräsentieren sie die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) (Kaiser *et al.*, 2005). DCs können durch die Präsentation von Antigenen, aber auch durch kostimulatorische Moleküle, Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine, spezifische Zellreaktionen in naiven T-Zellen induzieren (Banchereau und Steinman, 1998). In Lymphknoten bewegen sich naive T-Zellen ungerichtet und tasten auf der Suche nach präsentierten Antigenen die Oberflächen einer großen Anzahl von DCs ab. Die Interaktion der T-Zellen mit APC wird gesteigert, indem reife DCs (*mature dendritic cells*, mDCs) einen polarisierten und motilen Status in diesen durch Sekretion des Chemokins CCL19 hervorrufen (Kaiser *et al.*, 2005). Das Zusammentreffen von T-Zelle und Antigen wird begünstigt und die zelluläre Immunantwort eingeleitet. In vorigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung eines CCL19-induzierten und vollständig polarisierten Phänotyps in CD4-positiven T-Lymphozyten durch eine siRNA-vermittelte Suppression von Hvgl-1 verhindert wird. In dem folgenden Versuch wurde daher untersucht, welchen Einfluss Hvgl-1 auf die Motilität, Morphologie und Migrationsgeschwindigkeit von autologen, naiven CD4⁺ T-Zellen ausübt, wenn diese in Abwesenheit exogener Antigene mit mDCs kokubiert werden.

Für die Durchführung des Versuchs wurden DCs aus Monozyten generiert, welche zuvor aus PBMCs gesunder Spender isoliert worden waren. Die Monozyten wurden dazu in zytokin-supplementiertes Zellmedium aufgenommen und zur Differenzierung in DCs für acht Tage unter Zugabe von frischem Medium und Zytokinen kultiviert. Ab dem achten Tag wurden die DCs zur Induktion der Ausreifung in Maturierungsmedium gehalten. Humane, naive CD4⁺ T-Zellen wurden aus PBMCs des gleichen Spenders durch Negativselektion gewonnen, mit 1 µM Accell Hvgl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 48 oder 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

Ausgereifte DCs wurden in einen Kammerobjektträger ausgesät und nach der Adhäsion mit transfizierten T-Zellen für eine Stunde bei 37°C kokubiert. Um die Wechselwirkungen der autologen CD4⁺ T-Zellen mit reifen DCs zu untersuchen, wurde ein Zeitraffer-Mikroskopie-System verwendet und die Kontaktaufnahme von T-Zellen und mDCs über einen Zeitraum

von 30 Minuten überwacht. Repräsentative Aufnahmen der mDC-T-Zell Interaktionen sind zur Übersicht in Abbildung 26 dargestellt.

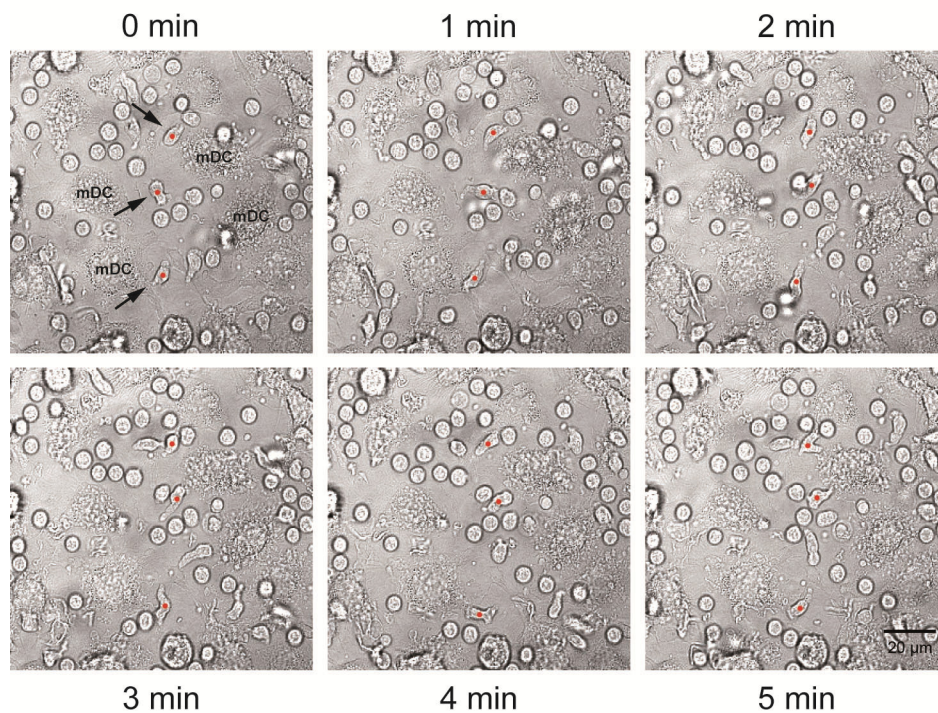


Abbildung 26. Kontaktaufnahme zwischen autologen CD4⁺ T-Zellen und mDCs. mDCs wurden zum Adhärenieren in Kammerdeckgläschen ausgesät, mit autologen CD4⁺ T-Lymphozyten für 1 Stunde kokultiviert und dann über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einem Zeitraffer-Mikroskopie-System fotodokumentiert. Die Bilder wurden im Abstand von 1 Minute aufgenommen, um die zeitliche Veränderung der Zellmorphologie darzustellen. Die Pfeile im ersten Bild (0 min) markieren beliebige T-Zellen, die zur besseren Verfolgbarkeit in den Abbildungen mit einem roten Punkt markiert wurden. Reife Dendritische Zellen (mDCs) sind ebenfalls gekennzeichnet. Der dargestellte Balken entspricht einer Länge von 20 µm.

Die Quantifizierung motiler und polarisierter Zellen erfolgte anhand verschiedener Aufnahmen und wurde zu jeweils gleichen Zeitpunkten durchgeführt. In Abbildung 27 A und B sind die Ergebnisse dieser Analyse dargestellt. Manche der T-Zellen zeigten während des Abtastens der mDCs eine sich rasch verändernde Morphologie. Die Zellen nahmen eine torpedo-ähnliche Form mit einer ausgeprägten, die Bewegungsrichtung bestimmenden Vorderfront an, während sich am posterioren Teil der Zelle ein Uropod ausbildete. Es ist ersichtlich, dass Hvgl-1-supprimierte CD4⁺ T-Zellen nach 48 Stunden einen geringeren Anteil motiler und damit polarisierter Zellen aufweisen als in der Kontrolle (21,1% vs. 25,9%). Diese Tendenz war gleichermaßen für Zellen zu beobachten, die für 72 Stunden mit Hvgl-1- oder Kontroll-siRNA behandelt wurden (23,9% vs. 21,4%).

Die Daten weisen tendenziell darauf hin, dass der Verlust des Polaritätsproteins Hugl-1 die durch mDCs induzierte Polarisierung und Motilität der CD4⁺ T-Zellen vermindert. Die Ergebnisse decken sich mit den in Abschnitt 3.1.2.3 gemachten Beobachtungen. Dort führte die RNAi-vermittelte Suppression von Hugl-1 in CCL19-induzierten primären T-Lymphozyten zu einer verschlechterten F-Aktinpolymerisierung sowie zur verminderten Ausbildung eines vollständig polarisierten Phänotyps.

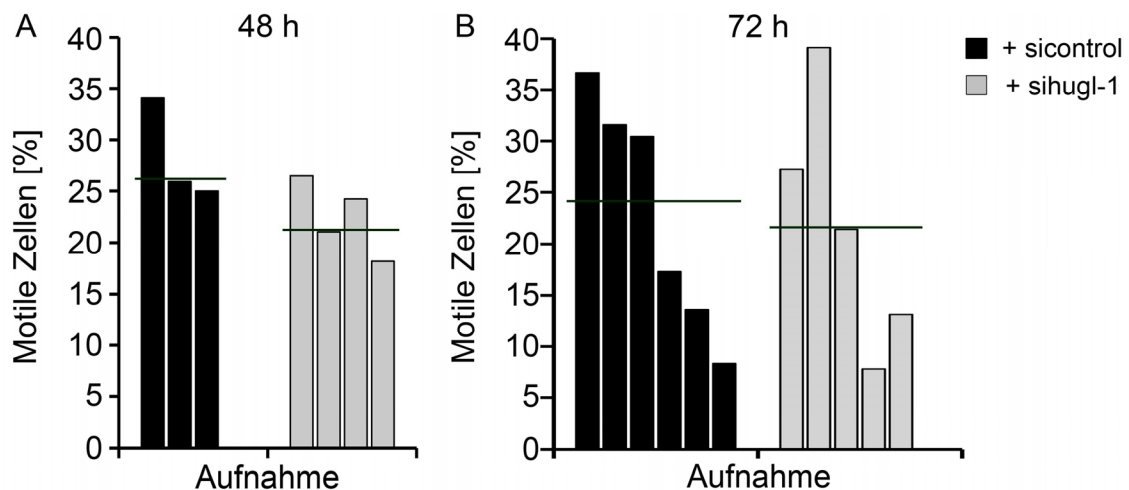


Abbildung 27. Motilität CD4-positiver T-Lymphozyten auf mDCs. Hugl-1-depletierte CD4-positive T-Zellen zeigen eine verminderte mDC-induzierte Motilität und Polarisierung. Monozyten wurden aus PBMCs isoliert, die aus Spenderblut gewonnen worden waren und unter Zugabe von Maturierungsmedium und Zytokinen zu mDCs ausgereift. CD4-positive T-Zellen wurden durch Negativselektion aus PBMCs gewonnen und für (A) 48 Stunden oder (B) 72 Stunden mit 1 μ M Accell Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert. Daraufhin wurden die mDCs mit behandelten CD4-positiven T-Lymphozyten für eine Stunde bei 37°C koinkubiert. Zur Untersuchung der mDC-induzierten Polarisierung und Motilität der T-Zellen wurde ein Zeitraffer-Mikroskopie-System verwendet und über einen Zeitraum von 30 Minuten fotodokumentiert. Zur Quantifizierung polarisierter und motiler T-Zellen wurden unterschiedliche Fotos zu jeweils gleichen Zeitpunkten ausgewertet. Jeder Balken repräsentiert eine Aufnahme, für welche jeweils 30 - 40 Zellen analysiert wurden.

Neben der Quantifizierung von motilen, DCs-abtastenden T-Zellen mit polarisiertem Phänotyp wurden auch diejenigen Zellen einer genaueren Betrachtung unterzogen, die einen runden und nichtmotilen Phänotyp aufwiesen. Diese Zellen zeigten unter anderem ein passives Verhalten und zeichneten sich durch sehr wenige Interaktionen mit mDCs aus. Zur genaueren Analyse dieser Zellfraktion wurden alle T-Zellen gemäß ihres Phänotyps in drei Kategorien klassifiziert. Nichtpolarisierte Zellen ohne gerichtete Motilität und nur minimaler Veränderung der Zellmorphologie wurden als „runde“ Zellen klassifiziert, während agile Zellen mit torpedoähnlichem Erscheinungsbild, einer ausgeprägten Vorderfront und einem Uropod als „vollständig polarisierte und motile Zellen“ bezeichnet wurden. Die dritte Gruppe stellten diejenigen Zellen dar, die einen „Übergangszustand“ zwischen „rundem“ und „vollständig polarisierten“ Phänotypen einnahmen. Diese Zellen zeichneten sich durch eine geringe und

ungerichtete Motilität aus, einer atypischen Zellmorphologie sowie durch eine nicht zielgerichtete Polarisierung der Zelle. Aus den in Abbildung 28 A dargestellten Daten geht hervor, dass im Mittel $45,5 \pm 16,6\%$ der Hugl-1-depletierten CD4-positiven T-Zellen auf mDCs im Vergleich zur Kontrolle ($24,2 \pm 12,8\%$) diesen Übergangszustand einnehmen ($p = 0,039$). In Abbildung 28 B sind repräsentativ Zellen für alle drei Kategorien dargestellt.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse den Schluss nahe, dass Hugl-1 essenziell ist für die mDC-induzierte Polarisierung und die gerichtete Motilität von CD4-positiven T-Lymphozyten. Der Verlust des Polaritätsproteins führt verstärkt zu einem Phänotyp mit atypischer Zellmorphologie, der zwischen dem runden, nichtpolarisierten und vollständig polarisierten Typus als eine Art Übergangszustand einzuordnen ist.

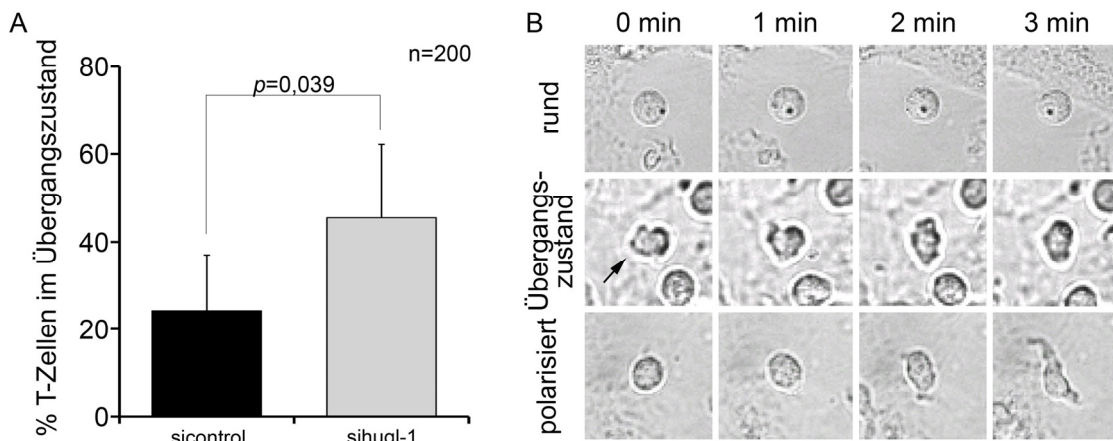


Abbildung 28. Morphologische Analyse nichtmotiler CD4-positiver T-Zellen auf mDCs. (A) Hugl-1-depletierte CD4⁺ T-Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle verstärkt einen nicht- bis gering-motilen Phänotypen mit atypischer Zellmorphologie und nicht-zielgerichteter Zellpolarisierung. Sie bilden somit einen Übergangszustand zwischen dem runden und vollständig polarisierten Zelltypus ($p = 0,0399$). Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Phänotypen wurden die Zellen in die Kategorien „rund“, „vollständig polarisiert“ oder in Zellen im „Übergangszustand“ eingeteilt. Die Daten wurden aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten erhoben. Für jede Bedingung wurden insgesamt 200 Zellen untersucht. (B) Repräsentative Darstellung der Zellen der unterschiedlichen Kategorien. Die Bilder wurden im Abstand von 1 Minute aufgenommen, um die Veränderungen der Zellmorphologie im Zeitverlauf darzustellen.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Hugl-1 auf die Abtastgeschwindigkeit primärer T-Zellen während der Migration auf mDCs ausübt, wurden CD4-positiv T-Zellen mit 1 μM Accell Hugl-1- oder Kontroll-siRNA für 72 Stunden transfiziert und mit ausgesäten mDCs koinkubiert. Die zeitraffermikroskopischen Aufnahmen erfolgten wie zuvor erwähnt. Zur Bestimmung der T-Zell Geschwindigkeit wurde die zurückgelegte Strecke einzelner motiler Zellen pro Zeiteinheit ermittelt (Abbildung 29).

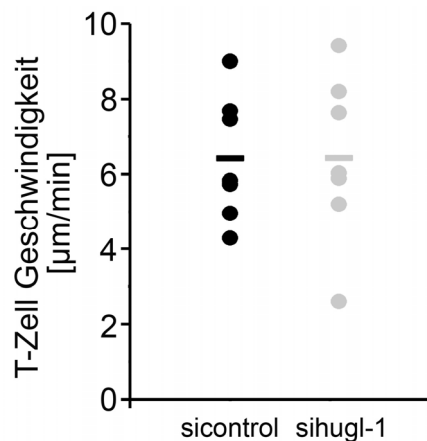


Abbildung 29. Migrationsgeschwindigkeit motiler CD4-positiver T-Zellen auf reifen DCs. Hugi-1-supprimierte T-Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle keinen Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit auf mDCs. CD4-positive T-Zellen wurden mit 1 µM Accell Hugi-1- oder Kontroll-siRNA für 72 Stunden transfiziert und im Anschluss mit reifen DCs für eine Stunde bei 37°C koinkubiert. Die Migrationsgeschwindigkeit zufällig ausgewählter, motiler T-Zellen wurde aus dem Quotienten von zurückgelegter Gesamtstrecke und der dafür benötigten Zeit ermittelt. Dargestellte Punkte korrespondieren mit einzelnen Zellen. Der Balken repräsentiert den Mittelwert der Daten.

Hugi-1-supprimierte Zellen wiesen mit einer mittleren T-Zell Geschwindigkeit von $6,4 \pm 2,24$ µm/min im Vergleich zur Kontrolle ($6,4 \pm 1,67$ µm/min) keinen Unterschied in der T-Zellgeschwindigkeit auf. Unter Berücksichtigung der zuvor erhaltenen Daten lassen die Ergebnisse vermuten, dass es sich bei den untersuchten Hugi-1-siRNA behandelten T-Zellen um unbeeinträchtigte und vollständig motile Zellen handelt, bei denen die Transfektion mit siRNA ineffizient verlief.

3.2 Generierung vektorbasierter siRNA-Expressionskonstrukte gegen Hvgl-1 und Hvgl-2

Frühere Studien haben gezeigt, dass Hvgl-1 in einer Vielzahl von Tumoren wie etwa in malignen Melanomen, Kolontumoren, Brust- oder Lungentumoren entweder vermindert vorliegt, oder nicht exprimiert wird (Kuphal *et al.*, 2006; Schimanski *et al.*, 2005; Grifoni *et al.*, 2004). Des Weiteren ist eine reduzierte Expression von Hvgl-1 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und zum Teil mit Lymphknotenmetastasen assoziiert (Tsuruga *et al.*, 2007). Ebenso konnte zuletzt eine Mindereexpression von Hvgl-2 in Adenokarzinomen, sowie in Kolon- und Brusttumoren nachgewiesen werden (Lisovsky *et al.*, 2009; Spaderna *et al.*, 2008). Diese Funde belegen, dass der Expressionsstatus von Hvgl-1 und Hvgl-2 eine wichtige Rolle für die Genese unterschiedlicher humaner Tumore spielt. Über die exakte Funktion beider Proteine in Tumoren und Epithelzellen ist bisher wenig bekannt (Lu *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene rekombinante Expressionskonstrukte kloniert, die in Epithelzellen durch siRNA-vermittelte Suppression von Hvgl-1 und Hvgl-2 einen Funktionsverlust und Tumorphänotypen hervorrufen und Rückschlüsse auf die Funktion der beiden Proteine ermöglichen.

3.2.1 Klonierung eines rekombinanten Vektorsystems zur Expression von Hvgl-1- und Hvgl-2-siRNA

Zunächst wurde ein vektorbasiertes pSuper RNAi-System kloniert (Brummelkamp *et al.*, 2002), das durch intrazelluläre Synthese von RNA-Transkripten mit Haarnadelstruktur (*short hairpin RNAs*, shRNAs) zu einer stabilen Suppression der *hvgl-1* oder *hvgl-2* Genexpression in der Zielzelle führt. Auf diese Weise entstehen über einen längeren Zeitraum Phänotypen mit einem Funktionsverlust, die im Anschluss einer funktionellen Analyse unterzogen werden können.

3.2.1.1 Erstellung eines Vektors zur stabilen Expression von Hvgl-1-siRNA

Um einen selektiven Angriff auf die Hvgl-1-kodierenden mRNA Transkripte zu ermöglichen, wurden vier mögliche Zielsequenzen einer Hvgl-1-spezifischen siRNA verwendet. Diese wurden zuvor für die Untersuchungen an T-Zellen ausgewählt und von der Firma Dharmacon

(Lafayette, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zielsequenzen bestehen jeweils aus 19 Nukleotiden (Abbildung 30).

Zielsequenzen <i>hugl-1</i> -mRNA	Bezeichnung
5'-CCACAGAGCCUUGAUGGAA-3'	Hugl-1, Sequenz d1
5'-GGGAGAUUGUCCACCAUAA-3'	Hugl-1, Sequenz d2
5'-GAACUUCGCAUCAUGGCCA-3'	Hugl-1, Sequenz d3
5'-GCAGCGUGCCAGACGACUA-3'	Hugl-1, Sequenz d4

Abbildung 30. Zielsequenzen der Hugl-1-spezifischen siRNAs. Gezeigt sind die Zielsequenzen von vier möglichen Hugl-1-spezifischen siRNAs. Die Bezeichnungen der siRNAs sind rechts daneben angegeben.

Für alle vier Zielsequenzen wurden pSuper-Konstrukte generiert, die für 19mer shRNAs kodieren. Diese Vorläufertranskripte werden in der Zelle durch ein Dicer Enzym zu funktionellen siRNAs prozessiert und in den RNAi-Mechanismus integriert.

3.2.1.1.1 Klonierung des pSuper-Hugl-1-Vektors

Die *forward* und *reverse* Stränge der Oligonukleotide, die die siRNA-exprimierende Sequenz enthalten, wurden mit *BglIII*- und *HindIII*-Enden synthetisiert und aneinander angelagert. Der pSuper-Vektor wurde daraufhin mit *BglIII* und *HindIII* einem Restriktionsverdau unterzogen (Abbildung 31 A), und das verdaute Produkt in einer Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt. Da die Schnittstellen ohne weitere Modifikationen miteinander ligiert werden können, wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide in den pSuper-Vektor einkloniert und das Ligationsprodukt in kompetente XL-1 *blue* Zellen transformiert. Die Kolonien wurden isoliert, kultiviert und mit diesen eine Minipräparation zur DNA-Isolation durchgeführt. Zur Identifikation positiver Klone wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *MluI* vorgenommen (Abbildung 31 B).

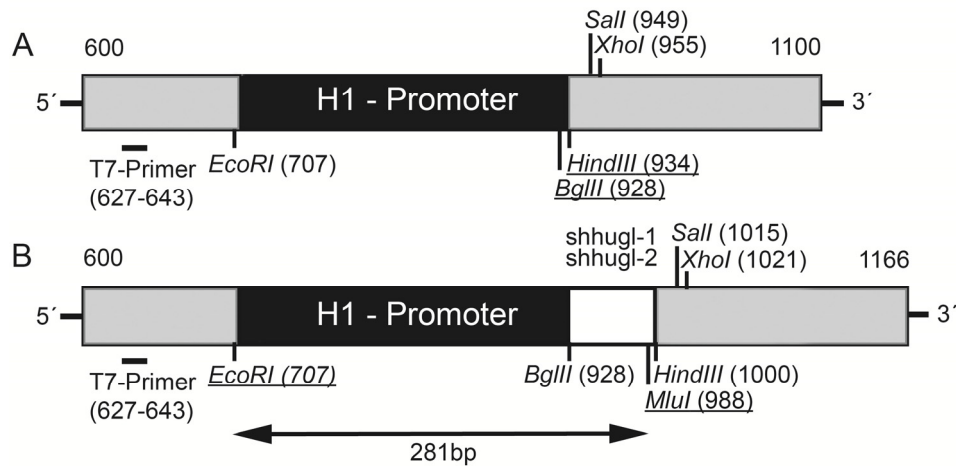


Abbildung 31. Überblick über die Klonierung der Hugl-1 shRNA in den pSuper-Vektor. (A) Schematische Darstellung der Klonierungsstelle im pSuper-Vektor. Nach einem Restriktionsverdau mit *HindIII* und *BglII* und anschließender Phenol/Chloroform-Aufreinigung wird das 66 bp umfassende Hugl-1 shRNA-Insert in den pSuper-Vektor einkloniert. (B) Um positive Klone identifizieren zu können, wird ein Kontrollverdau mit *EcoRI* und *MluI* durchgeführt. *MluI* stellt eine einzigartige Schnittstelle auf dem shHugl-1 Insert dar. Der Verdau resultiert in positiven Klonen mit einer Fragmentlänge von 281 bp. Zur Sequenzierung der positiven Klone wird ein T7-Primer verwendet, der an Position 627 bindet.

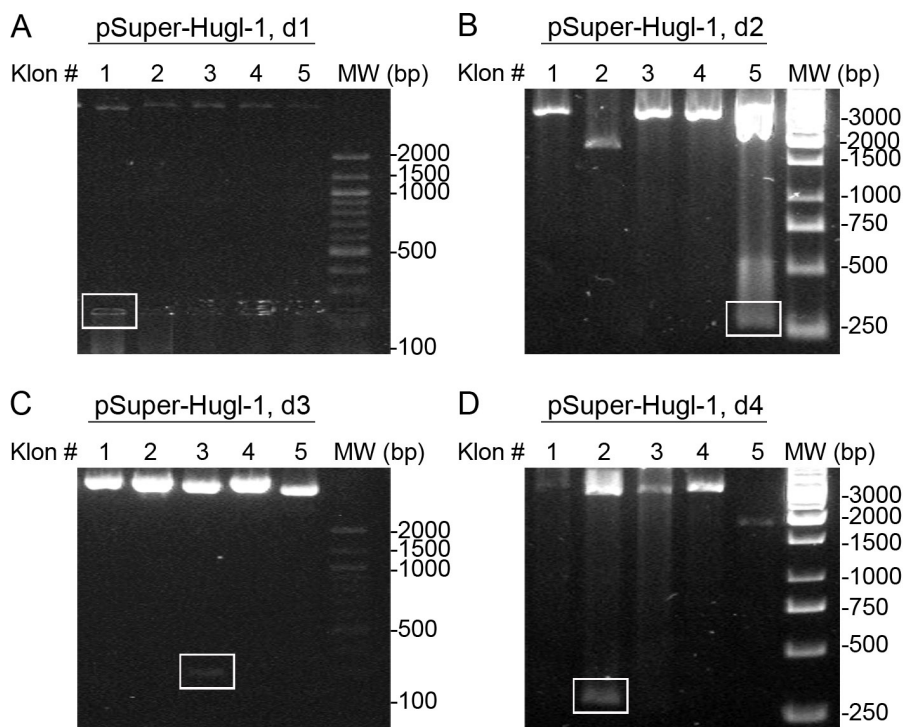


Abbildung 32. Identifizierung positiver pSuper-Hugl-1 Klone im Restriktionsverdau. Der pSuper-Vektor wurde mit *BglII* und *HindIII* verdaut und mit verschiedenen Hugl-1-shRNA Fragmenten ligiert, die für unterschiedliche Zielsequenzen in der *hugl-1*-mRNA kodieren (A-D; Duplices d1-4;). Die Ligationsprodukte wurden in XL-1 *blue* kompetente Zellen transformiert, kultiviert eine Minipräparation zur Isolierung der DNA aus isolierten Kolonien durchgeführt. Die isolierte DNA wurde durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *MluI* auf positive Klone untersucht. Positive Klone weisen eine Fragmentgröße von 281 bp auf. Als Referenz wurde ein 100 bp bzw. ein 1000 bp Größenstandard verwendet (MW).

EcoRI hydrolysiert den Vektor an Position 707, *MluI* verdaut hingegen an einer einzigartigen Schnittstelle auf dem einklonierten Insert. In positiven Klonen resultiert dies in einer Fragmentgröße von 281 bp (Abbildung 32). Die Analyse des Restriktionsverdaus zeigt ein Fragment von 281 bp für die pSuper-Hugl-1-Klone (#) folgender Zielsequenzen: #1 (Duplex d1); #5 (Duplex d2); #3 (Duplex d3) sowie #2 (Duplex d4). Die Banden weisen auf positive Klone hin, die den pSuper-Vektor mit dem einklonierten Insert enthalten. Diese Konstrukte wurden zur Verifizierung der Restriktionsverdaus einer Sequenzanalyse unterzogen.

3.2.1.1.2 Sequenzierung der pSuper-Hugl-1-Konstrukte

Neben einer Identifizierung positiver Klone im Restriktionsverdaus sollte im Folgenden die Gegenwart des korrekten Inserts im rekombinanten pSuper-Vektor durch eine Sequenzierung der Konstrukte bestätigt werden. Hierzu wurde ein T7-Primer verwendet, der 307 bp in 5'-Richtung oberhalb der Insertstelle bindet (siehe Abbildung 31). Die Sequenzierung wurde von der Firma Genterprise mit der Kettenabbruchsynthese nach Sanger durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind für die vier unterschiedlichen Inserts in Abbildung 33 dargestellt.

	Target sense Sequenz	Haarnadel- schleife	Target antisense Sequenz
A	CCACAGAGCCTTGATGGAA	TTCAAGAG	ATTCATCAAGGCTCTGTGG
	CCACAGAGCCTTGATGGAA	TTCAAGAG	ATTCATCAAGGCTCTGTGG
B	GGGAGATTGTCCACCATAATT	CAAGAG	ATATGGTGGAACAATCTCCC
	GGGAGATTGTTCACCATAATT	CAAGAG	ATATGGTGGAACAATCTCCC
C	GAACTTCGCATCATGGCC	ATTCAAGAG	ATGGCCATGATGC GAAGTTC
	GAACTTCGCATCATGGCC	ATTCAAGAG	ATGGCCATGATGC GAAGTTC
D	GCAGCGTGCCAGACGACT	ATTCAAGAG	ATAGTCGTCCTG GCACGCTG
	GCAGCGTGCCAGACGACT	ATTCAAGAG	ATAGTCGTCCTG GCACGCTG

Abbildung 33. Sequenzen der pSuper-Hugl-1 Konstrukte mit unterschiedlichen Inserts. (A) pSuper-Hugl-1, d1. (B) pSuper-Hugl-1, d2. (C) pSuper-Hugl-1, d3. (D) pSuper-Hugl-1, d4. Erwartete Sequenzen für die Duplices 1-4 (obere Reihe) sind den in der Sequenzierung tatsächlich enthaltenen Daten gegenüber gestellt (untere Reihe). Für die Sequenzierung wurde ein T7-Primer verwendet, der 307 bp in 5'-Richtung oberhalb der Insertionsstelle bindet. Die gezeigten Sequenzen umfassen den Kernbereich des Inserts ohne Restriktionsstellen oder Terminatorsequenzen.

Die pSuper-Hugl-1 Konstrukte mit den Duplices d1 und d2 zeigen eine Sequenz-Übereinstimmung mit den entsprechenden Zielsequenzen (Abbildung 33 A, B), während die Konstrukte mit den Duplices d3 und d4 eine Deletion einer Base innerhalb der Haarnadelschleife des shRNA-Konstruktes aufweisen (Abbildung 33 C, D).

Die Daten bestätigen daher die richtige Sequenz der in den pSuper-Vektor klonierten Fragmente. Für die weitere Analyse der Aktivität der Klone in der Zellkultur werden alle vier Konstrukte verwendet. Die Verringerung der Basenzahl in der Haarnadelschleife der Klone 3 und 4 durch eine Basendeletion hat möglicherweise keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Konstruktes (Brummelkamp *et al.*, 2002).

3.2.1.1.3 Aktivität des Konstruktes in HEK293 Zellen

Um zu überprüfen, ob die in den pSuper-Vektor klonierten shHugl-1-Duplices (pSuper-Hugl-1) die Hugl-1 Expression in Zellen siRNA-vermittelt hemmen, wurden HEK293 Zellen mit diesen Konstrukten transient transfiziert. pSuper-, pSuper-Hugl-1 d1, -d2, -d3 oder -d4, sowie alle vier pSuper-Hugl-1 Konstrukte zusammen (d1-4) wurden zu diesem Zweck mit einer Gesamtmenge von 1 µg in die Zellen transfiziert und nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden geerntet. Die Zellen wurden lysiert und einer Westernblot Analyse mit Hugl-1- und β-Aktin-spezifischen Antikörpern unterzogen. Die Banden wurden mit dem Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem dargestellt.

Die Ergebnisse der Westernblot Analyse belegen, dass die Expression von Hugl-1 durch die pSuper-Hugl-1 Konstrukte d1-4 zu 30-50% gehemmt wird (Abbildung 34). Zusammenfassend geben diese Analysen deutlichen Hinweis darauf, dass die Konstrukte Hugl-1-kodierende Transkripte angreifen.

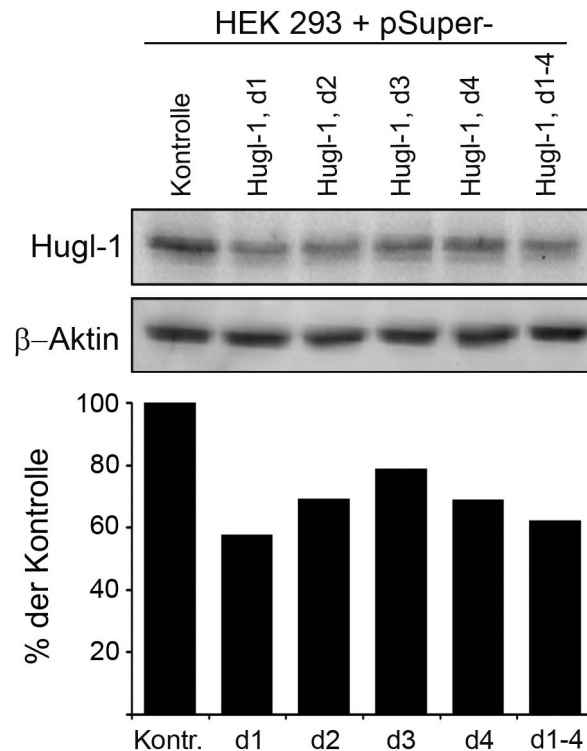


Abbildung 34. Reduktion der Hugl-1 Expression in pSuper-Hugl-1 transfizierten HEK293 Epithelzellen. Die von pSuper-Hugl-1 kodierte 19mer shRNAs, d1-4, führen zur Hemmung der Hugl-1 Expression auf Translationsebene. HEK293 Zellen wurden mit einer jeweiligen Gesamtmenge von 1 µg pSuper, pSuper-Hugl-1 Duplex 1, 2, 3 oder 4 bzw. mit allen vier Konstrukten in Kombination transient transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss geerntet, lysiert und eine Westernblot Analyse mit Hugl-1- und β -Aktin-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zur Visualisierung der Banden wurde das Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem verwendet. Das Balkendiagramm stellt eine Quantifizierung der Hugl-1 Expression dar. Hierzu wurde der Quotient aus Hugl-1 und β -Aktin gebildet und die Kontrolle auf 100% gesetzt.

3.2.1.2 Erstellung eines Vektors zur stabilen Expression von Hugl-2-siRNA

Im Menschen kommen vier Hugl-Homologe vor. Von diesen stellen Hugl-1 (Lgl-1) und Hugl-2 (Lgl-2) die in der Literatur am umfassendsten beschriebenen Hauptformen dar. Beide nehmen eine wichtige Rolle für den Erhalt der epithelialen Zellpolarität und Integrität ein (Kuphal *et al.*, 2006) und üben zudem eine Tumorsuppressorfunktion aus. Während es für Hugl-1 in den letzten Jahren verstärkt Hinweise auf eine Assoziation mit einer gestörten Zellpolarität und einem Einfluss auf die Malignität und Progression unterschiedlicher Tumorarten gegeben hatte, ist bisher wenig darüber bekannt, welche Rolle Hugl-2 in menschlichen Tumorerkrankungen spielt. In der Literatur wurde ebenfalls noch nicht untersucht, inwiefern ein gleichzeitiger Verlust von Hugl-1 und Hugl-2 die Malignität und metastatisches Potenzial von Tumorzellen im Vergleich zum Verlust nur eines der beiden Homologen beeinflusst. Es wurde daher ein Vektor kloniert, der, in Zellen transfiziert, zu einer stabilen, siRNA-

vermittelten Hemmung der Hugl-2 Expression führt. Durch Transfektion beider Expressionskonstrukte kann somit die gleichzeitige Suppression der Homologe Hugl-1 und Hugl-2 in der Zielzelle erreicht werden.

Es wurden vier Sequenzen einer Hugl-2-spezifischen siRNA verwendet, die jeweils 19 Nukleotide umfassen (Abbildung 35). Diese Zielsequenzen wurden von der Firma Dharmacon (Lafayette, USA) zur Verfügung gestellt.

Zielsequenzen <i>hugl-2</i> -mRNA	Bezeichnung
5'-GCAAAGCGAUUACCAGAAU-3'	Hugl-2, Sequenz d1
5'-CGAGAGUGGCAACGUGUUU-3'	Hugl-2, Sequenz d2
5'-GAUGAGAGCUUCACACUGC-3'	Hugl-2, Sequenz d3
5'-CGGGACCUUGUCCAGUUUA-3'	Hugl-2, Sequenz d4

Abbildung 35. Zielsequenzen Hugl-2-spezifischer siRNAs. Gezeigt sind die Zielsequenzen von vier möglichen siRNAs. Diese binden an die *hugl-2*-mRNA und führen zu einer Hemmung der Hugl-2 Expression auf Translationsebene.

Für jede der einzelnen Sequenzen wurde ein pSuper-Konstrukt kloniert. Dieses kodiert für eine shRNA, die nach Prozessierung in den *RNA-Induced Silencing Complex*-(RISC)-Komplex aufgenommen wird und durch Hybridisierung mit der *hugl-2*-mRNA zu einer Hemmung der Hugl-2 Expression auf Translationsebene führt.

3.2.1.2.1 Klonierung des pSuper-Hugl-2-Vektors

Der pSuper-Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen *BglIII* und *HindIII* verdaut und mit einer Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt. Die doppelsträngigen shRNA Inserts wurden innerhalb der beiden Schnittstellen in den Vektor ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in XL1 *blue* kompetente Zellen transformiert und eine Minipräparation zur DNA-Isolation aus kultivierten Kolonien durchgeführt. Positive Klone wurden durch einen Restriktionsverdau der isolierten DNA mit *EcoRI* und *MluI* anhand einer Fragmentgröße von 281 bp identifiziert (vergleiche Abbildung 31). Die verdauten Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert, wie in Abbildung 36 A-D dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass folgende Klone das gewünschte Fragment enthalten:

#4 (Duplex d1), #5 (Duplex d2), #3 (Duplex d3) und #2 (Duplex d4). Die entsprechenden Klone wurden im Anschluss in einer Sequenzanalyse bestätigt.

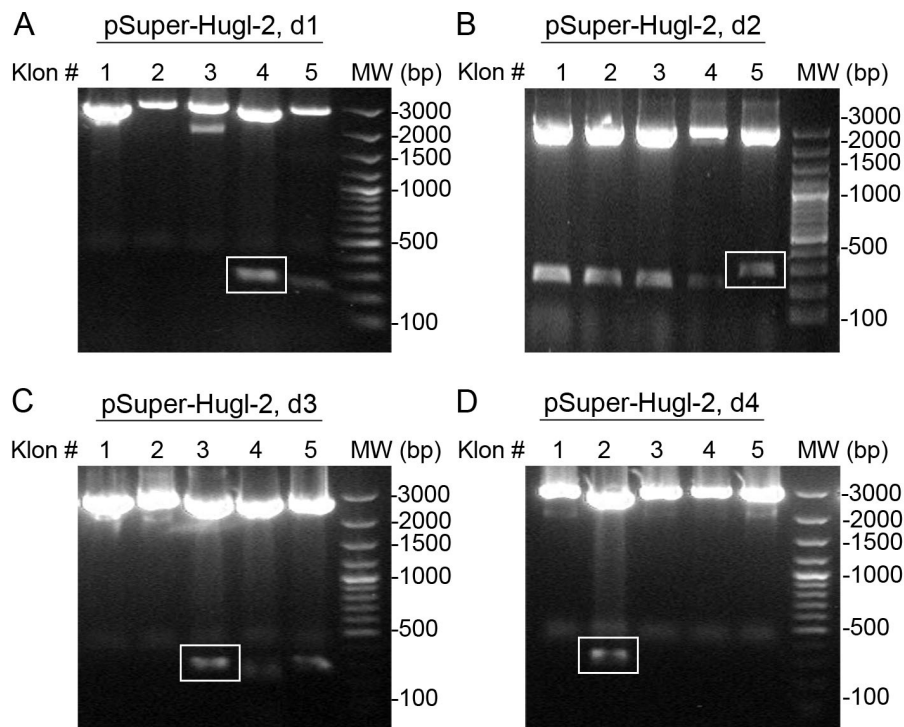


Abbildung 36. Identifizierung positiver pSuper-Hugl-2-Konstrukte im Restriktionsverdau. Der pSuper-Vektor wurde mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut und die unterschiedlichen Hugl-2-spezifischen shRNA-Fragmente innerhalb dieser Schnittstellen inkloniert. Die DNA-Proben kultivierter Klone aus der Minipräparation wurden im Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *MluI* analysiert ((A-D); pSuper-Hugl-2, d1-4). Fragmentgrößen von 281 bp weisen auf einen positiven Klon hin. Als Referenz wurde ein 100 bp bzw. ein 1000 bp Größenstandard verwendet (MW).

3.2.1.2.2 Sequenzierung der pSuper-Hugl-2-Konstrukte

Die im Restriktionsverdau identifizierten positiven Klone des pSuper-Hugl-2 Konstruktes wurden in einem weiteren Schritt sequenziert und die korrekte Basenfolge im klonierten Insert überprüft. Die Sequenzierung wurde von der Firma Genterprise mit der Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abbildung 37 dargestellt.

	Target sense Sequenz	Haarnadel- schleife	Target antisense Sequenz
A	CCACAGAGCCTTGATGGAA	TTCAAGAG	ATTCCATCAAGGCTCTGTGG
	CCACAGAGCCTTGATGGAA	TTCAAGAG	ATTCCATCAAGGCTCTGTGG
B	GGGAGATTGTCCACCATA	TTCAAGAG	ATTATGGTGACATCTCCC
	GGGAGATTGTTCACCATA	TTCAAGAG	ATTATGGTGACATCTCCC
C	GAACTTCGCATCATGGCC	TTCAAGAG	ATGGCCATGATGC GAAGTTC
	GAACTTCGCATCATGGCC	TTCAAGAG	ATGGCCATGATGC GAAGTTC
D	GCAGCGTGCCAGACGACT	TTCAAGAG	ATAGTCGTCTG GCACGCTG
	GCAGCGTGCCAGACGACT	TTCAAGAG	ATAGTCGTCTG GCACGCTG

Abbildung 37. Sequenzen der pSuper-Hugl-2-Konstrukte mit unterschiedlichen Inserts (A-D). (A) pSuper-Hugl-2, d1. (B) pSuper-Hugl-2, d2. (C) pSuper-Hugl-2, d3. (D) pSuper-Hugl-2, d4. Für die Sequenzierung der Konstrukte pSuper-Hugl-2 d1 und d4 in 5'-3'-Richtung wurde ein T7-Primer und für die Duplices d2 und d3 ein T3-Primer verwendet. Dargestellt sind die erwarteten Sequenzen für die Duplices 1-4 (A-D; obere Reihe) in Gegenüberstellung mit den aus der Sequenzierung tatsächlich erhaltenen Daten (untere Reihe). Die gezeigten Sequenzen umfassen den Kernbereich des Inserts ohne Restriktionsstellen oder Terminatorsequenzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Sequenzen der pSuper-Hugl-2-Konstrukte der Duplices d1 und d3 vollständig mit den Zielsequenzen übereinstimmen (Abbildung 37 A, C). Duplices d2 und d4 weisen jeweils eine Punktmutation in der Target *sense* Sequenz auf (Abbildung 37 B, D). Die Aktivität der Konstrukte wurde nachfolgend *in vitro* untersucht.

3.2.1.2.3 Aktivität des Konstruktes in HEK293 Zellen

Um die Hugl-2 shRNA kodierenden pSuper-Konstrukte auf ihre Hugl-2-regulatorischen Eigenschaften hin zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen transient mit einer Gesamtmenge von 1 µg pro Ansatz pSuper-Leervektor, Konstrukt alleine, oder allen vier Konstrukten zusammen transfiziert. Nach einer Inkubationzeit von 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, lysiert und im Westernblot mit Hugl-2- und β-Aktin-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Banden wurden mit dem Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem dargestellt.

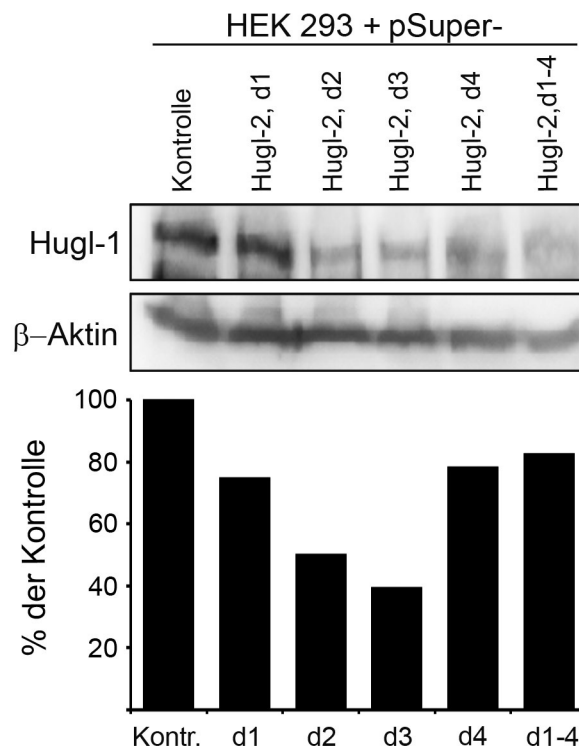


Abbildung 38. Hemmung der Hugl-2 Expression in HEK293 Epithelzellen durch pSuper-Hugl-2 Konstrukte. Die 19mer shRNAs der pSuper-Hugl-2 Konstrukte hemmen die Hugl-2 Expression in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit jeweils 1 µg pSuper (Leervektor-Kontrolle), pSuper-Hugl-2 Duplices 1, 2, 3 oder 4 bzw. mit allen vier Konstrukten zusammen transient transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und im Westernblot mit Hugl-2- und β-Aktin-spezifischen Antikörpern analysiert. Die Darstellung der Banden erfolgte mit dem Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem. Für die Quantifizierung des Westernblot wurde der Quotient aus Hugl-1 und β-Aktin-Bande gebildet. Der Quotient für die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die relative Expression der anderen Proben berechnet.

Wie aus Abbildung 38 hervorgeht, führen die einzelnen siRNA kodierenden pSuper-Hugl-2 Konstrukte d1-4 zu einer Reduktion des Hugl-2 Proteins in HEK293 Epithelzellen um 20-50%. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Hemmung der Hugl-2 Proteinexpression siRNA-vermittelt durch Inhibierung der *hugl-2*-Transkripte hervorgerufen wird.

3.3 Einfluss der Tumorsuppressoren Hugi-1 und Hugi-2 auf Modulation und Erhalt der Zellpolarität in HEK293 Epithelzellen

Nachfolgend wurde untersucht, welche funktionelle Relevanz die Tumorsuppressoren und Polaritätsproteine Hugi-1 und Hugi-2 für das Wachstumsverhalten und die Zellpolarität von adhären wachsenden Epithelzellen haben. Hierzu wurden zuvor generierte siRNA-Expressionskonstrukte in HEK293 Epithelzellen transfiziert und stabile Hugi-1- und/oder Hugi-2-depletierte Zelllinien etabliert. Weiterhin wurde analysiert, ob Hugi-1 und Hugi-2 überlappende zelluläre Funktionen ausüben und welche Bedeutung ein gleichzeitiger Funktionsverlust der Homologe für die Zelle hat. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten T-Lymphozyten bilden die adhären wachsenden Epithelzellen einen geschlossenen Verband, in welchem Zell-Zell Interaktionen im dreidimensionalen Raum untersucht werden können. Im Anschluss an die Etablierung stabiler Hugi-1- und/oder Hugi-2- supprimierter Zelllinien wurden daher Versuche durchgeführt, die *in vitro* das 2D- und 3D-Wachstumsverhalten sowie *in vivo* das Metastasierungsverhalten dieser Zellen im Maus Xenograft Modell untersuchen. Des Weiteren wurde in durchflusszytometrischen Messungen und Reporterger Assays analysiert, welchen Einfluss die Tumorsuppressor- und Polaritätsproteine Hugi-1 und Hugi-2 auf den Zellzyklus ausüben und auf welche Weise diese das Migrations- und Proliferationsverhalten, sowie das Ansprechen der Zellen auf Zytostatika beeinflussen.

3.3.1 Etablierung stabiler, Hugi-defizienter Zelllinien HEK293-pSuper-Hugi-1 und HEK293-pSuper-Hugi-2

Für zukünftige funktionelle Analysen wurden stabile Zelllinien etabliert, welche die Expression von Hugi-1 und/oder Hugi-2 RNAi-vermittelt supprimieren. Zuvor konnte nachgewiesen werden, dass HEK293 Epithelzellen im Gegensatz zu T-Lymphozyten beide Hugi-Homologe, Hugi-1 und Hugi-2, exprimieren (Abbildung 34, Abbildung 38). Die Zelllinien HEK293-pSuper-Hugi-1 und HEK293-pSuper-Hugi-2 wurden etabliert, indem HEK293 Zellen mit den zuvor generierten Konstrukten pSuper-Hugi-1 oder pSuper-Hugi-2 und einem pEF4-myc-His-V5 Resistenzplasmid kotransfiziert und in Medium mit 200 µg/ml Zeocin selektioniert wurden. Für die Generierung einer Kontrollzelllinie wurden HEK293 Zellen hingegen mit dem pSuper-Leervektor und pEF4-myc-His-V5 Resistenzplasmid kotransfiziert. Einzelne Zellkolonien wurden nach vierwöchiger Selektion isoliert, expandiert und die Hugi-1 oder Hugi-2 Expression im Westernblot unter Verwendung von anti Hugi-1 oder anti

Hugl-2 Antikörpern analysiert. Für jede Zelllinie wurden 30-40 Klone analysiert. Die in Abbildung 39 A dargestellten Ergebnisse belegen eine starke Suppression der Hugl-1 Expression in den Klonen #33 und #42 (84,9%; 89,1%). Die Expression von Hugl-2 im Klon #7 (42,5%) war ebenfalls deutlich vermindert (Abbildung 39 B). Zur Verwendung in funktionellen Analysen wurden diese Klone expandiert und weiter analysiert.

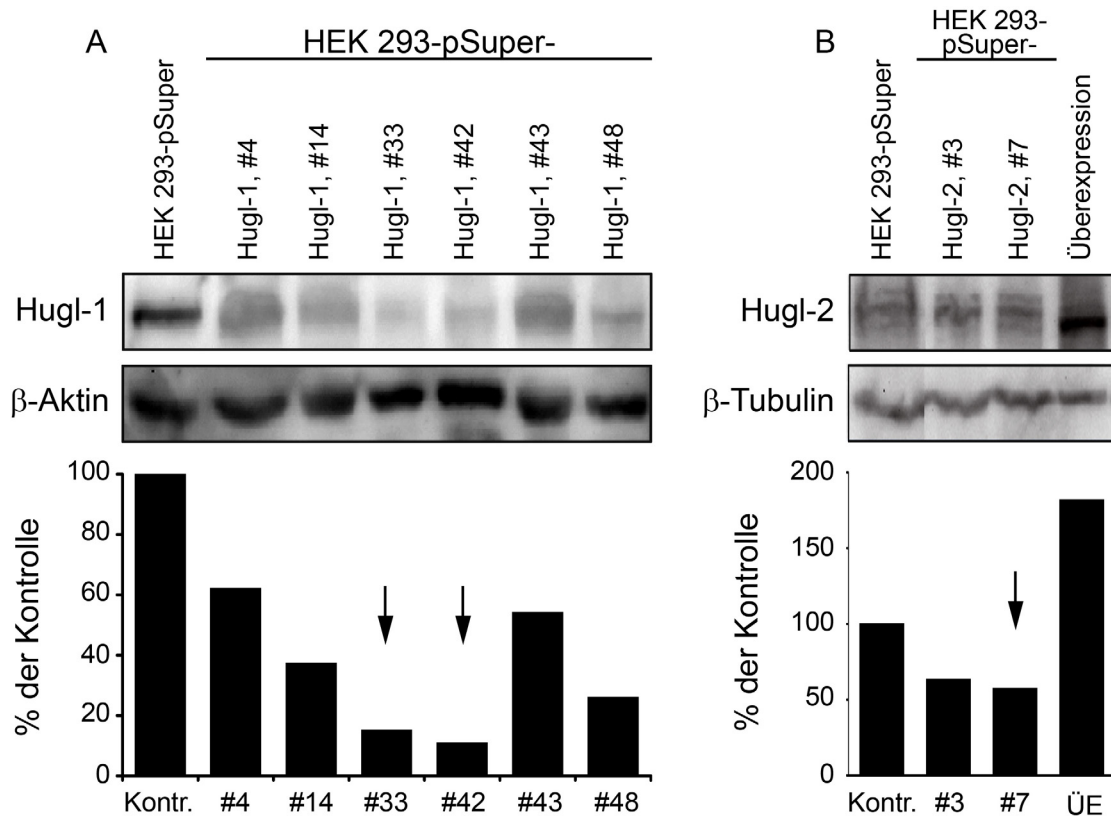


Abbildung 39. Screening von HEK293-pSuper-Hugl-1 und HEK293-pSuper-Hugl-2 Klonen. (A) Screening von stabil transfizierten HEK293-pSuper-Hugl-1 Zellen auf Klone mit supprimierter Hugl-1 Expression. (B) Analyse von stabil transfizierten HEK293-pSuper-Hugl-2 Zellen auf Klone mit supprimierter Hugl-2 Expression. HEK293 Zellen wurden zur Etablierung stabiler Zelllinien mit den Konstrukten pSuper-Hugl-1 oder pSuper-Hugl-2 sowie dem Selektionsplasmid pEF4-myc-His-V5 kotransfiziert und für vier Wochen in Medium mit 200 µg/ml Zeocin selektiert. Resistente Kolonien wurden isoliert, expandiert und die Expression von Hugl-1 oder Hugl-2 im Westernblot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert. Klone, die die Expression von Hugl effizient inhibierten wurden für funktionelle Analysen expandiert und weiter untersucht. Die relative Dichte der Westernblotbanden wurde mit der Software Quantity One ermittelt. Der Quotient aus Bande : Bande Aktin wurde gebildet und der Quotient der Kontrolle als Referenz auf 100% gesetzt. ÜE: Überexpression.

3.3.2 Etablierung stabiler HEK293-pSuper-Hugl-1+2 Zelllinien

Für die Etablierung stabiler HEK293 Zelllinien, die gleichzeitig Hugl-1 und Hugl-2 siRNA-vermittelt inhibieren, wurde die Zelllinie HEK293-pSuper-Hugl-1, #42 verwendet, welche bereits eine gute Suppression von Hugl-1 aufwies (Abbildung 39 A). Diese mit Zeocin selektionierte Zelllinie wurde mit dem Konstrukt pSuper-Hugl-2 und einem Blastocidinresistenz kodierenden pUB6-Selektionsplasmid kotransfiziert und anschließend für vier Wochen in Medium mit 200 µg/ml Zeocin und 10 µg/ml Blastocidin selektiert. Für jede Zelllinie wurden 30-40 Zellkolonien isoliert, expandiert und die Expression von Hugl-1 und Hugl-2 mit spezifischen Antikörpern im Westernblot analysiert.

Die Ergebnisse in Abbildung 40 A zeigen, dass die Klone #13 (Hugl-1: 41%; Hugl-2: 63%) und #19 (Hugl-1: 42%; Hugl-2: 23%) eine starke gleichzeitige Suppression der Hugl-1 und Hugl-2 Expression aufweisen. Diese Klone wurden expandiert und die Expression von *hugl-1* und *hugl-2* zur Bestätigung der Ergebnisse zusätzlich auf Transkriptebene untersucht. Hierzu wurden Zellen der Klone HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#13) und (#19) geerntet und durch Zentrifugation pelletiert. Die Gesamtzell-RNA wurde mit dem Absolutely RNA Mini Kit isoliert und eine quantitative RT-PCR mit Hugl-1- oder Hugl-2-spezifischen Primern bei 58°C und 40 Zyklen durchgeführt. Die Expression der RNA Polymerase II (RPII) wurde mit RPII-spezifischen Primern analysiert und diente als interne Kontrolle zur Normalisierung der Ergebnisse.

Die in Abbildung 40 B dargestellten Daten sind konsistent mit den in Klonen #13 und #19 detektierten schwachen Hugl-1 und Hugl-2 Proteinspiegeln. Für die Zelllinien HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#13) und (#19) wurde, verglichen mit Expressionsspiegeln in Kontrollzellen, eine 7,0- und 8,9-fache Reduktion der *hugl-1*-mRNA beobachtet. Die Bildung von *hugl-2*-mRNA wurde dagegen um das 3,0- und 2,7-fache vermindert. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus Westernblot und quantitativer RT-PCR übereinstimmend eine signifikant verminderte Hugl-1 und Hugl-2 Expression in den HEK293-pSuper-Hugl-1+2 Klonen (#13) und (#19).

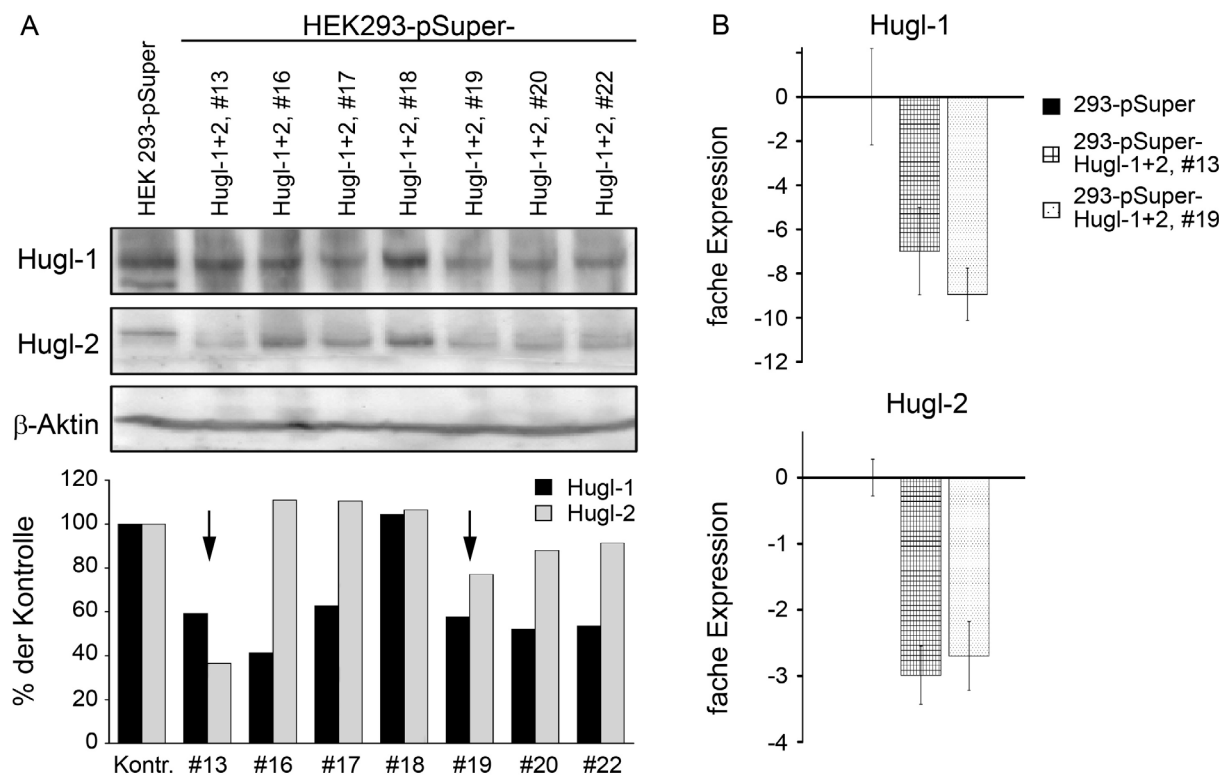


Abbildung 40. Screening der HEK293 pSuper-Hugl-1+2 Zelllinien. Die Daten aus Westernblot und qRT-PCR bestätigen übereinstimmend eine signifikant reduzierte Hugl-1 und Hugl-2 Expression in HEK293-pSuper-Hugl-1+2 Klonen (#13) und (#19). (A) Westernblot Analyse. HEK293-pSuper-Hugl-1 Zellen (#42; siehe Abbildung 39 A) wurden zur Etablierung einer Zelllinie mit gleichzeitiger Hugl-1 und Hugl-2 Suppression mit dem Expressionskonstrukt pSuper-Hugl-2 und einem pUB6-Selektionsplasmid kotransfiziert und für 4 Wochen in der Gegenwart von 200 µg/ml Zeocin und 10 µg/ml Blasticidin selektiert. Resistente Kolonien wurden isoliert und die Expression von Hugl-1 und Hugl-2 im Westernblot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Banden wurden mit dem Nitro-Block-II CDP-Star Detektionssystem visualisiert. (B) qRT-PCR. HEK293-pSuper Zellen sowie Zellen der Klone HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#13) und (#19) wurden geerntet und die Gesamt-Zell RNA isoliert. Zur Bestimmung der relativen Expression von *hugl-1* und *hugl-2* Transkripten wurde eine quantitative RT-PCR mit spezifischen Primern für Hugl-1, Hugl-2 und RPII durchgeführt.

3.3.3 Funktionelle Studien zur Analyse der Funktion von Hugl-1 und Hugl-2

3.3.3.1 Phänotypische Analyse Hugl-1- und Hugl-2-supprimierter HEK293 Zellen

Um die Auswirkungen einer Langzeitinhibition der Hugl-1 und/oder Hugl-2 Expression auf HEK293 Zellen zu untersuchen, wurden Lichtbildaufnahmen von einzelnen Zellkolonien vorgenommen und die Zellmorphologie und Zell-Zell Interaktionen analysiert. Hierzu wurden für die jeweilige Zelllinie 5×10^3 Zellen ausgesät und unter Selektion für eine Woche bei 37°C inkubiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte lichtmikroskopisch. Wie aus Abbildung 41 hervorgeht, verursachte der Verlust von Hugl-1 im Vergleich zur Kontrolle eine Störung der

Kopfsteinpflaster-Morphologie von HEK293 Zellen in der 2D Kultur. Zudem wiesen die Zellen eine verstärkte Streuung von der Hauptkolonie auf sowie einen aufgelockerten und destabilisierten Zellverband. Die zusätzliche selektive Hemmung der Hugi-2 Expression verstärkte die beobachteten zellulären Veränderungen deutlich. Darüber hinaus konnte die Dissemination größerer Zellsatelliten von den Hauptkolonien beobachtet werden.

Die Ergebnisse legen daher nahe, dass eine reduzierte Hugi-1 und/oder Hugi-2 Expression in HEK293 Zellen durch Destabilisierung epithelialer Strukturen und Störung der apiko-basalen Zellpolarität zu einer Abnahme der Zell-Zell Kontakte führt und eine damit verbundene Zunahme des migratorischen Potenzials der Zellen hervorruft. Der Effekt wird durch die zeitgleiche Hemmung beider Hugi-Homologe deutlich verstärkt.

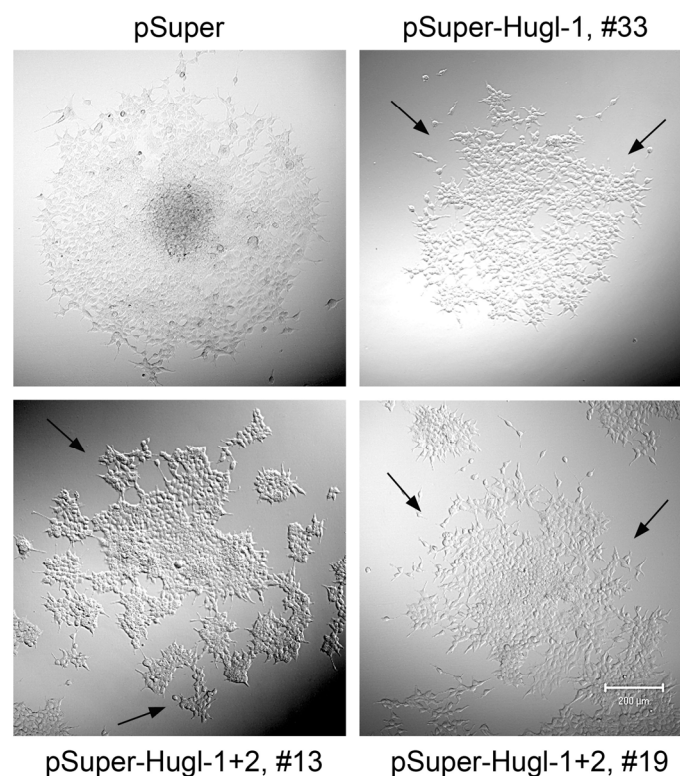


Abbildung 41. Lichtmikroskopische Differentialkontrast-Aufnahmen Hugi-depletierter HEK293 Zellen. Die RNAi-vermittelte Hemmung der Hugi-1 Expression resultiert in einer Destabilisierung der epithelialen Strukturen sowie in einer Störung der apiko-basalen Zellpolarität und führt zur Abnahme der Zell-Zell Kontakte mit einer damit verbundenen Zunahme des migratorischen Potenzials. Die zeitgleiche Depletion beider Homologe führt zu deutlich verstärkten Effekten. Es wurden jeweils 5×10^3 Zellen verschiedener Hugi-supprimierter Zelllinien ausgesät und für eine Woche bei 37°C inkubiert. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laserscannmikroskop durchgeführt. Die Pfeile deuten beispielhaft auf Zellen oder Zellverbände, die von der Hauptkolonie disseminiert sind. Der dargestellte Balken entspricht einer Länge von 200 μm.

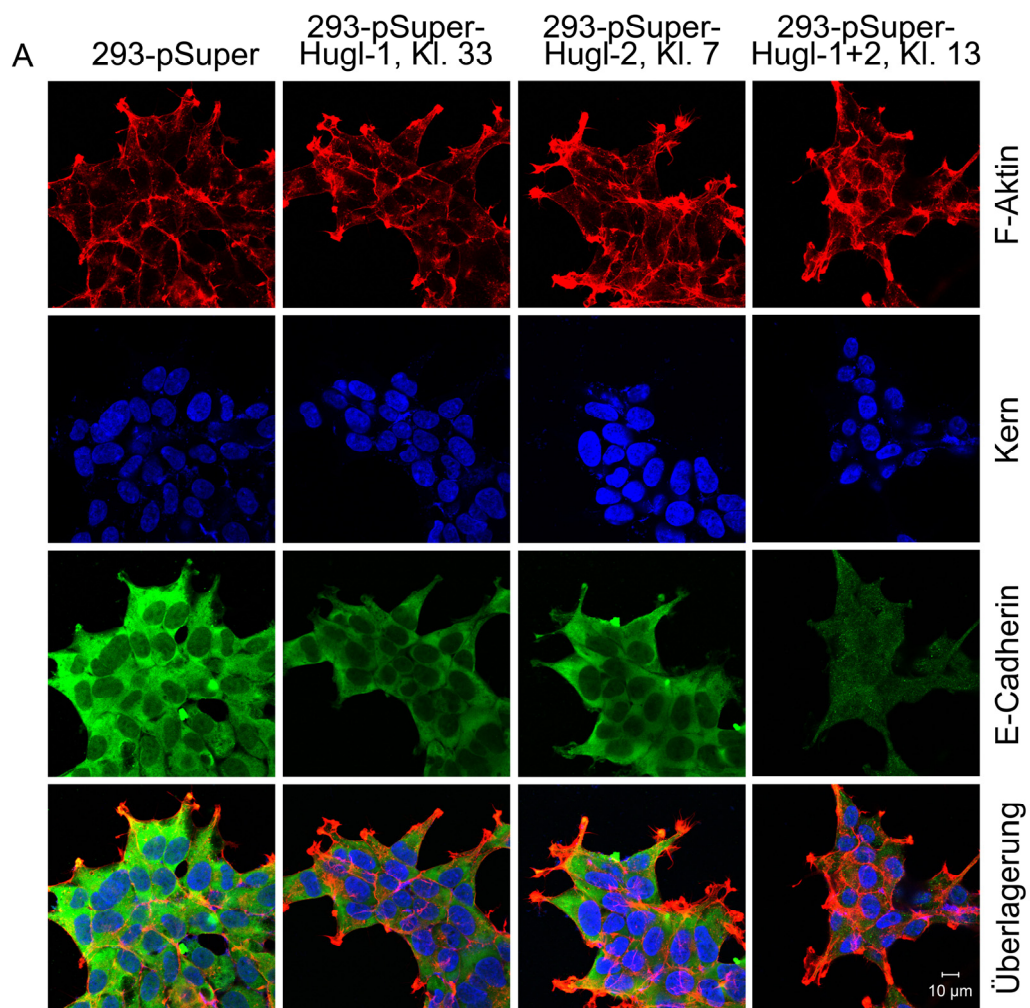
3.3.3.2 Effekt von Hugn-1 und Hugn-2 auf die Expression von E-Cadherin

Die Biogenese von Zell-Zell Kontakten, die durch epitheliales Cadherin (E-Cadherin) vermittelt werden, ist eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung von zusammenhängenden, epithelialen Geweben (Dow und Humbert, 2007). Der Verlust des Adhäsionsproteins E-Cadherin ist mit der Induktion eines epithelial-mesenchymalen Übergangs (*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT) assoziiert, bei welchem Zellen eine migratorische, mesenchymale Form annehmen. Dieser Prozess geht mit einer Tumordedifferenzierung, Infiltration und Metastasierung einher und wird häufig in invasiven Tumorarten epithelialen Ursprungs beobachtet (Cavallaro und Christofori, 2004; Cowin *et al.*, 2005). Da gezeigt werden konnte, dass der Verlust der Homologe Hugn-1 und Hugn-2 zu einer Destabilisierung des epithelialen Zellverbandes und einer damit verbundenen Zunahme des migratorischen Potenzials führte, wurde nachfolgend die Rolle von E-Cadherin in diesem Prozess untersucht.

Zellen der Zelllinien HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hugn-1 (#33), HEK293-pSuper-Hugn-2 (#7) sowie HEK293-pSuper-Hugn-1+2 (#13) wurden in einem 8er Kammerdeckgläschen ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit 4% PFA Lösung fixiert und mit Hugn-1-, Hugn-2- und E-Cadherin-spezifischen Antikörpern angefärbt. Der Zellkern wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33342 und F-Aktin mit Alexa-Fluor-546-gekoppeltem Phalloidin visualisiert. Die in Abbildung 42 A dargestellten Daten zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen eine inhibierte E-Cadherin Expression in stabil transfizierten Hugn-1- und/oder Hugn-2-supprimierten HEK293 Klonen. Die gleichzeitige Reduktion der Homologe führte, im Gegensatz zu Klonen, bei welchen nur einer der beiden Proteine supprimiert war, zu einer deutlich stärker verringerten E-Cadherin Expression. Die Tumorsuppressorproteine Hugn-1 und Hugn-2 wiesen in diesen Klonen eine kortikale und zytoplasmatische Lokalisation auf (Abbildung 42 B) und waren im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich vermindert exprimiert. Zusätzlich zeigten die Immunfluoreszenzfärbungen, dass die schwache Färbung von Hugn-1 und Hugn-2 mit einer verminderten E-Cadherin Färbung korrelierte (Abbildung 42 B). In pSuper Leervektor-transfizierten Kontrollzellen konnte dagegen eine starke Expression aller drei Proteine beobachtet werden.

Ergebnisse

Diese Ergebnisse demonstrieren daher, dass die RNAi-vermittelte Depletion von Hugl-1 oder Hugl-2 zur Suppression der E-Cadherin Expression in HEK293 Zellen führt und dass dieser Effekt bei vollständigem und gleichzeitigem Verlust der Homologe nochmals verstärkt ist. Der Befund steht im Einklang mit den im vorigen Versuch gemachten Beobachtungen, wonach Hugl-depletierte Zellen und insbesondere Zellen mit gleichzeitiger Suppression beider Homologe geschwächte Zell-Zell Kontakte und ein erhöhtes migratorisches Potenzial aufweisen.



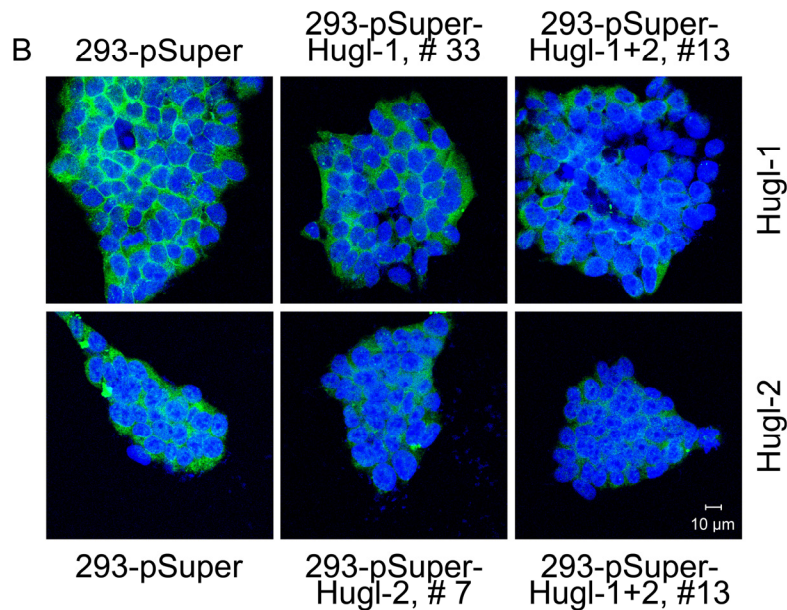


Abbildung 42. Immunfluoreszenzanalyse der E-Cadherin Expression in Hugl-1- und/oder Hugl-2-depletierten HEK293 Zellen. Die Suppression der Hugl-1- und/oder Hugl-2 Expression führt gleichzeitig zur verminderten Expression des Zell-Zell Adäsionsproteins E-Cadherin. (A) E-Cadherin Expression in verschiedenen HEK293-pSuper-Klonen. (B) Hugl-1 oder Hugl-2 Expression in HEK293-pSuper-Klonen. Hugl-1- und/oder Hugl-2-supprimierte HEK293 Epithelzellen wurden in Kammerdeckgläschen ausgesät und nach Inkubation für 24 Stunden mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hugl-1-, Hugl-2- oder E-Cadherin-spezifischen Antikörpern inkubiert und mit Alexa-Fluor-488-markierten Sekundärantikörpern visualisiert. Als Kontrolle dienten Leervektor-transfizierte HEK293-pSuper Zellen. Die Färbung von F-Aktin erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (rot). Der Nukleus wurde mit dem DNA-spezifischen Farbstoff Hoechst 33342 sichtbar gemacht (blau). Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit gleichen Geräteeinstellungen vorgenommen. Der Balken entspricht einer Länge von 10 µm.

3.3.3.3 Einfluss von Hugl-1 und Hugl-2 auf das 2D-Koloniebildungsverhalten (Colony Formation Assay)

Um das Wachstums- und Koloniebildungsverhalten Hugl-1- und/oder Hugl-2-supprimierter HEK293 Zellen zu analysieren, wurden zweidimensionale (2D) Koloniebildungsversuche (*colony formation assay*, CFA) durchgeführt. 5×10^3 Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden ausgesät und unter Selektion für eine Woche bei 37°C inkubiert. Die Zellkolonien wurden mit Methanol fixiert und zur Quantifizierung mit Giemsa-Farbstoff angefärbt. Die stabile Transfektion der HEK293 Zellen mit pSuper-Konstrukten gegen Hugl-1 oder Hugl-2 führte im Vergleich zur Leervektorkontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der Kolonienanzahl (Abbildung 43, A, B; $p < 0,05$, #33 ausgenommen).

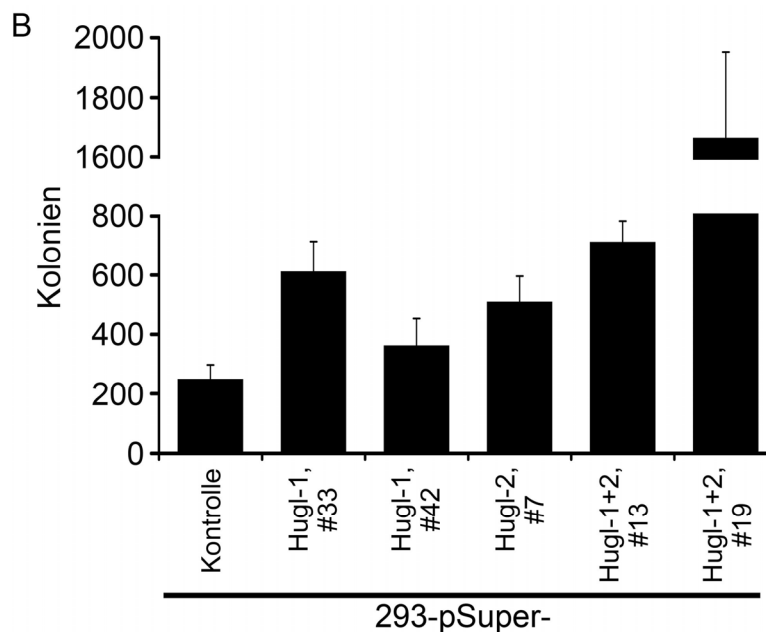
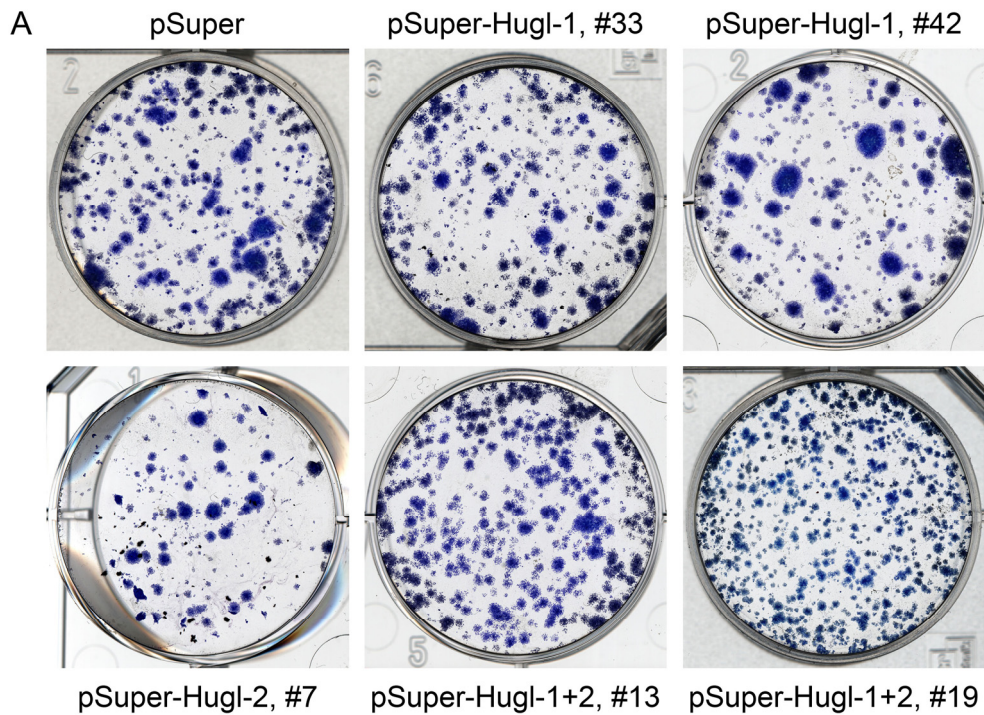


Abbildung 43. Untersuchung des Koloniebildungsverhaltens stabiler Hugl-1- und/oder Hugl-2-supprimierter HEK293 Zelllinien. Die Hemmung der Hugl-1- und/oder Hugl-2 Expression in HEK293 Zelllinien führt bei gleichzeitiger Destabilisierung epithelialer Strukturen zu einer verstärkten Zellproliferation und zu einer Zunahme der Zellmigration. (A) Für die Untersuchung des Koloniebildungsverhaltens wurden stabil transfizierte Zelllinien verwendet, die entweder eine Suppression von Hugl-1, Hugl-2 oder eine Hemmung beider Homologe aufwiesen. Es wurden 5×10^3 Zellen ausgesät und unter Selektion für eine Woche bei 37°C inkubiert, in Methanol fixiert und zur weiteren Quantifizierung mit Giemsa-Farbstoff angefärbt. (B) Quantifizierung der Kolonienanzahl. Die Bestimmung der Kolonienanzahl wurde mit der Software Quantity One (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige, in Triplikaten durchgeführte Experimente.

Unter gleichen Bedingungen zeigten die Zellen bei gleichzeitiger Suppression von Hugi-1 und Hugi-2 eine deutliche Zunahme der Kolonienanzahl sowie die Tendenz zur Bildung von Tochterkolonien (#13, $p = 0,0007$; #19, $p = 0,0011$). Die Daten legen den Schluss nahe, dass die Hemmung der Hugi-1 oder Hugi-2 Expression in HEK293 Epithelzellen zu einer verstärkten Zellproliferation führt und bei gleichzeitiger Destabilisierung der epithelialen Strukturen eine Zunahme der Zellmigration zur Folge hat. Dieser Effekt ist darüber hinaus in Zellen, in welchen die Expression beider Homologe gehemmt ist, zusätzlich verstärkt (Abbildung 43 A, #13, #19).

3.3.3.4 Analyse des Einflusses von Hvgl-1 und Hvgl-2 auf die Bildung von Zellsphäroiden in der *in vitro* Matrigel 3D-Kultur

Im 2D Koloniebildungsversuch wurde gezeigt, dass eine reduzierte Hvgl-Expression sowohl mit geschwächten Zell-Zell Interaktionen als auch mit einem erhöhten migratorischen Potenzial der Zellen einhergeht. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde nun das Verhalten der Zellen in einer dreidimensionalen (3D) Matrigel Kultur untersucht. Diese simuliert eine komplexe extrazelluläre Umgebung, die der Zusammensetzung der Basalmembran von Säugerzellen ähnelt und Epithelzellen ermöglicht, sich näherungsweise in *in vivo* Zellstrukturen zu organisieren. In Matrigel eingebettete Zellen bilden sphäroide Zellcluster, die sich gut zur Untersuchung der Zellmorphologie, Tumorzell-Metastasierungsprozesse oder Zellpolarität eignen.

Zur Durchführung des Versuchs wurden 5×10^3 Zellen der Zelllinien HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hvgl-1 (#33) und HEK293-pSuper-Hvgl-1-Hvgl-2 (#13) in Matrigel-beschichtete 8er Kammerdeckgläschen ausgesät. Nach 5-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen unter Zugabe von Selektionsreagenzien mit 10% Matrigel in Medium überschichtet und für 6 Tage inkubiert. Die Zellmorphologie wurde täglich untersucht. Anschließend wurden die Zellen zur Darstellung des F-Aktinzytoskeletts mit Alexa-Fluor-546-konjugiertem Phalloidin angefärbt und der Zellkern mit Hoechst 3332 sichtbar gemacht.

Die Untersuchung der Zellsphäroide zeigte, dass bis zu 50% der Hvgl-1-depletierten Zellen abnormale Zellaggregate mit mehreren filopodialen Ausstülpungen bildeten, welche sich in die umgebende extrazelluläre Matrix erstreckten (Abbildung 44 A, B). Kontrollzellen bildeten dagegen vornehmlich runde Sphäroide aus und nur zu 10% abnormale Aggregate. Bei gleichzeitiger Depletion von Hvgl-1 und Hvgl-2 wiesen darüber hinaus 85% der Zellen eine abnormale Morphologie auf. Sie bildeten im Gegensatz zur Kontrolle und Hvgl-1-depletierten Zellen einen Phänotyp mit deutlich ausgeprägteren filopodialen Ausstülpungen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen daher, dass ein verminderter Proteinspiegel der Tumorsuppressoren Hvgl-1 und Hvgl-2 in der 3D Kultur die Bildung abnormaler Zellaggregate mit stark ausgeprägten Filopodien induziert. Die Neigung der Zellen zur Bildung von Clustern mit filopodialen Ausstülpungen in die umgebende Matrix und die damit einhergehende Steigerung des metastatischen Potenzials könnte möglicherweise mit einer verringerten Zelladhäsion und einer gesteigerten Zellmotilität in Zusammenhang stehen.

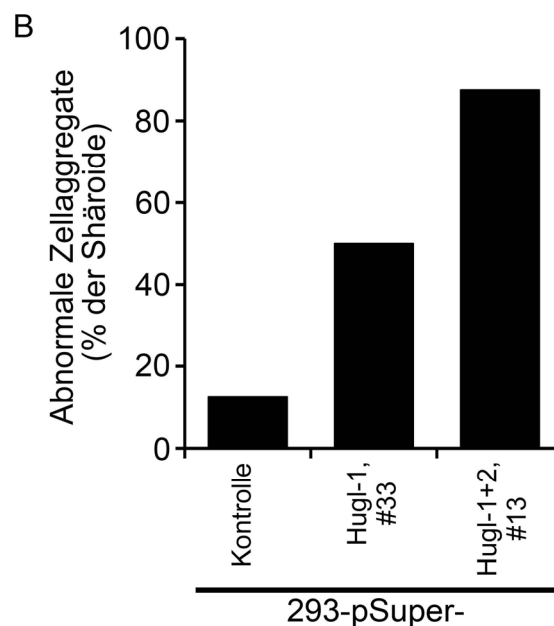
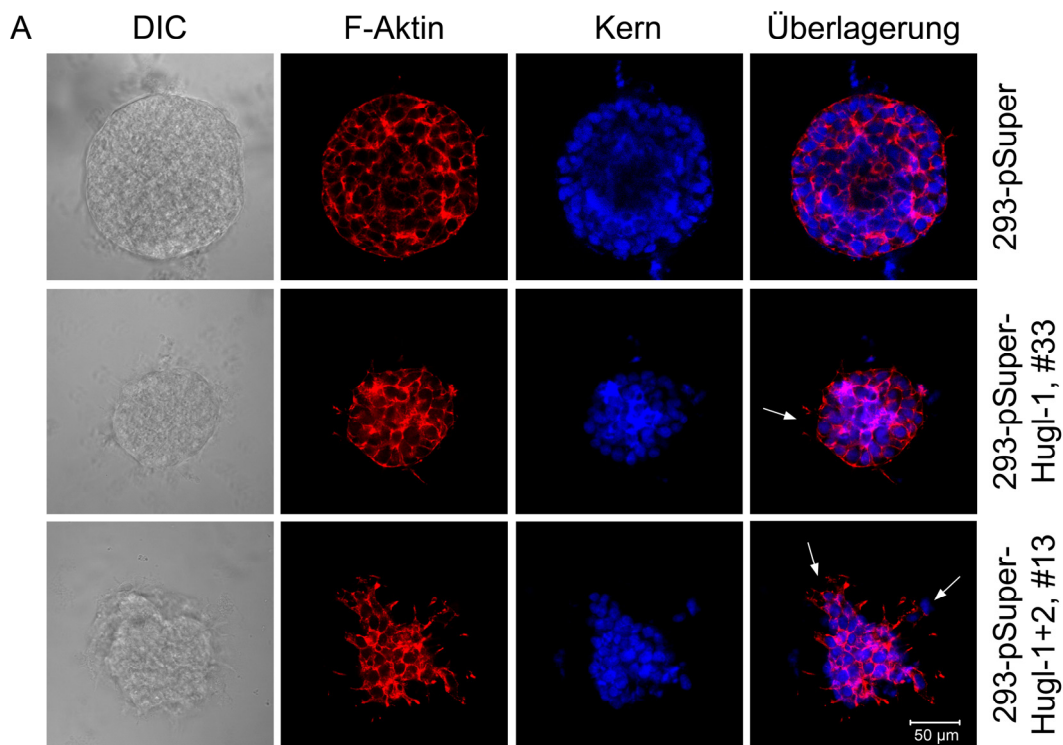


Abbildung 44. Analyse Hugl-depletierter HEK293 Zellen in der Matrigel 3D-Kultur. Der Verlust von Hugl-1 und/oder Hugl-2 führt in HEK293 Zellen zur Induktion abnormaler Zellaggregate und zur Bildung eines Phänotyps mit vermehrter Ausstülpung von Filopodien. Der zeitgleiche Verlust der Homologe verstärkt diese Auswirkungen deutlich. (A) Kammerdeckgläschen wurden mit Matrigel beschichtet und 5×10^3 Zellen der jeweiligen Zelllinie ausgesät. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und unter Zusatz von Selektionsreagenzien mit 10% Matrigel in Medium überschichtet. Nach Inkubation für 6 Tage bei 37°C wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und zur Analyse der Zellaggregate mit Alexa-Fluor-546-gekoppeltem Phalloidin (F-Aktin) und mit Hoechst 33342 (Zellkern) angefärbt. Exemplarische filopodiale Ausstülpungen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der dargestellte Balken entspricht einer Länge von $50 \mu\text{m}$. (B) Die statistische Analyse erfolgte mit jeweils 10-15 zufällig ausgewählten Zellaggregaten. Als abnormale Zellaggregate wurden diejenigen Sphäroide bezeichnet, die einen unregelmäßigen, nicht-runden Phänotyp mit filopodialen Ausstülpungen aufwiesen.

3.3.3.5 Einfluss von Hugn-1 und Hugn-2 auf das Migrationsverhalten

Die Ergebnisse aus den Versuchen an 2D- und 3D-Zellsystemen deuten darauf hin, dass der Verlust der Tumorsuppressorproteine Hugn-1 und Hugn-2 in stabil transfizierten HEK293 Zellen durch Inhibition der E-Cadherin Expression zu einer Abnahme der Zell-Zell Interaktion und Adhäsion führt und möglicherweise die Invasivität und Migration der Zellen begünstigt. Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen, wurden nachfolgend Migrationsstudien durchgeführt.

HEK293-pSuper-, HEK293-pSuper-Hugn-1- (#33), HEK293-pSuper-Hugn-2- (#7) und HEK293-pSuper-Hugn-1-Hugn-2- (#19) Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^5 in Boyden-Kammern ausgesät. Das untere Kompartiment des Aufbaus wurde zur Erzeugung eines Nährstoff- und Chemokingradienten mit Kulturmedium, 20% FBS und 100 ng/ml des Attraktans SDF-1 α versetzt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Zellen, die durch die Poren der Boyden-Kammer in das untere Kompartiment gewandert waren, im CellTiter-Glo Assay quantifiziert. Aus den in Abbildung 45 A gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass der RNAi-vermittelte Verlust von Hugn-1 oder Hugn-2 in HEK293 Zellen die Zellmigration im Chemokingradienten im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($p = 5 \times 10^{-5}$; $p = 1,7 \times 10^{-3}$). Eine gleichzeitige Depletion von Hugn-1 und Hugn-2 führt im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls zu einer weiteren Zunahme der Zellmigration (Abbildung 45 B; $p = 8 \times 10^{-5}$).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass Hugn-1 und Hugn-2 eine Stabilisierung des Zellverbandes in der adhären wachsenden Zelllinie HEK293 begünstigen. Der Verlust der Proteine bedingt eine Schwächung der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell Interaktionen und führt daher zu einer signifikanten Zunahme der Zellmigration im Transwell-Versuch.

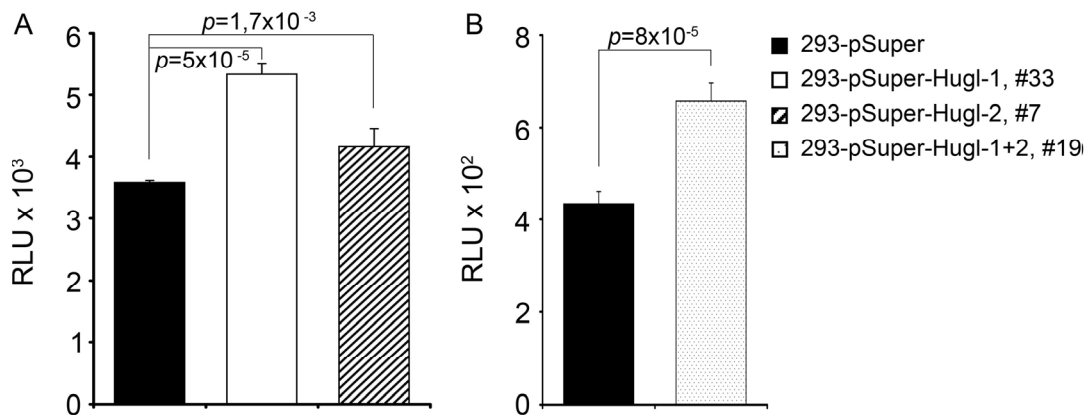


Abbildung 45. Untersuchung des Migrationsverhaltens Hugl-1- und/oder Hugl-2-supprimierter HEK293 Zellen. Der Verlust von Hugl führt zur signifikanten Zunahme des migratorischen Potenzials von HEK293 Zellen im Transwell-Versuch. (A) Migrationsverhalten stabil transfizierter HEK293-pSuper-Hugl-1 und HEK293-pSuper-Hugl-2 Zellen. (B) Migration von Hugl-1- und Hugl-2-depletierten Zellen, HEK293-pSuper-Hugl-1+2. Es wurden 2×10^5 Hugl-depletierte, stabile HEK293 Zellen in eine Boyden-Kammer ausgesät und das untere Kompartiment der Kammer mit Kulturmedium sowie 100 ng/ml SDF-1 α und 20% FBS als Attraktans versetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und diejenigen Zellen im CellTiter-Glo Assay bestimmt, die in das untere Kompartiment migriert waren. RLU: Relative Lichteinheiten (*relative light units*).

3.3.3.6 Effekt von Hugl-1 und Hugl-2 auf den Zellzyklusregulator Cyclin D1

Die starke Zunahme der Kolonienzahl Hugl-supprimierter HEK293 Zellen im Koloniebildungs-Experiment ließ vermuten, dass Hugl-1 und -2 die Zellproliferation und den Zellzyklus kontrollieren. Als ein mitogener Sensor und allosterischer Aktivator von CDK4/6 kontrolliert Cyclin D1 den Übergang einer Zelle von der G1- zur S-Phase und wird in normalen, wie auch in Tumorzellen exprimiert (Kim und Diehl, 2009; Indra *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, welchen Einfluss Hugl auf die Aktivierung des Cyclin D1 Promotors in der Zelle und damit auf die Proliferation ausübt, wurden die Zellen mit einem CyclinD1-Promotor-Luziferase Reportergen transfiziert. Die Expression der Luziferase von diesem ektopischen Reporterkonstrukt korreliert dabei mit einem Anstieg der endogenen Cyclin D1-spezifischen mRNA (Müller *et al.*, 1994) und gibt Auskunft über die Regulation des Zellzyklus.

Stabil transfizierte Zellen der Zelllinien HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hugl-1 (#33), HEK293-pSuper-Hugl-2 (#7) und HEK293-pSuper-Hugl-1-Hugl-2 (#1) wurden in eine Zellkulturschale ausgesät und mit 1 μ g des CyclinD1-Promotor-Luziferase Reportergens oder mit dem pA3-Leervektor als Kontrolle transfiziert. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, in Puffer lysiert und die Luziferaseaktivität in einem Fluoreszenzlesegerät gemessen. Aus den Daten in Abbildung 46 ging hervor, dass die Expression der Luziferase des Cyclin D1-Reporter Konstrukts in Hugl-1- oder Hugl-2-depletierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle

11,4- (HEK293-pSuper-Hugl-1, #33) bis 16,8-fach (HEK293-pSuper-Hugl-2, #7) erhöht war. In Zellen, in denen beide Hugl-Homologe supprimiert waren, war die Luziferase-Expression um das 13,5-fache erhöht und wies keinen signifikanten Unterschied zu Zellen auf, in denen nur eines der beiden Homologen reprimiert war.

Die Ergebnisse zeigen, dass Hugl-1- und/oder Hugl-2-depletierte HEK293 Zellen das G1-spezifische Cyclin D1 auf transkriptioneller Ebene deutlich überexprimieren und möglicherweise einen beschleunigten G1- zu S-Phasenübergang aufweisen. Die Cyclin D1 Expression könnte dabei durch die Tumorsuppressorproteine Hugl-1 und Hugl-2 invers reguliert werden.

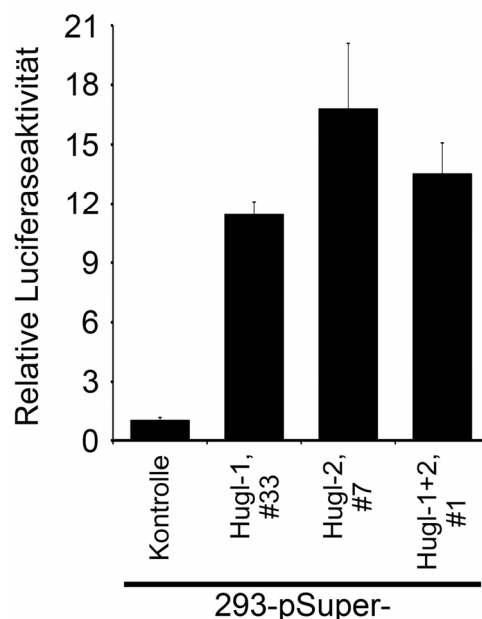


Abbildung 46. Einfluss von Hugl-1 und Hugl-2 auf den Zellzyklusregulator Cyclin D1. Der Verlust des Tumorsuppressors Hugl-1 und/oder Hugl-2 führt zur Überexpression des Zellzyklusregulators Cyclin D1. Es wurden entweder 1 µg des Cyclin D1-Promotor-Luziferase Reporterkonstrukts oder des Leervektors pA3 in HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hugl-1 (#33), HEK293-pSuper-Hugl-2 (#7) und HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#1) transfiziert. Die Luziferaseaktivität wurde nach 24-stündiger Inkubation in einem Fluoreszenzlesegerät bestimmt. Der pA3-Vektor diente als Hintergrundkontrolle für das Experiment. Die Daten stellen die relative Luziferaseaktivität abzüglich der Hintergrundkontrolle dar und sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

3.3.3.7 Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellzyklusverteilung in Hugi-1 und Hugi-2 depletierten HEK293 Zellen

Der Verlust der Hugi-Tumorsuppressorproteine führt zu einer Überexpression von Cyclin D1 und bewirkt möglicherweise eine Kumulation der Zellen in der S-Phase. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Zellen wie folgt analysiert. Zellen der Zelllinien HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hugi-1 (#33, #42), HEK293-pSuper-Hugi-2 (#7) und HEK293-pSuper-Hugi-1-Hugi-2 (#13, #19) wurden in einer Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, mit Ethanol für 30 Minuten bei -20°C fixiert, in PBS gewaschen und in Nicolettipuffer aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgte durchflusszytometrisch.

Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 47 A und B dargestellt. Die siRNA-vermittelte Repression von Hugi-1 oder Hugi-2 in HEK293 Zellen führte im Gegensatz zur Kontrolle zu einer geringfügigen Verschiebung des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase (Abbildung 47 A). Zellen, in denen beide Homologe gleichzeitig inhibiert wurden, zeigten dagegen eine deutliche Abnahme von Zellen in der G1- und eine Zunahme von Zellen in der S-Phase (Abbildung 47 B).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Verlust von Hugi in HEK293 Zellen durch eine Steigerung der Cyclin D1-Expression einen verstärkten G1-S-Phasenübergang induziert und möglicherweise zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen beiträgt.

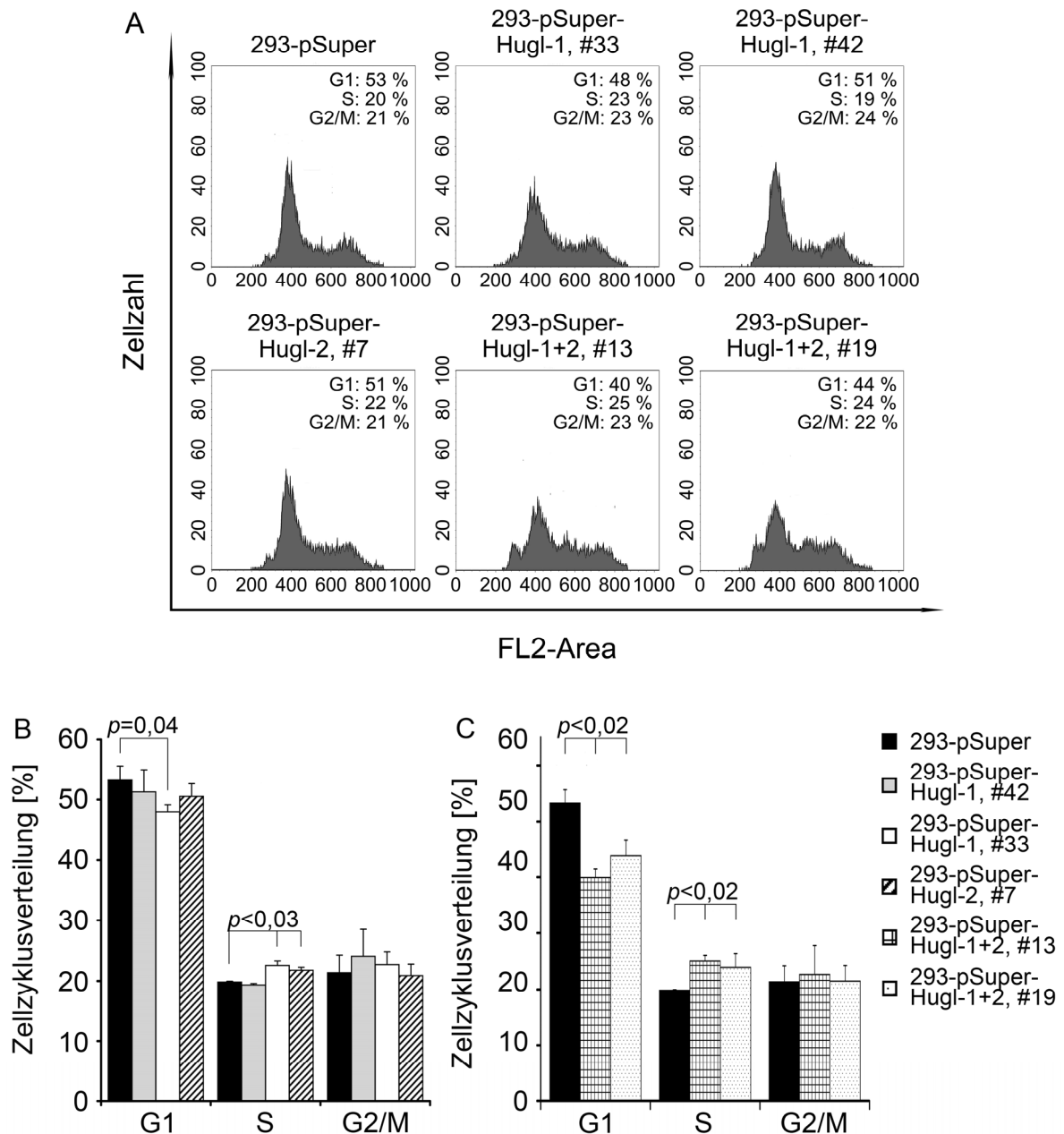


Abbildung 47. Durchflusszytometrische Analyse Hsp90α-depletierter HEK293 Zellen. Der Verlust von Hsp90α1 und/oder Hsp90α2 in HEK293 Zellen induziert verstärkt einen G1-S Phasenübergang und eine Kumulation der Zellen in der Synthese-Phase. (A) Repräsentative Histogramme der Zellzyklusanalyse. Dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen. (B) Hsp90α1 oder Hsp90α2 depletierte HEK293 Zellen im Vergleich zur Kontrolle. (C). Gleichzeitige Depletion von Hsp90α1 und Hsp90α2 in HEK293 Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Stabil transfizierte HEK293 Zellen, die siRNA gegen Hsp90α1 und/oder Hsp90α2 exprimieren, wurden in Triplikaten ausgesät, inkubiert und nach 24 Stunden geerntet. Die Zellen wurden in Ethanol für 30 Minuten bei -20°C fixiert, mit Nicolettipuffer versetzt und durchflusszytometrisch vermessen. Die gewonnenen Daten wurden mit der Software Cell Quest Pro weiterbearbeitet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Daten in (B) und (C) jeweils gegen die Kontrolle (HEK293-pSuper) dargestellt.

3.3.3.8 Proliferationsverhalten Hugi-1- und Hugi-2-defizienter Zellen

Hugi-depletierte HEK293 Zellen zeigen eine erhöhte Aktivierung des Cyclin D1 Promotors und eine Kumulation der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Im Proliferationsassay wurde daher das Wachstumsverhalten dieser Zellen analysiert. In die Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte wurden hierzu Zellen der Zelllinien HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hugi-1 (#42), HEK293-pSuper-Hugi-2 (#7) und HEK293-pSuper-Hugi-1+2 (#13; #19) in Kulturmedium ausgesät und für 0-72 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Bestimmung des Wachstumsverhaltens erfolgte in Abständen von 24 Stunden durch eine Viabilitätsmessung mit CellTiter-Glo. Die Zellen wurden hierbei mit 25 µl des Reagenzes für 10 Minuten inkubiert und im Luminometer vermessen.

Die in Abbildung 48 A-C dargestellten Daten belegen, dass der Verlust von Hugi-1 oder Hugi-2 in HEK293 Zellen im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation ausübt. Die gleichzeitige Depletion beider Homologe führt hingegen zur deutlichen Steigerung der Zellproliferation (Abbildung 48 D, E).

Zusammenfassend geben die Ergebnisse einen deutlichen Hinweis darauf, dass der gleichzeitige Verlust von Hugi-1 und -2 in HEK293 Zellen die Hyperproliferation – im Gegensatz zu Zellen mit Depletion nur einer der beiden Homologen – begünstigt und auf diese Weise zur Tumorprogression beiträgt. Die vorliegenden Daten sind somit konsistent mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Versuchen, wonach der Verlust von Hugi zur erhöhten Cyclin D1 Promotor Aktivität sowie zur Kumulation der Zellen in der S-Phase führt und schließlich in der Hyperproliferation der Zellen resultiert.

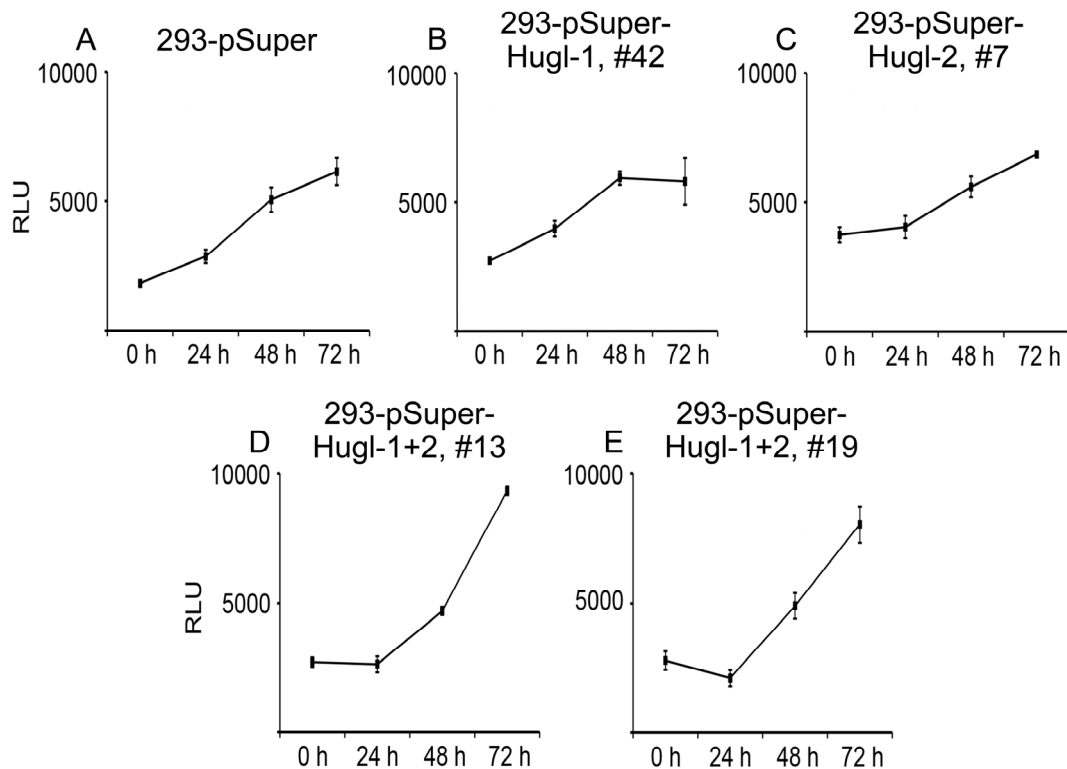


Abbildung 48. Analyse der Zellproliferation Hugl-depletierter HEK293 Zellen. Der Verlust beider Hugl-Homologe bewirkt im Gegensatz zu Leervektor-transfizierten und Hugl-1- oder Hugl-2-depletierten Zellen eine gesteigerte Zellproliferation. (A) HEK293-pSuper. (B) HEK293-pSuper-Hugl-1 (#42). (C) HEK293-pSuper-Hugl-2 (#7). (D) HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#13). (E) HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#19). Für eine bessere Übersicht wurden die einzelnen Diagramme nebeneinander dargestellt. Stabil transfizierte HEK293 Klone wurden zu je 1×10^4 Zellen pro Vertiefung in einer 96-Mikrotiterplatte mit Kulturmedium ausgesät und für unterschiedliche Zeitpunkte 0-72 Stunden inkubiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte alle 24 Stunden mit dem CellTiter-Glo Lumineszenz-Kit. Die Messung wurde für jeden Zeitpunkt in Quadruplikaten durchgeführt. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente. RLU: relative Lichteinheiten (*relative light units*).

3.3.3.9 Einfluss des Hugl-1- und Hugl-2-Expressionsstatus auf das Ansprechen von HEK293 Zellen auf Zytostatika

Die Ergebnisse aus den vorigen Untersuchungen geben klare Hinweise auf die protumorigenen Eigenschaften von Hugl-supprimierten HEK293 Zellen *in vitro*. Frühere Untersuchungen des Transkriptionsprofils von 60 soliden Tumoren zeigten, dass die Expression von *hugl-1* in 62% der Proben entweder reduziert oder nicht vorhanden war (Grifoni *et al.*, 2004). Zudem wiesen 75% der 94 untersuchten Kolonkarzinomen einen Verlust von Hugl-1 auf, welcher direkt mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert werden konnte (Schimanski *et al.*, 2005). Da bislang keine Studien dazu durchgeführt wurden, die den Einfluss des Hugl-Expressionsstatus auf die Ansprechbarkeit der Tumorzellen auf Chemotherapeutika untersuchten, wurden Zytotoxizitätsstudien mit Hugl-supprimierten HEK293 Zellen durchgeführt.

Hierzu wurden Zellen der Zelllinien HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hugl-1 (#33), HEK293-pSuper-Hugl-2 (#7) und HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#13) geerntet und in Quadruplikaten zu je 1×10^4 Zellen in eine 96-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden für den Kontrollwert entweder unbehandelt belassen oder mit Artesunate (200 μ M, 18 Stunden) oder Doxorubicin (2 mM, 24 Stunden) inkubiert. Die Bestimmung der Zellviabilität wurde mit dem CellTiter-Glo Kit durchgeführt. Die in Abbildung 49 A und B dargestellten Daten zeigen, dass sowohl Hugl-1- als auch Hugl-2-depletierte HEK293 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine starke Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Artesunate und Doxorubicin aufweisen ($p < 3,35 \times 10^{-5}$; $p < 0,003$). Die gleichzeitige Depletion der Homologe führt jedoch nur bei den mit Artesunate behandelten Zellen zu einer stärkeren Resistenz als bei einer Depletion der jeweiligen Homologe alleine (Abbildung 49 A).

Die Ergebnisse legen daher nahe, dass ein geringer Expressionsstatus von Hugl-1 und Hugl-2 in HEK293 Zellen unmittelbar mit einem schlechten Ansprechen der Zellen auf Chemotherapeutika korreliert.

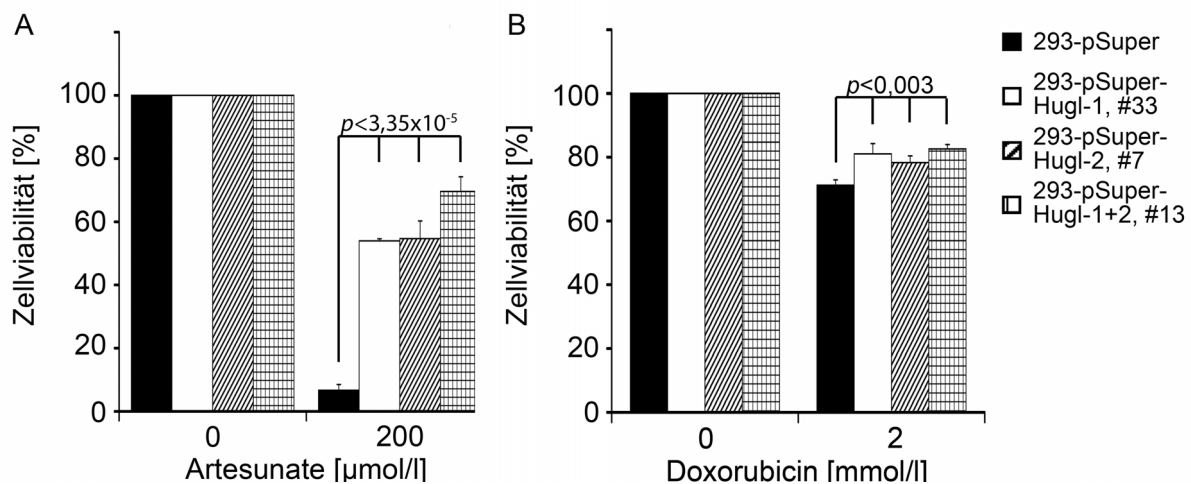


Abbildung 49. Zytostatischer Effekt der Chemotherapeutika Artesunate und Doxorubicin auf Hugl-supprimierte HEK293 Zellen. Die spezifische Reduktion der Tumorsuppressoren Hugl-1 und/oder Hugl-2 durch RNAi erhöht die Resistenz von HEK293 Epithelzellen gegenüber Chemotherapeutika. Behandlung von Kontroll- und Hugl-1- und/oder Hugl-2-defizienten HEK293 Zellen mit (A) Artesunate und (B) Doxorubicin. Die Zelllinien HEK293-pSuper, HEK293-pSuper-Hugl-1 (#33), HEK293-pSuper-Hugl-2 (#7) und HEK293-pSuper-Hugl-1+2 (#13) wurden geerntet und in einer 96-Mikrotiterplatte zu je 1×10^4 Zellen/Vertiefung ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit Artesunate (200 μ M, 18 Stunden) oder Doxorubicin (2 mM, 24 Stunden) versetzt und unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen mit CellTiter-Glo Reagenz inkubiert und die emittierte Lumineszenz im Luminometer detektiert.

3.3.3.10 Einfluss von Hvgl-1 und Hvgl-2 in *in vivo* Maus Xenograft Versuchen

Die reduzierte Expression von Hvgl-1 ist häufig mit der Progression humaner Tumore assoziiert (Schimanski *et al.*, 2005; Kuphal *et al.*, 2006; Grifoni *et al.*, 2004). Um die tumorigenen Eigenschaften der Hvgl-1-supprimierten Transfektanten *in vivo* zu analysieren, wurden Maus Xenograft Studien durchgeführt. Hierzu wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen der Zelllinien HEK293-pSuper oder HEK293-pSuper-Hvgl-1 (#33) subkutan in die Leistengegend immun-supprimierter NOD-SCID Mäusen injiziert. Für jede Versuchsgruppe des Experiments wurden 4 Mäuse verwendet, die 10 Wochen alt waren. Das Tumorwachstum wurde alle 3 Tage durch Bestimmung der TumorgroÙe mit einem Messschieber bestimmt. 5-6 Wochen nach Implantation der Zellen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und für die Tumor- und Organentnahme seziiert.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der TumorgroÙe von Mäusen beobachtet werden, denen Kontroll- oder HEK293-pSuper-Hvgl-1 Zellen appliziert worden waren (Abbildung 50 A). Die Untersuchung der entfernten Tumore zeigte, dass 75% (3/4) der Tumore – im Gegensatz zu Tumoren aus der Kontrollgruppe – benachbartes Muskelgewebe infiltriert hatten und eine unregelmäßige und raue Oberfläche aufwiesen. Darüber hinaus wiesen 50% (2/4) der Mäuse in Abwesenheit von Hvgl-1 Sekundärtumore in unmittelbarer Nähe des Primärtumors auf (Abbildung 50 B). In beiden Versuchsgruppen war keine sichtbare Organfernmetastasierung beobachtbar. Des Weiteren zeigte die in Abbildung 50 C dargestellte semiquantitative Analyse des exzidierten Tumorgewebes, dass alle aus HEK293-pSuper-Hvgl-1 (#33) Zellen stammenden Tumore nach der Mauspassage im Gegensatz zur Kontrollgruppe weiterhin verminderte *hvgl-1*-Transkripte aufwiesen (3,3-fach \pm 0,39). Die beobachteten morphologischen Unterschiede der Tumore sind daher sehr wahrscheinlich auf den Verlust des Hvgl-1 Tumorsuppressorproteins zurückzuführen.

Die Ergebnisse sind konsistent mit den *in vitro* gemachten Beobachtungen und legen nahe, dass Hvgl-1 ein wichtiger Suppressor für das Tumorwachstum ist und dass der Verlust von Hvgl-1 die Tumorprogression fördert. Es ist zu vermuten, dass die gleichzeitige Inhibierung der Hvgl-Homologe möglicherweise zu einer deutlich verstärkten Tumorprogression und -metastasierung im *in vivo* System beitragen würde. Dies ist jedoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

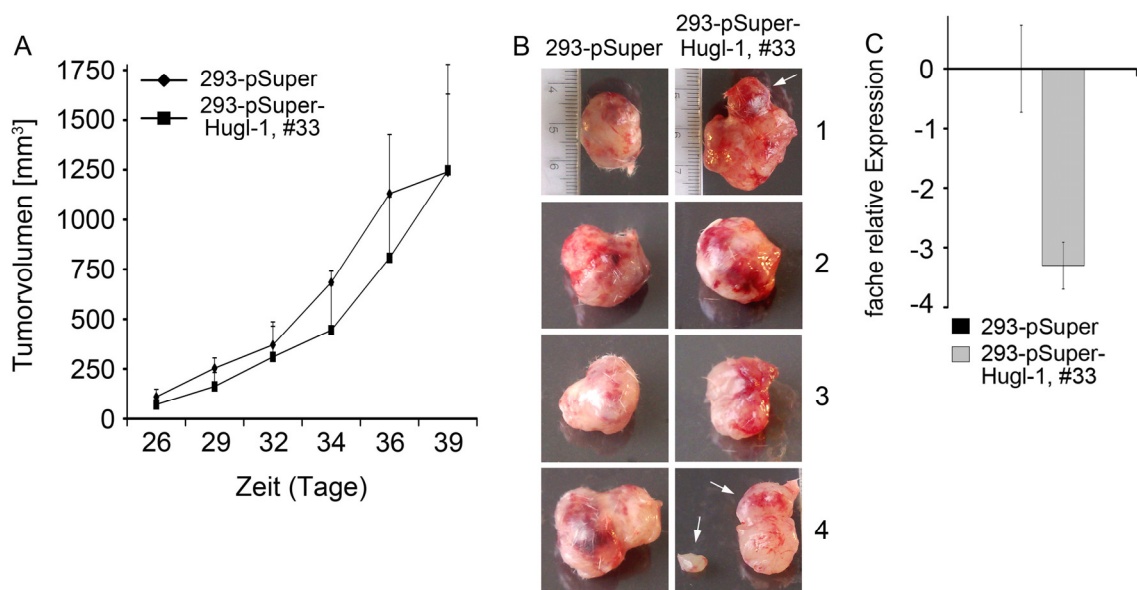


Abbildung 50. Tumorigenitätsassay in NOD-SCID Mäusen nach subkutaner Applikation von HEK293-pSuper- und HEK293-pSuper-Hugl-1-Zellen. Der Verlust von Hugl-1 führt im Vergleich zur Kontrolle zu keinem signifikanten Unterschied in der Tumorgöße, jedoch verstärkt zu Sekundärtumoren und einer veränderten Tumormorphologie. Die Ergebnisse legen nahe, dass Hugl-1 ein wichtiger Tumorsuppressor darstellt und ein Verlust von Hugl-1 die Tumorprogression fördert. (A) Wachstumsdynamik lokaler Tumore. Dargestellt ist das Tumolvolumen von NOD-SCID Mäusen, welche Injektionen von Kontrolltransfektanten oder Hugl-1-supprimierten, stabilen Transfektanten erhalten hatten. Dargestellte Punkte repräsentieren die jeweiligen Mittelwerte. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. (B) Nach 39 Tagen entfernte Tumore. Weiße Pfeile markieren Sekundärtumore. (C) *Hugl-1*-Transkription in entfernten lokalen Tumoren. Im Gegensatz zur Kontrolle wiesen entfernte Tumore in Mäusen, denen Zellen der Zelllinie HEK293-pSuper-Hugl-1 (#33) injiziert worden waren, nach der Mauspassage $3,3 \pm 0,39$ fach verminderte *hugl-1*-mRNA Spiegel auf. Für die Durchführung des Versuches wurden $7,5 \times 10^6$ HEK293-pSuper oder HEK293-pSuper-Hugl-1 Zellen subkutan in die Leistengegend von immunsupprimierten NOD-SCID Mäusen injiziert. Das Tumorstadium wurde alle 3 Tage überwacht und die Tumorgöße mit einem Messschieber bestimmt. 39 Tage *post injectionem* wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, der Tumor entfernt und analysiert.

3.4 Cre/loxP-vermittelte konditionale *mgl-2* Deletion in der Maus

Das aus dem Bakteriophagen P1 stammende Cre/loxP-Rekombinationssystem wird in der Molekulargenetik häufig zur gezielten Inaktivierung von Genen (*gene targeting*) angewendet. Es dient dazu, die Steuerung und Kontrollmechanismen von Genen durch Erzeugung eines Funktionsverlustes *in vivo* besser verstehen zu können. Um eine transgene Mauslinie mit einer Cre/loxP-vermittelten gewebespezifischen Deletion des Zielgens zu etablieren, sind zwei verschiedene, genmodifizierte Mauslinien erforderlich. Durch die Kreuzung einer Mauslinie, die das loxP-flankierte Zielgen trägt, mit einem Mausstamm, der das Cre-Transgen unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert, kommt es zu einer gewebespezifischen Deletion des Zielgens in der Nachfolgeneration. Die gewebespezifische Cre-vermittelte Gen-Inaktivierung kann auch zeitlich kontrolliert werden, indem Ligandenabhängige Cre-Rekombinasen zur Anwendung kommen, die selektiv durch synthetische Wirkstoffe aktivierbar sind. Um Funktion und Eigenschaften des *mgl-2* Gens, einem Maus-Homologen des humanen *hugl-2* Tumorsuppressorgens, *in vivo* zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit gewebespezifische und zeitlich kontrollierbare *mgl-2* *Knockout*-Mäuse (*mgl-2*^{-/-}) generiert.

3.4.1 Mäuse mit loxP-flankiertem *mgl-2*

Das *mgl-2* Gen befindet sich auf Chromosom 11 und erstreckt sich mit 26 Exons und 25 Introns über eine Größe von ungefähr 50 kb (Kashyap, 2008). *Mgl-2* wird im Gegensatz zum ubiquitär exprimierten *mgl-1* Gen besonders stark in Leber, Niere, Magen und Gastrointestinaltrakt exprimiert (Klezovitch *et al.*, 2004). Zur Herstellung transgener Mäuse mit loxP-flankiertem *mgl-2* Gen wurden in Vorarbeiten die Exons 2, 3 und 4 durch homologe Rekombination mit zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen flankiert (Abbildung 51). Hierzu wurden die loxP-Sequenzen in Introns insertiert, so dass das *mgl-2* Gen weiterhin funktionsfähig bleibt. Durch Einkreuzen des Cre-Transgens mittels einer zweiten Mauslinie kommt es zu einer Cre-vermittelten Deletion der loxP-flankierten Exons innerhalb des *mgl-2* Zielgens. Dies führt zur Translation eines nicht-funktionalen *mgl-2* Teilproteins, dem die durch Exon 2, 3 und 4 kodierte funktionale Domäne vollständig fehlt. Auf diese Weise wird eine *loss-of-function* Mausmutante erzeugt, welche Rückschlüsse auf die Funktion und Rolle von *mgl-2* im Mausmodell ermöglicht.

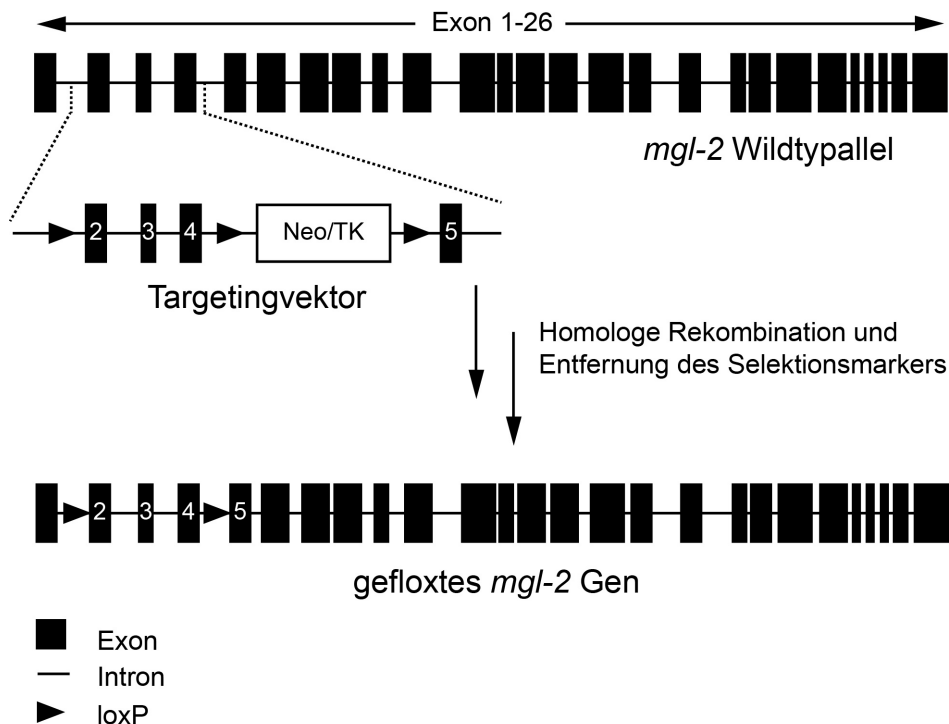


Abbildung 51. Targeting-Strategie zur konditionalen Deletion des *mgl-2* Gens in Mäusen. Das auf Chromosom 11 befindliche *mgl-2* Wildtypallele umfasst 26 Exons und 25 Introns. Durch homologe Rekombination des Wildtypallels mit einem Targetingvektor, auf dem sich der gefloxtes *mgl-2* Genabschnitt befindet, entsteht ein Rekombinationsprodukt, in welchem zwei loxP-Sequenzen am 5' und 3' Ende von Exon 2 und 4 des *mgl-2* Gens inseriert sind. Die loxP-flankierte Neomycinkassette dient der Selektionierung und wird nach erfolgter Rekombination entfernt. Modifiziert nach (Kashyap, 2008).

Um transgene, loxP-Sequenzen tragende Mausmutanten von wildtypischen Mauslinien zu unterscheiden und die Cre-vermittelte Deletion des *mgl-2* Gens nachweisen zu können, wurden PCR Analysen mit genomischer Maus-DNA aus Schwanzbiopsien durchgeführt. Drei verschiedene PCR Primer wurden verwendet, um zwischen wildtypischen (*mgl-2* Gen ohne flox), flox heterozygoten (*mgl-2* Gen mit flox auf einem der beiden Allele), flox homozygoten Tieren (*mgl-2* Gen mit flox auf beiden Allelen) und Tieren mit deletiertem Allel (*mgl-2* Gen ohne Exons 2, 3 und 4) zu unterscheiden (Kashyap, 2008). Primer A bindet im Intronbereich zwischen Exon 1 und 2, Primer B hybridisiert mit Exon 4, während Primer C zwischen Exon 4 und 5 lokalisiert ist (Abbildung 52 A-C).

Der Maus-Genotyp wurde durch semiquantitative PCR-Analyse genomischer Maus-DNA bestimmt. Zum Nachweis von flox wurde eine PCR mit Primern B und C durchgeführt. Wildtypische Mäuse ergeben eine Fragmentgröße von 380 bp (Abbildung 52 A) während flox heterozygote Mäuse, die ein wildtypisches und ein gefloxtes Allel enthalten, anhand Fragmentgrößen von 380 und 550 bp identifizierbar sind (Abbildung 52 A, B). Die Cre-vermittelte Deletion des *mgl-2* Gens wurde durch PCR-Analyse genomischer Maus-DNA unter Verwen-

derung der Primer A und C durchgeführt. Das resultierende Fragment hat eine Größe von 670 bp (Abbildung 52 C). Das gefloخته, aber intakte Gen weist dagegen ein Fragment von 2800 bp Länge auf (Abbildung 52 B).

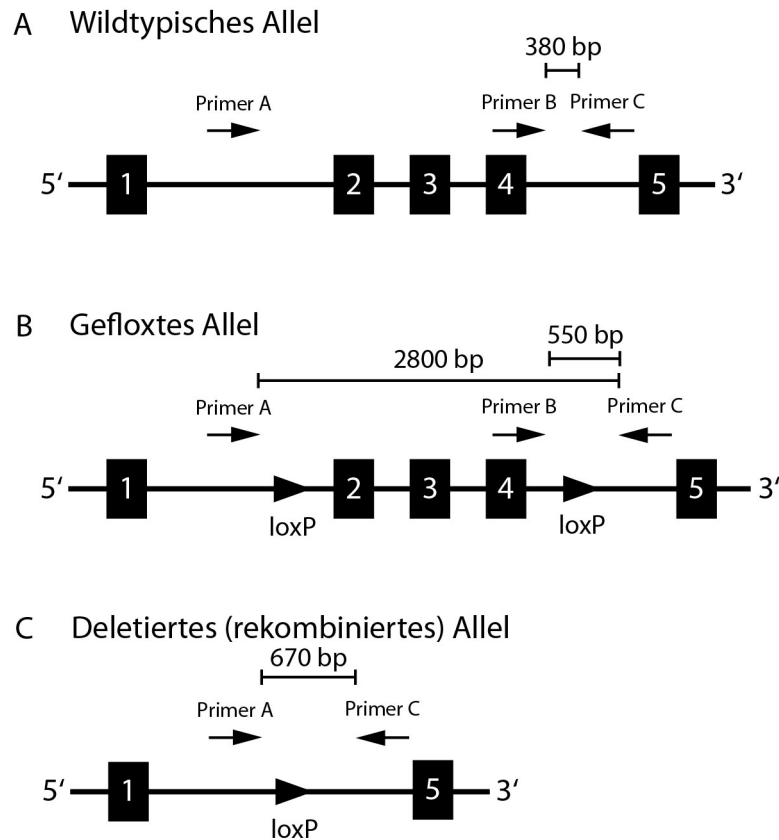


Abbildung 52. Semiquantitative PCR-Analyse genomischer Maus-DNA zur Unterscheidung wildtypischer, gefloxter oder gen-deletierter Mäuse. Der jeweilige Maus-Genotyp kann anhand der Fragmentlänge der PCR-Reaktionsprodukte eindeutig identifiziert werden. (A) Unter Verwendung der Primerpaare B und C entstehen für wildtypische, nicht-gefloخته Mäuse Amplifikationsprodukte mit einer Größe von 380 bp. (B) Mäuse mit integrierten loxP-Sequenzen generieren für heterozygote Tiere ein Produkt von 380 und 550 bp Länge. Für homozygote Tiere wird ein 550 bp langes Produkt erhalten. Das *mgl-2* Gen bleibt in Abwesenheit der Cre-Rekombinase funktionell intakt. Die Verwendung von Primer A und C führt in diesem Fall zu einer Fragmentlänge von 2800 bp. (C) Die Verpaarung gefloxter Mäuse mit einer zweiten Linie, die das Cre-Transgen enthält, führt im *mgl-2* Gen zur Deletion der Exons 2, 3 und 4. Der Nachweis der Deletion erfolgt unter Verwendung der Primerpaare A und C durch Detektion eines 670 bp langen PCR-Fragmentes. Schwarze Vierecke repräsentieren Exons, die Intron-Bereiche sind als Linien dargestellt.

3.4.1.1 Analyse von *mgl-2*-flox Mäusen

Zur eindeutigen Unterscheidung von Mäusen mit integrierten loxP-Sequenzen von wildtypischen Tieren wurden Mausschwanz-Biopsien durchgeführt. Die daraus isolierte genomische DNA wurde zur Genotypisierung einer semiquantitativen PCR-Analyse unterzogen. Die Primerpaare B und C wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgenommen und die PCR für 36 Zyklen durchgeführt. 10 µl der Amplifikationsprodukte wurden auf einem Agarosegel

aufgetrennt und die Banden nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in Abbildung 53 dargestellt. Wildtypische Mäuse ohne integrierte flox-Bereiche ergeben ein Fragment mit einer Länge von 380 bp. Flox heterozygote Tiere tragen das loxP-flankierte *mgl-2* Gen nur auf einem der beiden Allele und sind daher durch eine Doppelbande von 380 und 550 bp identifizierbar. Flox homozygote Mäuse haben die loxP-Sequenzen auf beiden Allelen integriert und weisen im Agarosegel eine Fragmentlänge von 550 bp auf.

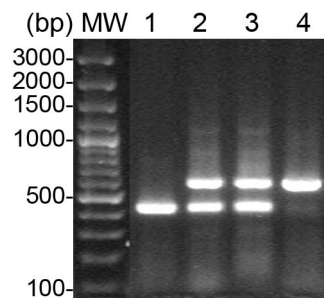


Abbildung 53. Genotypisierung von *mgl-2*-flox Mäusen. Zur Detektion der im Mausgenom integrierten flox-Bereiche wurden Schwanzbiopsien vorgenommen und die daraus isolierte genomische DNA unter Verwendung der Primer B und C einer PCR Analyse unterzogen. Die PCR wurde für 36 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 61°C in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Hälfte des Ansatzvolumens wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Nichtgefloxte, wildtypische Mäuse (Spur 1) ergeben Fragmente von 380 bp Länge, flox heterozygote Tiere (Spuren 2 und 3) weisen ein 380 bp Fragment für das wildtypische und ein 550 bp Fragment für das gefloxe Allel auf. Flox homozygote Mäuse (Spur 4) ergeben Fragmentlängen von 550 bp.

3.4.1.2 Erhalt der *mgl-2*^{flox/flox} Mauslinie

Zum Erhalt eines Mausstamms mit *mgl-2* flox homozygoten Tieren wurde 1 *mgl-2*^{flox/flox} Männchen mit 2 *mgl-2*^{flox/flox} Weibchen verpaart. Die Nachkommen wurden stichprobenartig 3 Wochen nach der Geburt genotypisiert. Hierzu wurden Mausschwanz-Biopsien vorgenommen und die genomische DNA isoliert. Eine semiquantitative PCR mit Primern B und C wurde durchgeführt und der Genotyp der Mäuse anhand der Fragmentlänge des amplifizierten Genabschnittes im Agarosegel identifiziert. Wie aus Abbildung 54 ersichtlich ist, waren alle Nachkommen der Verpaarung homozygot für flox (*mgl-2*^{flox/flox}). Die Tiere zeigten keine Defekte oder auffälliges Verhalten. Die Ergebnisse lassen daher vermuten, dass die in das Mausgenom integrierten loxP-Sequenzen nicht letal wirken und keinerlei offensichtliche Auswirkungen auf das Verhalten oder den Phänotyp der Tiere ausüben.

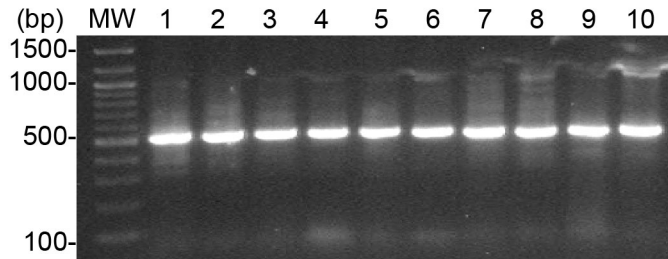


Abbildung 54. Verpaarung zum Erhalt der *mgl-2*^{flox/flox} Mauslinie. Ein Männchen und zwei Weibchen *mgl-2*-flox homozygoter Tiere wurden miteinander verpaart und die Nachkommen stichprobenartig 3 Wochen nach der Geburt einer Mausschwanz-Biopsie unterzogen. Die isolierte genomische DNA wurde zur Identifizierung des geflochten *mgl-2* Gens in einer semiquantitativen PCR mit Primern B und C analysiert. Die Produkte der Amplifikation wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Banden nach der Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Der Genotyp der Mäuse wurde anhand der Länge der PCR-Fragmente bestimmt.

3.4.2 Darmspezifische und zeitlich kontrollierte Deletion von *mgl-2*

Die ektopische Expression von Transgenen oder auch ein *Knockout* von Genen kann zu einer Entwicklungsstörung der Maus oder sogar zur embryonalen Letalität führen (Robine *et al.*, 1997; Vignjevic *et al.*, 2007). Daher ist es erstrebenswert, Gene nicht nur gewebespezifisch, sondern auch zeitlich kontrolliert ausschalten zu können. Das gastrointestinale Epithelgewebe der adulten Maus eignet sich besonders gut als Modellsystem zum Verständnis der vektoriellen Zellmigration sowie der Tumorigenese (el Marjou *et al.*, 2004; Robine *et al.*, 1997). Um die funktionale Rolle und die Eigenschaften des *mgl-2* Gens in Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts zu untersuchen, wurde eine transgene Mauslinie etabliert, die eine Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des darmspezifischen Villin-Promotors (Vil-Cre-ER^{T2}) exprimiert. Neben Dünn- und Dickdarm wird der Villin-Promotor adulter Mäuse nur noch in den proximalen Tubuli der Niere exprimiert (Vignjevic *et al.*, 2007) und garantiert daher die ortsspezifische Expression des Cre-Proteins.

Mit der natürlichen Expression von Villin im Kolon wird das inaktive Cre-Estrogenrezeptor (ER) Fusionsprotein exprimiert, das keine Affinität zum endogenen Liganden aufweist. Erst die Applikation des Antiestrogens Tamoxifen, einem synthetischen Liganden, aktiviert die Cre-Rekombinase und führt zu einer gezielten, raumzeitlich-kontrollierten Exzision des geflochten *mgl-2* Gens im Kolon.

3.4.2.1 Etablierung transgener *mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{Cre/+} Mäuse

Die Mauslinie *mgl-2*^{flox/+} *Vil*^{Cre/+} wurde von Dr. D. Strand zur Verfügung gestellt und ursprünglich durch Verpaarung von *mgl-2*^{flox/flox} mit *Vil*^{Cre/+} Mäusen und anschließender Genotypisierung auf flox und Cre erzeugt (F1 Generation; siehe Abbildung 55 A). Zur Etablierung flox homozygoter Tiere mit *Vil*-Cre (*mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{Cre/+}) wurden in einem weiteren Schritt Tiere der F1 Generation miteinander gekreuzt und der Genotyp der Nachkommenschaft (F2 Generation) durch PCR von genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien bestimmt. Die in Abbildung 55 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass 14% (1/7) der Tiere den Genotyp homozygot flox mit Villin-Cre (*mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{Cre/+}) aufweisen. Im Gegensatz dazu hatten 57% (4/7) der Nachkommenschaft den Genotyp *mgl-2*^{flox/+} *Vil*^{Cre/+} und 29% (2/7) der Tiere einen *mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{+/+} Hintergrund. Um den prozentualen Anteil von Mäusen mit dem gewünschten Genotyp *mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{Cre/+} in der Nachkommenschaft zu erhöhen, wurden Mäuse dieses Genotyps für alle weiteren Kreuzungen miteinander verpaart. Die in Abbildung 55 C aufgeführte Genotypisierung der Nachkommenschaft (F3 Generation) zeigt, dass 71% (5/7) der Mäuse den für den *mgl-2* *Knockout* relevanten Genotyp homozygot flox aufwiesen und Cre-positiv waren (*mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{Cre/+}; *mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{Cre/Cre}). 29% (2/7) der Nachkommenschaft war dagegen homozygot für flox (*mgl-2*^{flox/flox}). Die Untersuchung der generierten transgenen Mäuse *mgl-2*^{flox/flox} *Vil*^{Cre/+} ergab, dass diese keine Anomalien im Verhalten oder im Phänotyp aufwiesen.

Nachfolgend wurden weitere Verpaarungen der Tiere vorgenommen. Die Analyse des Genotyps ergab, dass alle Nachkommen weitgehend in Übereinstimmung mit den zu erwartenden Mendelverhältnissen geboren wurden.

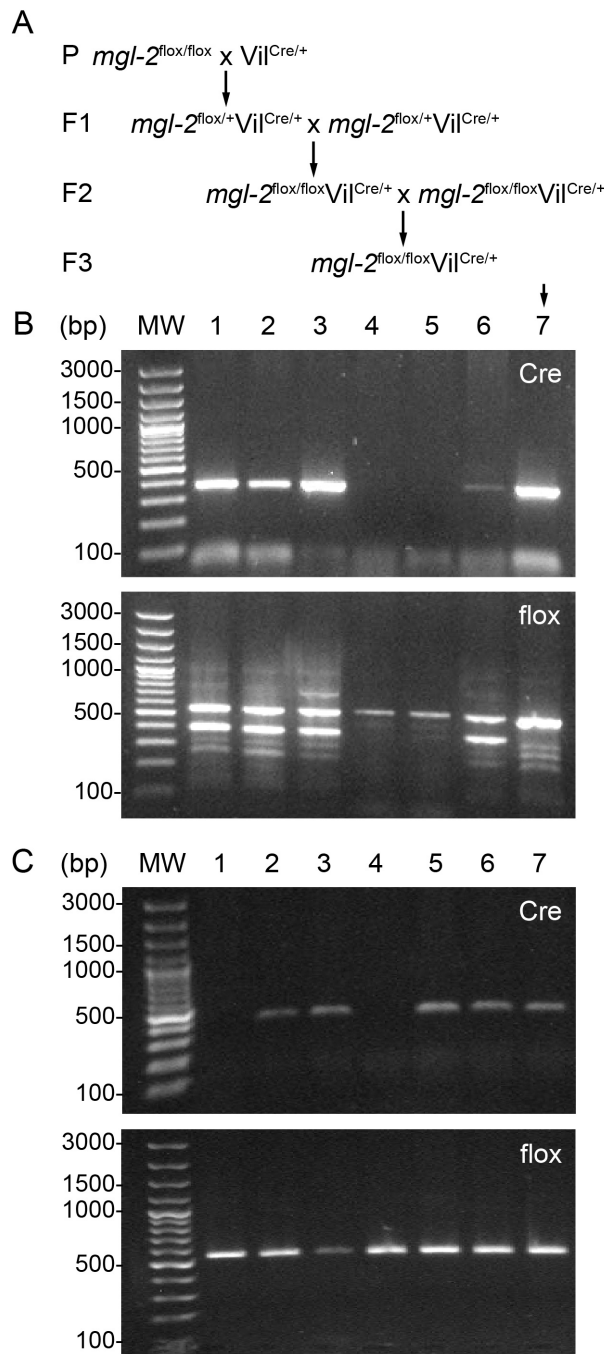


Abbildung 55. Generierung einer transgenen $mgl-2^{flox/flox}$ $Vil^{Cre/+}$ Mauslinie. (A) Kreuzungsschema zur Generierung von $mgl-2^{flox/flox}$ $Vil^{Cre/+}$ Mäusen. Zur Erzeugung einer darmspezifischen und zeitlich kontrollierbaren $mgl-2$ Knockout Mauslinie wurden flox homozygote Mäuse ($mgl-2^{flox/flox}$) in Vorarbeiten mit $Vil^{Cre/+}$ Tieren verpaart, welche ein Tamoxifen-induzierbares Cre-ER^{T2} Fusionsprotein unter Kontrolle des Villin-Promotors exprimieren. Flox heterozygote Mäuse der F1 Generation ($mgl-2^{flox/+}$ $Vil^{Cre/+}$) wurden miteinander gekreuzt und die daraus erhaltene F2 Generation zur Identifizierung homozygoter Tiere ($mgl-2^{flox/flox}$ $Vil^{Cre/+}$) anhand einer PCR-Analyse von isolierter genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien genotypisiert. Zur Weiterführung der $mgl-2^{flox/flox}$ $Vil^{Cre/+}$ Mauslinie wurden nur Mäuse dieses Genotyps miteinander verpaart und die Nachkommenschaft genotypisiert (F3 Generation). (B) Genotypisierung der F2 Generation. (C) Genotypisierung der F3 Generation.

3.4.2.2 Analyse von $mgl-2^{\text{flox/flox}}$ $Vil^{\text{Cre/+}}$ Mäusen nach konditionaler Deletion von $mgl-2$ im Darmepithel

3.4.2.2.1 Phänotypische Analyse

Zur Identifizierung der Funktion und Rolle von $mgl-2$ im Darmepithelgewebe der Maus wurden für die Studien- ($mgl-2^{\text{flox/flox}}$ $Vil^{\text{Cre/+}}$) und Kontrollgruppe ($mgl-2^{\text{flox/flox}}$) jeweils fünf 6-8 Wochen alte Mäuse verwendet. In 5 aufeinander folgenden Tagen wurde den Tieren zur Induktion der konditionalen Deletion von $mgl-2$ jeweils 1 mg Tamoxifen intraperitoneal (i.p.) injiziert und Körpergewicht, Befindlichkeit und Fellbeschaffenheit der Tiere kontinuierlich überwacht. Gendeletierte $mgl-2^{-/-}$ $Vil^{\text{Cre/+}}$ Mäuse entwickelten sich normal und zeigten im Vergleich zur $mgl-2^{\text{flox/flox}}$ Kontrollgruppe bis zu 5 Wochen nach der Injektion keine signifikanten phänotypischen Unterschiede. Auch das Körpergewicht von Tieren beider Studiengruppen wies in demselben Zeitraum keine gravierenden Abweichungen voneinander auf (Abbildung 56).

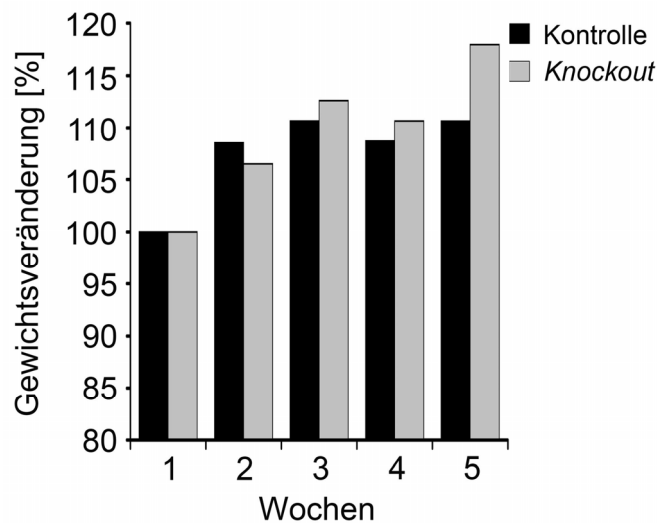


Abbildung 56. Veränderung des Körpergewichtes von $mgl-2^{-/-}$ $Vil^{\text{Cre/+}}$ *Knockout* und $mgl-2^{\text{flox/flox}}$ Mäusen. $mgl-2^{\text{flox/flox}}$ $Vil^{\text{Cre/+}}$ und $mgl-2^{\text{flox/flox}}$ Mäuse wurden in Gruppen zu je 5 Tieren eingeteilt und zur Aktivierung des Cre-ER^{T2} Fusionsproteins in 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 1 mg Tamoxifen i.p. injiziert. Die Veränderung des Körpergewichtes der Tiere wurde kontinuierlich bis zu einem Zeitraum von 5 Wochen nach der Injektion überwacht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente.

3.4.2.2.2 Anatomische Analyse

In einem weiteren Schritt wurden $mgl-2^{-/-}$ $Vil^{Cre/+}$ *Knockout*-Mäuse im Bezug auf anatomische Abweichungen mit der $mgl-2^{flox/flox}$ Kontrollgruppe verglichen. Die Tiere wurden getötet, seziiert und die Organe beider Gruppen untersucht. Analyse und Vergleich von Leber, Niere, Milz und Lungen beider Mausgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt). Der GI-Trakt von Tieren mit konditionaler Deletion von $mgl-2$ wies ebenfalls keine Anomalien im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 57 dargestellt.

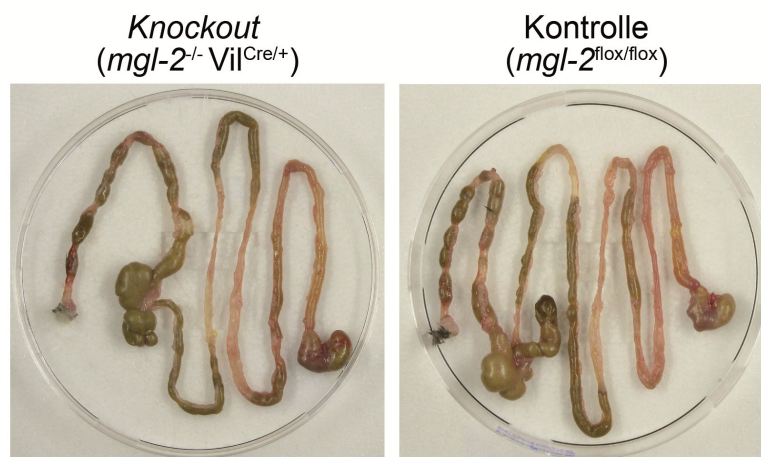


Abbildung 57. Anatomische Analyse des Gastrointestinaltrakts von $mgl-2^{-/-}$ $Vil^{Cre/+}$ *Knockout*- und $mgl-2^{flox/flox}$ Kontrollmäusen. Der Vergleich des Magen-Darmtrakts von Mäusen mit konditionaler $mgl-2$ Deletion mit Mäusen der Kontrollgruppe offenbarte keine Unterschiede. *Knockout*- und Kontrollmäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und anschließend seziiert. Da das $mgl-2$ Gen der *Knockout*-Mäuse darmspezifisch deletiert ist, wurde die Anatomie des Gastrointestinaltrakts von Tieren dieser Gruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen, um Aufschluss über die Rolle und Funktion von $mgl-2$ im Epithelgewebe des Magen-Darm Systems zu erhalten.

3.4.2.3 Verifizierung der konditionalen Deletion von *mgl-2* mittels organspezifischer DNA

Um die Cre-ER^{T2}-vermittelte *mgl-2* Exzision im Darmgewebe zu verifizieren, wurden die Tiere 8 Wochen *post injectionem* getötet und Teile des Darms (*Jejunum*, *Ileum*) sowie die Milz entfernt. Genomische DNA wurde durch Verdau von 20 µg Gewebe mit Proteinase K und anschließender Aufreinigung gewonnen. Zur Identifizierung des Cre-ER^{T2} Transgens, des *mgl-2*^{flox/flox} Allels sowie der Rekombination des geflochtenen *mgl-2* Zielgens wurden die Proben einer PCR-Analyse mit Cre-spezifischen Primern sowie mit den Primern A, B und C unterzogen (siehe Abbildung 52). Die Cre-ER^{T2}-vermittelte Rekombination des geflochtenen Allels führt durch Exzision der Exons 2, 3 und 4 zu einer Teildeletion und damit zu einer Verkürzung des *mgl-2* Gens. Unter Verwendung der Primerpaare A und C ergibt sich daher ein PCR-Produkt mit einer Fragmentlänge von 670 bp (nicht-deletiertes *mgl-2* Gen: 2800 bp, Abbildung 52 B, C).

Die in Abbildung 58 A dargestellten Daten von Tamoxifen-injizierten, Cre-positiven *Knock-out*-Tieren zeigen – außer in der Milz – die spezifische Exzision des geflochtenen Zielgens in den getesteten Darmabschnitten *Ileum* und *Jejunum*. Im Gegensatz dazu konnte in Organen von Kontrolltieren erwartungsgemäß weder das Cre-ER^{T2} Transgen noch eine Rekombination des geflochtenen Gens nachgewiesen werden (Abbildung 58 B). Ebenso wurden in den Versuchstieren während dieser Versuche keine signifikanten unerwünschten Wirkungen durch die Tamoxifen-Behandlung beobachtet. Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Studien, die eine geringe akute Toxizität von Tamoxifen belegen und zeigen, dass der Wirkstoff keine schweren Anomalien in Mäusen hervorruft (Wodarz und Näthke, 2007).

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass die ligandenaktivierte Cre-ER^{T2}-vermittelte Deletion des *mgl-2* Gens gewebespezifisch ist und nur im Darm und nicht in anderen Organen der Mäuse wie beispielsweise der Milz auftritt.

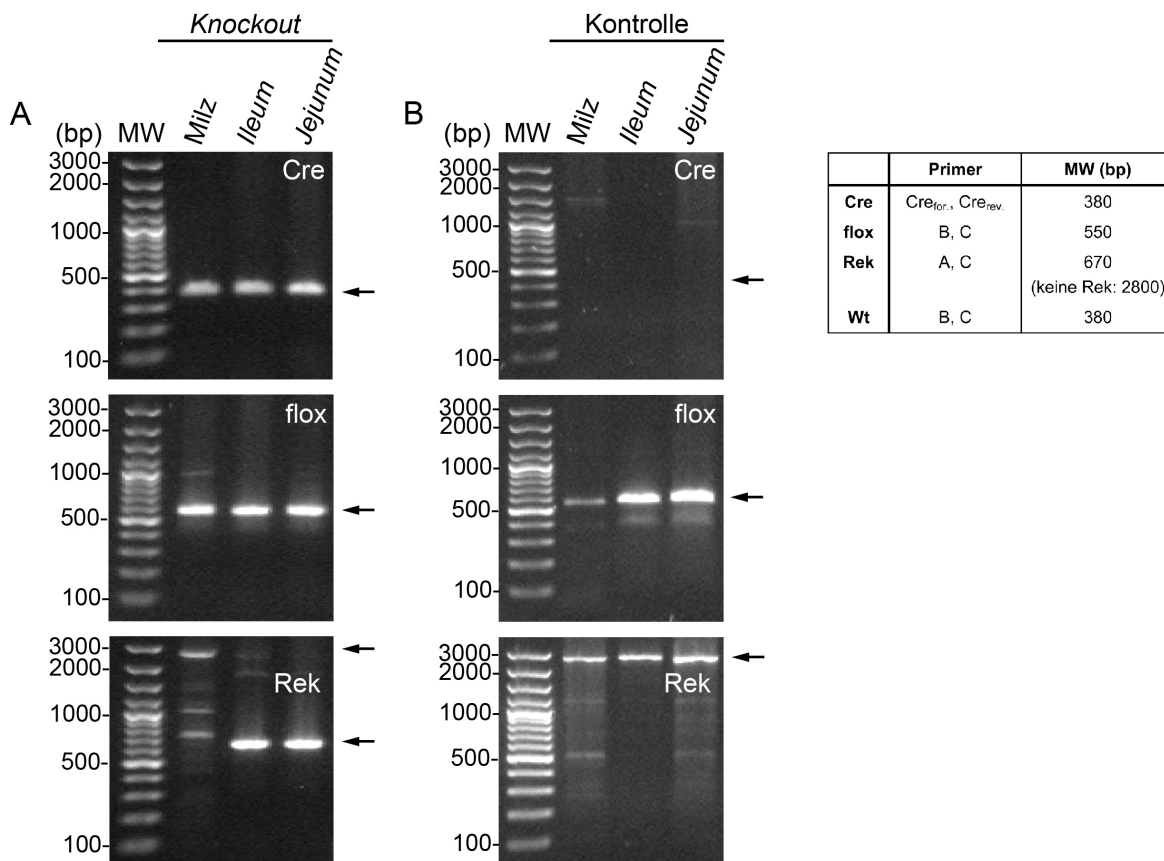


Abbildung 58. PCR Detektion der Cre-ER^{T2}-vermittelten Exzision von *mgl-2* im Maudarm. Die Tamoxifen-induzierte Deletion von *mgl-2* durch Cre-ER^{T2} in *mgl-2*^{lox/lox} Vil^{Cre/+} Mäusen ist darmspezifisch. (A) *mgl-2*^{-/-} Vil^{Cre/+} Mäuse. (B) *mgl-2*^{lox/lox} Mäuse. Tiere beider Versuchsgruppen wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 1 mg Tamoxifen i.p. injiziert und nach 8 Wochen durch zervikale Dislokation getötet. Für die PCR-Analyse wurde genomische DNA aus Teilen des Darms (*Ileum*, *Jejunum*) und der Milz isoliert. Zur Identifizierung des Cre-Transgens (Fragmentgröße 380 bp) wurden Cre-spezifische Primer verwendet und für flox die Primerpaare B und C (flox homozygot: 550 bp). Die Cre-vermittelte Rekombination des geflochten *mgl-2* Gens wurde mit den Primern A und C anhand der unterschiedlichen Fragmentgrößen nachgewiesen. Die Rekombination des *mgl-2* Gens resultiert in einer Deletion der Exons 2, 3 und 4 und somit in einer Verkürzung des von Primern A und C amplifizierte Genabschnittes von 2800 bp (nicht-deletiertes *mgl-2* Gen) auf 670 bp (Rekombination; Rek). Zur besseren Übersicht sind die verwendeten Primerpaare und die Größen der amplifizierte Fragmente in einer Tabelle dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Relevanz von Hugl-1 für die Zellpolarität und -morphologie von T-Lymphozyten

In früheren Publikationen wurde gezeigt, dass Mutationen in den *Drosophila* Genen *scribble*, *dlg* und *lgl* Veränderungen der Zellform und des Zellverhaltens nach sich ziehen und darüber hinaus mit der Dynamik des F-Aktinzytoskeletts in Zusammenhang stehen (Gateff, 1978, Woodhouse *et al.*, 1998, Bilder und Perrimon, 2000, Humbert *et al.*, 2008). Studien an *Drosophila* und Humanzellen wiesen zudem nach, dass Lgl/Hugl mit dem Nicht-Muskel Myosin, Myosin II, einem zytoskelettbindenen Protein, interagiert (Strand *et al.*, 1994a; Strand *et al.*, 1995; Betschinger *et al.*, 2005). Die Interaktion beider Proteine indiziert, dass Lgl die Zellpolarität möglicherweise über das Aktin/Myosin Zytoskelett steuert (Klezovitch *et al.*, 2004). Der Einfluss von Lgl auf die Veränderungen der Zellmorphologie sowie auf die anterior-posteriore Zellpolarität von T-Lymphozyten, die maßgeblich über die Kontraktilität des F-Aktins vermittelt werden, ist bislang unbekannt. Daher wurde an einer Jurkat-16 ALL Tumorzelllinie sowie an primären, aus Humanblut isolierten T-Zellen als zwei unterschiedlichen Systemen untersucht, wie die Tumorsuppressor- und Polaritätsproteine Hugl-1 und Hugl-2 den Erhalt und die Modulation der T-Zellpolarität beeinflussen.

Expressionsanalysen in dieser Arbeit zeigten, dass die ALL Tumorzelllinie Jurkat-16, wie auch primäre T-Lymphozyten das Hugl-1 Transkript und Protein exprimieren, während Hugl-2 kaum nachweisbar war. Die durchgeführten funktionalen Experimente zur Analyse der Zellpolarisation mittels stimulatorischer Antikörper oder Chemokine offenbarten zudem keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Zelllinien bezüglich der F-Aktinpolymerisation.

T-Zell Aktinfilamente kontrollieren die Zellmorphologie und -plastizität, sind entscheidend für die Motilität der Zellen und durchlaufen während der zellulären Aktivierung durch Chemokine und CD3/TCR-Agonisten dynamische Polymerisierungsprozesse (Vicente-Manzanares und Sánchez-Madrid, 2004; Billadeau *et al.*, 2007). In Jurkat-16 wie auch in primären T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass eine RNAi-vermittelte Suppression von Hugl-1 die CD3/TCR- oder CXCR4/CCR7-vermittelte Polymerisierung des F-Aktins sowie die daraus resultierende T-Zellpolarität und -morphologie auf signifikante Weise stört. Diese T-Zellen wiesen einen bedeutenden Verlust der Lamellipodien- und Uropodausbildung

auf. Indizien aus durchflusszytometrischen Analysen Phalloidin-488-gefärbter T-Zellen, welche mit Hugl-1- oder Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, stützten diese Ergebnisse. Der Verlust des Hugl-1 Polaritätsproteins führte in diesen Versuchen zu einem geringeren Anstieg der F-Aktinspiegel. Defekte in der Organisation des polarisierten F-Aktinzytoskeletts in *lgl* Mutanten wurden zuvor auch in *Drosophila* und in Hefe beobachtet (Bilder *et al.*, 2000; Kagami *et al.*, 1998). An Neuroepithelzellen von *lgl-1 Knockout*-Mäusen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die polarisierte Lokalisation von F-Aktin gestört ist (Klezovitch *et al.*, 2004). Lgl bildet zusammen mit Scribble und Dlg eine funktionelle Einheit, den Scribble-Polaritätskomplex. Eine RNAi-vermittelte Reduktion der Scribble-Expression in murinen MD45 T-Zellen wie auch eine Blockade von Dlg-4 führte analog zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Uropod Ausbildung (Ludford-Menting *et al.*, 2005). Zudem zeigten humane T-Zellen mit einer verminderten Expression von Dlg-1 eine Beeinträchtigung der antigen-induzierten Aktinpolymerisation und T-Zellfunktion (Round *et al.*, 2005). Die vorliegenden Befunde sind konsistent mit den zuvor in dieser Arbeit präsentierten Daten und legen nahe, dass Hugl-1 ein wichtiger Regulator der F-Aktin-vermittelten T-Zellpolarität und -morphologie sein könnte.

Die Störung des F-Aktinzytoskeletts und der Verlust der Zellpolarität trat in Hugl-1-supprimierten Jurkat-16 sowie in primären T-Zellen auf, die jeweils über zwei voneinander unabhängige Signalwege, den CD3/TCR- und den G-Protein-gekoppelten CXCR4/CCR7-vermittelten Weg, stimuliert worden waren. Dies unterstützt die Annahme, dass der Verlust von Hugl-1 in beiden Signalwegen möglicherweise den gleichen Defekt in der Aktinpolymerisation hervorruft. Hugl-1 interagiert daher möglicherweise *downstream* des CXCR4/CCR7- und TCR/CD3-Rezeptors auf Ebene des F-Aktins und nicht innerhalb der Signalkaskade. Zusammengenommen sind die gewonnenen Ergebnisse erste Indizien dafür, dass Hugl-1 für die Polymerisation des zellulären F-Aktins in T-Zellen und für den Erhalt der Zellpolarität benötigt wird.

Für die Ausbildung stabiler Konjugate zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle ist ein Kontakt des T-Zellrezeptors mit einem passenden Peptid-MHC-Komplex erforderlich. Neben einer Reihe von Prozessen kommt es zur Aktivierung und Rekrutierung von Integrinrezeptoren, die die Adhäsion der T-Zelle an die APC vermitteln. Diese Rekrutierung wird möglicherweise durch das Aktinzytoskelett reguliert (Billadeau *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen, dass Hugl-1 für die CD3/TCR-induzierte Rekrutierung von

Integrinen in Jurkat-16 T-Zellen erforderlich ist und dass ein Verlust des Polaritätsregulators die Adhäsionsfähigkeit der Zelle an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin reduziert. Übereinstimmend konnte in der Literatur gezeigt werden, dass die Bildung von Konjugaten sowie die Bindung von T-Zellen an extrazelluläre Matrix durch eine Störung des F-Aktins verhindert wurde (Rivas *et al.*, 2004; Koopman *et al.*, 1992). Nolz *et al.* untersuchten Jurkat-16 Zellen, die mit shRNA gegen WAVE2, einem Mediator der Rac-1-induzierten *de novo* Aktinpolymerisation, transfiziert worden waren. Sie fanden, dass die Zellen als Antwort auf eine Stimulation des CD3/TCR eine defekte Reorganisation des Aktinzytoskeletts und eine verminderte Integrin-vermittelte Adhäsion aufwiesen (Nolz *et al.*, 2006). Scribble-supprimierte MD45 CD8⁺ Maus T-Zellen zeigten zudem einen auffallenden Defekt in der Fähigkeit, stabile Konjugate mit anti-CD3- und anti-CD28-beschichteten Beads auszubilden (Ludford-Menting *et al.*, 2005). Es ist daher möglich, dass Hugl-1 als Kortex- bzw. Aktin-assoziiertes Polaritätsprotein die Integrin-vermittelte Adhäsion über eine Beeinflussung der F-Aktinpolymerisation reguliert. Weitere Studien werden notwendig sein, um den Mechanismus zu bestimmen, über welchen Hugl-1 die Integrin-vermittelte Adhäsion von T-Zellen beeinflusst.

Treibende Kraft für die Polarisierung und Migration von T-Zellen ist die dynamische Reorganisation von Elementen des Aktinzytoskeletts (Krummel und Macara, 2006; Hall, 2009). In der Front migrierender T-Zellen sind Integrine angereichert, die das F-Aktin mit dem Untergrund verbinden (Gomez und Billadeau, 2008). Aus diesem Grund wurde weiter analysiert, wie Hugl-1 die migratorische Polarität von Jurkat-16 T-Zellen im Chemokin-Gradienten beeinflusst. Ludford-Menting *et al.* untersuchten den Einfluss des Polaritätsproteins Scribble auf die nicht-gerichtete Migration von murinen MD45 CD8⁺ T-Zellen und fanden eine substantielle Verringerung der Migrationsdistanz in Scribble-inhibierten Zellen (Ludford-Menting *et al.*, 2005). In dieser Arbeit durchgeführte Migrationsanalysen wurden in einem Zwei-Kammer System mit Chemokin-Gradienten durchgeführt und zeigten, dass Hugl-1 notwendig für die Migration von T-Zellen ist. Zusammengenommen deuten die Befunde darauf hin, dass Hugl-1 neben der Modulation der F-Aktinpolymerisation möglicherweise die Rekrutierung und asymmetrische Verteilung von Oberflächenproteinen wie den Integrinen positiv beeinflusst und auf diese Weise unmittelbaren Einfluss auf die T-Zellmigration ausübt.

4.2 Hvgl-1 in der mDC-induzierten Polarisierung und Motilität CD4-positiver T-Lymphozyten

Um eine Immunantwort auszulösen ist es erforderlich, dass naive T-Zellen auf Antigen-präsentierende DCs treffen, an diese binden und durch präsentierte Antigene, Zytokine, Chemokine und kostimulatorischer Moleküle stimuliert werden (Kaiser *et al.*, 2005; Banchereau und Steinman, 1998). Motilität und Migration der T-Zellen sind in diesem Prozess von großer Bedeutung, da diese über die Wahrscheinlichkeit einer DC:T-Zell-Bindung bestimmen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien demonstrieren, dass Hvgl-1 wichtig ist für die durch mDCs induzierte Zellpolarisierung und Zellmotilität in autologen, naiven CD4⁺ T-Zellen. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Analysen an CD4⁺ T-Lymphozyten alleine waren Hvgl-1-supprimierte und mit mDCs kokubierte Zellen nur geringfügig weniger polarisiert als Kontrollzellen. Die Migrationsgeschwindigkeit Hvgl-1-supprimierter Zellen auf mDCs zeigte des Weiteren keinen Unterschied zur Kontrolle. Eine genauere Betrachtung der Fraktion der nicht-polarisierten T-Zellen aus diesen Versuchen, welche durch eine ungerichtete Motilität und minimale Veränderung der Zellmorphologie charakterisiert war, offenbarte jedoch, dass der Verlust von Hvgl-1 verstärkt zu einem Phänotypen mit einer atypischen Zellmorphologie führte. Dieser zeichnete sich durch eine geringe ungerichtete Motilität und eine nicht zielgerichtete Zellpolarisierung aus.

Real *et al.* überexprimierten dominant-negative aPKCs in CD4⁺ T-Zellen und bestimmten den Effekt auf Zellmorphologie, -motilität sowie auf das Abtastverhalten der mit mDCs interagierenden T-Zellen (Real *et al.*, 2007). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigten die Zellen eine gehemmte Polarisierung, wiesen aber im Gegensatz eine messbare Verringerung der Motilität und der mittleren Zellgeschwindigkeit auf. Bei den hier gemachten Beobachtungen zeigte sich der Effekt des Hvgl-1-Verlustes erst bei der Betrachtung der nicht-polarisierten T-Zellen. Die eingangs erwähnte atypische Morphologie dieser Zellen bestand in einem Übergangszustand zwischen einem vollständig runden, nicht-polarisierten und einem vollständig polarisiertem Phänotypen. Zusammengefasst sind die durch diese Studie gewonnenen Erkenntnisse überwiegend konsistent mit den zuvor durchgeführten Experimenten, wonach Hvgl-1 die T-Zellpolarisierung und die Migration von T-Zellen im Chemokingradienten oder auf mDCs begünstigt. Der Verlust der Hvgl-1-vermittelten Zellpolarität führt demzufolge möglicherweise zu einer Beeinträchtigung des T-Zellabtastverhaltens. Weiterhin weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Hvgl-1 eine wichti-

ge Rolle in der adaptiven Immunantwort spielen könnte, da die Erkennung der von mDCs präsentierten Antigene eine hohe T-Zellmotilität und -abtastfrequenz erfordert.

4.3 Funktionalität der shRNA-Expressionskonstrukte gegen Hugi-1 und Hugi-2

Um die biologische Bedeutung der Polaritäts- und Tumorsuppressorproteine Hugi-1 und Hugi-2 für die epitheliale Zellpolarität untersuchen und systematisch analysieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit vektorbasierte shRNA-Expressionssysteme etabliert. Diese supprimieren die Genexpression beider Hugi Homologe in stabil transfizierten HEK293 Epithelzellen gezielt und effizient durch RNA-Interferenz. shRNAs haben im Vergleich zu transient wirkenden siRNAs den Vorteil, dass in stabilen, shRNA exprimierenden Zelllinien eine Langzeitsuppression bestimmter Gene erreicht werden kann. Ein weiterer Vorteil der Methode besteht in der bis zu 250 fach effektiveren *in vivo* Suppression des Zielgens sowie in verringerten *off-target* Effekten, die aus geringer einzusetzenden Konzentrationen resultieren (McAnuff *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2009). So wurden in dieser Arbeit stabile *loss-of-function* Phänotypen generiert, die in funktionellen Studien Aufschluss über die jeweilige Genfunktion ermöglichen. Es wurden zwei unterschiedliche Expressionssysteme kloniert, pSuper-Hugi-1 und pSuper-Hugi-2, welche die Expression von Hugi-1 oder Hugi-2 spezifisch supprimieren. Für jedes der Zielgene wurden vier unterschiedliche, 19-Nukleotide (nt) lange genspezifische Zielstrukturen auf der korrespondierenden mRNA ausgewählt. Ein Paar komplementärer 64-nt DNA-Oligonukleotide wurden für jede Zielsequenz miteinander hybridisiert und zwischen die *BglIII* und *HindIII* Schnittstellen des pSuper Vektors inseriert. Jedes genspezifische Insert steht für eine 19-nt Sequenz, die vom Zieltranskript abgeleitet und durch eine kurze Spacer-Sequenz vom umgekehrten Komplement derselben 19-nt Sequenz getrennt ist. Nach Einklonieren der genspezifischen Inserts und anschließender Transformation konnten im Rahmen dieser Arbeit für jedes Zielgen vier unterschiedliche shRNA-Expressionsvektoren identifiziert werden, welche die gewünschten Sequenzen trugen. Die anschließende Gensequenzierung nach Sanger ergab, dass ein Teil der Konstrukte entweder eine Basendeletion in der Schleifenregion oder eine Punktmutation im *Target Sense* Strang aufwies. Brummelkamp *et al.* zeigten jedoch, dass selbst der Verlust zweier Basen in der Schleifenregion eine gute Suppression der Zielgenexpression ermöglicht (Brummelkamp *et al.*, 2002). Des Weiteren treten die Punktmutationen nicht auf dem *antisense* Strang des shRNA Konstruktes auf. Zusammengefasst wiesen HEK293 Epithelzellen, die mit den generierten shRNA Expressions-

konstrukten transient transfiziert worden waren, eine spezifische Hemmung der endogenen Hvgl-1 oder Hvgl-2 Proteinexpression auf und belegen daher die Aktivität der Konstrukte sowie deren Eignung für die Etablierung stabiler Zelllinien.

4.4 Effekt von Hvgl-1 und Hvgl-2 auf das migratorische und metastatische Potenzial von Epithelzellen

Die humanen Homologe des Lgl Tumorsuppressor- und Polaritätsproteins aus *Drosophila melanogaster*, Hvgl-1 und Hvgl-2, stehen seit längerer Zeit im Verdacht, mit der Genese von Tumoren in Verbindung zu stehen. Die funktionalen Zusammenhänge, wie Hvgl-1 und Hvgl-2 diesen Einfluss ausüben, sind jedoch weitgehend unbekannt. Um die Bedeutung dieser Proteine im Prozess der Tumorentstehung und in der Regulation der Zellpolarität in HEK293 Epithelzellen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit stabile HEK293 Zelllinien generiert, die shRNA gegen Hvgl-1 und/oder Hvgl-2 exprimierten, und umfassende *loss-of-function* Analysen durchgeführt. Dabei wurde ein Hauptaugenmerk auf die Veränderung des migratorischen und metastatischen Verhaltens der Zellen gelegt. Die Daten aus dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Hvgl-1 und Hvgl-2 den epithelialen Zellverband sowie die Zell-Zell Kontakte in der 2D-Zellkultur stabilisieren und den Phänotyp der Zellen aufrecht erhalten. Der Verlust einzelner Homologe begünstigt dagegen die Dissemination vereinzelter Zellen vom Hauptverband und die Annahme eines polarisierten migrativen, mesenchymalen Phänotyps. Diese Effekte waren bei einem gleichzeitigen Verlust von Hvgl-1 und Hvgl-2 zusätzlich verstärkt. Weitere Hinweise aus dieser Arbeit stützen diese Befunde. Hvgl-depletierte Zellsphäroide in einem 3D Zellkultursystem bildeten abnormale Zellaggregate mit deutlichen Ausstülpungen in die umgebende extrazelluläre Matrix. Der gleichzeitige Verlust von Hvgl-1 und Hvgl-2 führte hingegen zu einer signifikanten Zunahme der Aggregate mit abnormaler Zellmorphologie sowie zu Ausstülpungen, welche in die umgebende Matrix invadierten. Diese Ergebnisse sind neu und zeigen zusammenfassend, dass der Verlust nur eines der beiden Homologe möglicherweise durch das Vorhandensein des jeweils anderen Homologen funktionell kompensiert wird und dass die gleichzeitige Depletion im 2D- und 3D-Zellkultursystem verstärkt einen metastatischen Phänotyp induziert. Des Weiteren legen die Daten nahe, dass der Verlust von Hvgl-1 und Hvgl-2 in umgekehrter Weise mit der Differentiation und Metastasierung der Zellen gekoppelt ist und möglicherweise zur malignen Tumorprogression beiträgt.

Die Schwächung des Zellverbandes Hvgl-supprimierter Zellen und die damit begünstigte Zunahme des migratorischen und metastatischen Potenzials konnte anhand der Expression von E-Cadherin gezeigt werden. Als ein *Adherens Junction* Protein und epithelialer Marker ist E-Cadherin unter anderem für den Erhalt stabiler Zell-Zellverbindungen verantwortlich und kontrolliert zusammen mit anderen *Adherens* oder *Tight Junction* Proteinen die Abtrennung der Plasmamembran in funktional unterschiedliche apikale und basolaterale Domänen (Etienne-Manneville, 2008). Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass die Expression von E-Cadherin in der intrazellulären Region bei RNAi-vermittelter Suppression von Hvgl-1 oder Hvgl-2 reduziert ist. Der gleichzeitige Hvgl-1 und Hvgl-2 Verlust führte demgegenüber nochmals zu einer signifikant inhibierten E-Cadherin Expression. Die Daten sind damit konsistent mit Studien an epithelialen Madin-Darby Nierenzellen des Hundes (*Madin-Darby Canine Kidney*, MDCK), wonach die zellmembranäre Akkumulation von E-Cadherin bei gleichzeitiger Suppression von mLgl-1 und mLgl-2 unterdrückt ist (Yamanaka *et al.*, 2006). Die Überexpression von Hvgl-1 und Hvgl-2 führte zu einer gesteigerten Expression von E-Cadherin in Hvgl-1-exprimierten Melanomzellen sowie in HEK293 Zellen (Kuphal *et al.*, 2006; Spaderna *et al.*, 2008; Kashyap, 2008). Im Umkehrschluss impliziert dies eine Verringerung der E-Cadherin Expression in Hvgl-1 und/oder Hvgl-2-supprimierten Zellen. Es scheint daher, dass Hvgl-1 und Hvgl-2 in der Regulation und Lokalisation von E-Cadherin involviert sind und dass reduzierte Hvgl-1 und Hvgl-2 Proteinspiegel zur verringerten Expression von E-Cadherin und damit zur Erhöhung des metastatischen Potenzials der Zellen beitragen. Der genaue mechanistische Zusammenhang von Hvgl Tumorsuppressorproteinen, E-Cadherin Expression und Metastasierungspotenzial von Epithelzellen erfordert in Zukunft allerdings weitere Untersuchungen.

Die Umwandlung der apiko-basalen Polarität von Epithelzellen hin zu invasiven mesenchymalen Zellen ist neben dem Verlust des Zell-Zell Bindeproteins E-Cadherin ein besonderes Merkmal für einen Epithelial-Mesenchymalen Übergang. Der mesenchymale Zelltypus ist unter anderem durch eine Zunahme der zellulären Migration charakterisiert und steht daher im Zusammenhang mit der Invasion von Zellen in umliegendes Gewebe. Der Einfluss beider Hvgl Homologe auf die polarisierte Zellmigration von Epithelzellen wurde in der Literatur bislang kaum untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die humanen epithelialen Polaritätsregulatoren und Tumorsuppressoren Hvgl-1 und Hvgl-2 essenziell für die Kontrolle der Zellmigration sind. Die Repression von Hvgl-1 oder Hvgl-2 resultierte in einer signifikanten Zunahme der Zellmigration, der gleichzeitige Verlust führte dagegen zu

keiner additiven oder synergistischen Zunahme. Andere Arbeiten zeigten übereinstimmend, dass die Motilität von HEK293 Zellen in umgekehrter Weise durch die Induktion des Hvgl-1 Proteins vermindert wird (Schimanski *et al.*, 2005; Kuphal *et al.*, 2006). Des Weiteren erwies sich Hvgl-2 als starker Suppressor der Snail-induzierten Zellmigration (Kashyap, 2008). Der Verlust von Hvgl-1 und Hvgl-2 in Epithelzellen könnte daher die Tumorprogression und -invasion begünstigen.

Um aufzuklären, wie Polaritätsproteine die Invasion von Tumorzellen *in vivo* steuern, wurden Tumorigenizitätsstudien im Maus Xenograft Modell durchgeführt. *In vivo* Systeme bieten eine Reihe von Vorteilen, da hier – anders als *in vitro* – komplexe Interaktionen mit multiplen Zelltypen und gewebespezifischen Zytokin- oder ECM-Zusammensetzungen möglich sind (Dow und Humbert, 2007). In den durchgeführten Versuchen waren die Tumore aus Hvgl-1-supprimierten Epithelzellen nicht größer als diejenigen von Kontrollzellen, bildeten jedoch verstärkt Sekundärtumore und zeichneten sich zudem durch eine veränderte Tumormorphologie aus. Ebenso wuchsen diese stärker in das umliegende Gewebe ein. Eine abschließende Bewertung der Tumorigenizität von Hvgl-2-supprimierten HEK293 Epithelzellen oder Zellen, mit gleichzeitiger Hvgl-1 und Hvgl-2 Suppression steht noch aus und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Basierend auf den erhaltenen Daten aus dem 2D- oder 3D-Zellkultursystem kann darüber spekuliert werden, dass Zellen mit vollständigem Verlust von Hvgl-1 und Hvgl-2 möglicherweise invasivere Tumore mit Fernmetastasen ausbilden könnten. Datenbankrecherchen wie auch bioinformatische Analysen könnten in diesem Punkt zur Klärung beitragen. Zusammengefasst liefern die Ergebnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Studien an HEK293 Epithelzellen Hinweise darauf, dass verminderte Expressionsspiegel der Polaritätsregulatoren Hvgl-1 und Hvgl-2 eine signifikante Rolle in der Vermittlung metastatischer und tumorigener Eigenschaften von Epithelzellen spielen. Die Versuche demonstrierten, dass beide Homologe unabhängig voneinander den gleichen Anteil an dem Geschehen zu tragen scheinen, während der gleichzeitige Verlust der Polaritätsproteine möglicherweise eine deutlich stärkere Reaktion hervorruft als der Verlust von einem der beiden Proteine. Dies konnte gezeigt werden durch Beeinträchtigung der Zellpolarität und -morphologie in der 2D- und 3D-Zellkultur, reduzierte Expression des epithelialen Markers E-Cadherin, Steigerung des migratorischen und metastatischen Potenzials und Zunahme von Sekundärtumoren in *in vivo* Xenograft Experimenten.

4.5 Effekte von Hugel-1 und Hugel-2 auf den Zellzyklus

Humane Tumore weisen häufig Störungen in der Regulation des Zellzyklusses auf. Es wurde daher untersucht, inwiefern der Zellzyklus von HEK293 Epithelzellen sowie die damit in Zusammenhang stehende Zellproliferation durch den Verlust der Tumorsuppressorproteine Hugel-1 und Hugel-2 beeinflusst werden. Bilder *et al.* zeigten erstmals an Epithelzellen von *Drosophila*, dass die Tumorsuppressorgene *lgl*, *scribble* und *dlg* einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation ausüben (Bilder *et al.*, 2000). Des Weiteren wiesen *scribble* oder *lgl* mutante Klone im sich entwickelnden Auge von *Drosophila* eine gesteigerte Expression des für den G1-S Phasenübergang notwendigen Zellzyklusregulators Cyclin E auf sowie eine ektopische Zellproliferation (Brumby und Richardson, 2005; Grzeschik *et al.*, 2007). Während belegt ist, dass in Säugern eine Überexpression der Polaritätsproteine Dlg und Scribble den Übergang von der G1 zur S-Phase des Zellzyklusses sowie die Zellproliferation unterdrückt (Hanada *et al.*, 2000; Ishidate *et al.*, 2000; Nagasaka *et al.*, 2006), ist die Rolle von Hugel-1 und Hugel-2 in diesem Prozess bislang kaum untersucht. An neuronalen Vorläuferzellen von *lgl-1^{-/-}* Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Defekte im Zellzyklusausgang und Zelldifferenzierung aufweisen und darüber hinaus hyperproliferieren (Klezovitch *et al.*, 2004). In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Hugel-1 und -2 auf die Expression des G1-spezifischen Zellzyklusregulators Cyclin D1 untersucht. Cyclin D1 ist in humanen Tumoren häufig überexprimiert und gilt in verschiedenen Tumortypen wie dem Mantelzell-lymphom, dem nicht-kleinzelligen Lungenkrebs oder Brustkrebs als treibendes Element (Kim und Diehl, 2009). In Reporterassays und Zellzyklusanalysen zeigte sich erstmals, dass Hugel-1- und/oder Hugel-2-depletierte HEK293 Zellen den Zellzyklusregulator Cyclin D1 signifikant überexprimieren und den G1- zu S-Phasenübergang begünstigen. Die Akkumulation in der S-Phase trat überwiegend in Zellen mit gleichzeitiger Depletion der Hugel Homologe auf. Proliferationsanalysen bestätigten diese Ergebnisse. Neben der Regulation der Zellpolarität in humanen Epithelzellen scheinen Hugel-1 und -2 daher eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellzyklusprogression sowie der Zellproliferation zu spielen.

4.6 Einfluss des Hugel-1- und Hugel-2-Expressionsniveaus auf das Ansprechen auf Zytostatika

Die Behandlung aggressiver Tumore wird häufig durch die Ausbildung von Medikamentenresistenzen erschwert. Die hier vorgestellten Daten konnten erstmals zeigen, dass die Polaritätsproteine und Tumorsuppressoren Hugel-1 und -2 möglicherweise eine wichtige Rolle für die Resistenz Chemotherapeutika-behandelter Zellen spielen und dass der Verlust dieser Proteine mit einer erhöhten Resistenzbildung der Zellen einher geht. Die Viabilität Artesunate- oder Doxorubicin-behandelter Zellen war beispielsweise insbesondere dann erhöht, wenn die Expression beider Homologe RNAi-vermittelt inhibiert wurde. Wie in vorigen Versuchen demonstriert, könnte die mit dem Verlust zusammenhängende verstärkte Zellzyklusprogression, Zunahme der Zellproliferation und Annahme eines mesenchymalen, migratorischen Phänotyps die Viabilität und Resistenz der Zellen steigern. McConkey *et al.* zeigten an humanen urothelialen Tumorzelllinien wie auch an primären Tumoren, dass die mesenchymale Fraktion der Zellen gegenüber Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (*Epidermal growth factor receptor*, EGFR) und des Typ-3 Fibroblasten Wachstumsfaktorrezeptors (*Type-3 fibroblast growth factor receptor*, FGFR3) eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufwies als die epitheliale Fraktion (McConkey *et al.*, 2009). Zusammengenommen deuten die Daten dieser Arbeit erstmals darauf hin, dass das Expressionsniveau von Hugel-1 und Hugel-2 möglicherweise eine prognostische Aussage über das Ansprechen epithelialer Tumore gegenüber Chemotherapeutika ermöglichen könnte. Dies erfordert in Zukunft jedoch ein besseres und tieferes Verständnis der Mechanismen und Signalwege, welche die Veränderungen von Polaritätsproteinen regulieren.

4.7 Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese von *mgl-2* in der Maus

Knockout Mausmodelle liefern wichtige Erkenntnisse über die Funktion und Kontrolle von Genen in Entwicklungs- und physiologischen Prozessen. Durch Deletion einzelner Gene *in vivo* werden *loss-of-function* Phänotypen erzeugt, die Rückschlüsse auf die jeweilige Genfunktion zulassen. In dieser Arbeit wurde anhand eines konditionalen *Knockout* Modells untersucht, welche funktionelle Rolle das murine *lgl-2* Gen, *mgl-2*, in Darmepithelzellen der Maus ausübt. Der größte Nachteil der häufig angewandten konstitutiven Mausmodelle besteht darin, dass der gewünschte genetische Defekt schon zu Beginn der Mausentwicklung entweder in allen Zellen oder in bestimmten Zelltypen auftritt und bei Homozygotie häufig zur embryonalen Letalität führt (Vignjevic *et al.*, 2007; Copp, 1995). Die Genfunktion kann daher nicht in späteren Entwicklungsstufen analysiert werden. Um diese Begrenzung zu umgehen wurde ein konditionales, ort- und zeitspezifisches, Cre/loxP-Rekombinationssystem in Mäusen etabliert. Neben einem von loxP Erkennungssequenzen flankierten *mgl-2* Gen tragen diese eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Villin-Promotors. Dies ermöglicht zu jedem Zeitpunkt eine genau kontrollierte, Cre-vermittelte Deletion von *mgl-2* im Darmepithel der Maus.

Zur Etablierung des Systems wurden Mäuse der Linien *mgl-2*^{flox/flox} und *mgl-2*^{+/+} Vil^{Cre/+} miteinander verpaart und der gewünschte Genotyp (*mgl-2*^{flox/flox} Vil^{Cre/+}) weitgehend in Übereinstimmung mit den zu erwartenden Mendelverhältnissen erhalten. Tiere dieser drei Genotypen zeigten gegenüber dem Wildtyp weder phänotypische Defekte noch Verhaltensanomalien und belegen damit, dass die chromosomale Integration der Transgene ohne negative Folgen für die Maus bleibt. Nachfolgend wurde in *mgl-2*^{flox/flox} Vil^{Cre/+} Mäusen durch Gabe des nichtsteroidalen Antiestrogens Tamoxifen eine Cre-vermittelte konditionale Exzision des *mgl-2* Gens im Darmepithel der Maus induziert und der daraus resultierende Mutant mit Kontrolltieren (*mgl-2*^{flox/flox}) verglichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrierten, dass *mgl-2* *Knockout*-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe weder signifikante phänotypische Unterschiede noch Gewichtsunterschiede aufwiesen, wie sie nach einer möglichen Schädigung des *mgl-2* deletierten Darmepithelgewebes und einer damit verbundenen verminderten Nährstoffresorption zu erwarten gewesen wären. Ebenso erbrachte der anatomische Vergleich des GI-Trakts sowie weiterer Organe wie Leber, Niere, Milz und Lungen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen, obwohl die Tamoxifen-induzierte und

Cre-ER^{T2}/loxP-vermittelte Exzision von *mgl-2* im Darmepithel durch PCR-Analyse organ-spezifischer Mutanten-DNA verifiziert werden konnte. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die darmspezifische Expression der Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase durch Exzision des von loxP-Sequenzen flankierten *mgl-2* Gens zuverlässig eine gezielte ort- und zeit-kontrollierte somatische Mutation hervorruft. Das darmspezifische Cre-ER^{T2}/loxP-Rekombinationssystem eignet sich daher gut für eine Anwendung in der Maus.

Zu klären ist, weshalb die Deletion von *mgl-2* im konditionalen Mausmodell zu keiner phänotypischen Ausprägung führte. Die Exzision eines loxP-flankierten Gens tritt normalerweise bereits innerhalb weniger Tage nach Induktion der Cre-Rekombinase ein (Metzger und Chambon, 2001). Zudem wird berichtet, dass der rekombinierte Locus im transgenen Villin-Cre Maussystem aufgrund des *targetings* epithelialer Vorläuferzellen für einen Zeitraum von mehr als 60 Tagen anhält (el Marjou *et al.*, 2004). Da die in der vorliegenden Studie anberaumte Versuchsdauer von 35 Tagen innerhalb dieser Zeitspanne liegt, kann sie als Ursache für die nicht erfolgte Ausprägung eines Phänotyps ausgeschlossen werden. Eher ist anzunehmen, dass der Verlust von *mgl-2* durch das im Darmepithel koexprimierte und möglicherweise funktionell redundante *mgl-1* Gen kompensiert wird. Die funktionellen Domänen von Mgl-1 und Mgl-2 sind strukturell hoch konserviert und üben darüber hinaus Einfluss auf die Aktivität des Par-3/aPKC/Par-6 Komplexes zur Regulation der epithelialen Zellpolarität und Gewebemorphologie aus (Vasioukhin, 2006; Yamanaka *et al.*, 2006). Übereinstimmend dazu beschrieben Klezovitch *et al.*, dass der systemische und nicht-gewebespezifische *Knockout* von *lgl-1/mgl-1* nur in neuronalen Vorläuferzellen einen signifikanten Effekt hervorrief, da diese im Gegensatz zu Zellen anderer Organe ausschließlich Mgl-1, nicht aber Mgl-2 exprimieren. Sie schlussfolgerten daher, dass bei Koexpression beider Gene der Verlust des einen durch das jeweilig andere Gen kompensiert wird (Klezovitch *et al.*, 2004). Um einen *Knockout*-Phänotypen im Darmepithel von Mäusen zu erzielen, bedarf es daher möglicherweise der Etablierung eines doppelt-transgenen Mausmodells, in welchem die Gene *mgl-1* und *mgl-2* im Darm der Maus gleichzeitig Cre-vermittelt deletiert werden können. Diese Annahme wird durch Ergebnisse aus den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Analysen gestützt. So riefen Hvgl-1- und Hvgl-2-supprimierte humane Epithelzellen tendenziell einen stärker ausgeprägten Phänotypen hervor als einfach supprimierte Zellen. Diese Analysen sollten in Zukunft durchgeführt werden, um den Einfluss von *mgl-1* und *mgl-2* auf die Zellpolarität und Onkogenese muriner Darmepithelzellen zu studieren.

5 Ausblick

Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass das Polaritätsprotein Hugel-1 einen direkten Einfluss auf die Zellmorphologie, Zellmigration und -adhäsion ausübt und in funktioneller Konsequenz die Polymerisierung und Reorganisation des F-Aktinzytoskeletts von T-Lymphozyten reguliert. Obwohl eine Interaktion von Hugel-1 mit dem Aktin-Bindeprotein Myosin-II bekannt ist (Strand *et al.*, 1994b; Strand *et al.*, 1994a; Betschinger *et al.*, 2005), wurde bislang noch nicht geklärt, über welche Signalkaskaden Hugel-1 die für die Zellpolarisierung notwendige Aktinpolymerisation und -dynamik beeinflusst und damit die Morphologie von T-Zellen. In allen bislang untersuchten eukaryotischen Zellen werden Aufbau und Organisation des Aktinzytoskeletts durch die Rho Guanosin Triphosphatasen (GTPasen) Rho, Rac und Cdc42 über eine Vielzahl von Effektorproteinen reguliert (Krummel und Macara, 2006; Hall, 2009). Interessanterweise löst die Überexpression mutanter Formen jener GTPasen – ähnlich wie in dieser Arbeit an Hugel-1-supprimierten T-Zellen gezeigt – einen Verlust der Zellpolarität aus und beeinträchtigt die Chemotaxis im SDF-1 α Chemokingradienten (del Pozo *et al.*, 1999; D'Souza-Schorey *et al.*, 1998). Darüber hinaus bindet die üblicherweise durch Hugel inhibierte Par-6/aPKC Kasette über die Ubiquitin E3 Ligase Smurf-1 an der GTPase RhoA, welche in T-Zellen die Kontraktion der Aktinfilamente reguliert, und führt zu deren Degradation (Wang *et al.*, 2003). Eine Suppression von Hugel-1 könnte demnach in diesen Zellen zu einer reduzierten Aktinpolymerisation führen, verbunden mit einem Verlust der Zellpolarisation und Aktinpolymerisierung, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. In zukünftigen Versuchen wird daher zu untersuchen sein, welche direkte Verbindung zwischen Hugel-1 und Aktin-regulierenden Rho GTPasen und insbesondere der RhoA GTPase in T-Zellen besteht.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der Polaritäts- und Tumorsuppressorproteine Hugel-1 und Hugel-2 in Prozessen der Zellpolarität, Migration und Tumorigenese hauptsächlich auf der funktionellen Ebene von Epithelzellen untersucht. Die molekularen Mechanismen, über welche Hugel-1 und Hugel-2 diese Prozesse regulieren, sind größtenteils unbekannt und sollten daher in weiteren Studien analysiert werden. Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Proteine des Scribble Komplexes, Scribble, Dlg und Lgl, das Verhalten der Zellen in diesem Zusammenhang über Endozytose und Vesikelverkehr steuern (Gangar *et al.*, 2005; Müsch *et al.*, 2002; Massimi *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde berichtet, dass die neoplastischen Tumorsuppressoren in *Drosophila*, *Avalanche* (*Avl*) und *Vsp25*, unter anderem wichtige Kom-

ponenten für Endozytosemechanismen darstellen. Ein Funktionsverlust dieser Gene führt in der Fruchtfliege, ähnlich wie bei einer *lgl* Mutation, zu Polaritätsverlust und neoplastischer Zellproliferation im Epithelgewebe (Dow und Humbert, 2007). In Zukunft wäre es daher interessant zu erforschen, wie Hugel-1 und Hugel-2 den Prozess der Endozytose und den Vesikelverkehr regulieren und wie dies die Zellpolarität beeinflusst.

Es wurde gezeigt, dass der Polaritätsregulator Hugel zum einen für die anterior-posteriore wie auch für die apikal-basale Zellpolarität von T-Zellen bzw. Epithelzellen verantwortlich ist, zum anderen aber auch für die Zellmigration. Der Verlust von Hugel in Epithelzellen bedingt die Ausbildung aggressiver und invasiver Tumore, während T-Zellen stattdessen ihre migratorischen Eigenschaften und die Fähigkeit zur Chemokin- oder CD3/TCR-vermittelten Polarisierung verlieren. Das Verständnis des exakten molekularen Mechanismus der Polaritätsregulation durch Hugel würde zu der Erkenntnis beitragen, wie solche scheinbar gegensätzlichen Prozesse zu erklären sind, wie der Verlust der Zellpolarität sowohl die Progression humaner epithelialer Tumore ermöglicht als auch die Motilität von T-Zellen einschränkt. In Zukunft könnte dies zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien in der Therapie maligner Krebserkrankungen beitragen. Für den klinischen Alltag wäre es darüber hinaus von besonderer prognostischer Bedeutung zu untersuchen, wie das Expressionsprofil von Hugel-1 und -2 in Tumoren von Patienten mit Überleben und Fortschreitungsgrad der Erkrankung korreliert.

6 Zusammenfassung

Das menschliche Gen *human giant larvae (hugl)* ist ein Homolog des hochkonservierten *Drosophila* Gens *lethal giant larvae (lgl)*, welches in Epithelzellen die Funktion eines neoplastischen Tumorsuppressors und Polaritätsregulators einnimmt. Ein Verlust oder eine verminderte Expression beider Homologe des Gens, *hugl-1* und *hugl-2*, geht einher mit dem Auftreten und der Progression verschiedener epithelialer Tumorerkrankungen wie malignen Melanomen und Brust-, Kolon- oder Lungentumoren. Die exakte Funktion der Homologe Hugl-1 und Hugl-2 bezüglich der Regulation und Aufrechterhaltung der epithelialen Zellpolarität sowie ihre Rolle in der Genese humaner Tumore ist jedoch weitgehend unbekannt. Gänzlich unbekannt ist auch die Bedeutung von Hugl-1 und Hugl-2 als Polaritätsregulatoren für die Ausbildung und den Erhalt der T-Zellmorphologie und -funktion. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Polaritäts- und Tumorsuppressorgene *hugl-1* und *hugl-2* in funktionellen Analysen mittels siRNA-vermitteltem Gen-Silencing in Epithelzellen und T-Lymphozyten zu charakterisieren. Darüber hinaus wurden die Funktionen und Eigenschaften von *mgl-2*, dem murinen Homologen von *hugl-2*, im Cre/loxP-vermittelten konditionalen *Knockout* Mausmodell *in vivo* analysiert.

Zur Charakterisierung der biologischen Effekte von Hugl-1 und Hugl-2 auf das Wachstumsverhalten, Migration und Invasion von Epithelzellen wurden in dieser Arbeit erfolgreich unterschiedliche shRNA-Expressionskonstrukte generiert sowie Hugl-supprimierte Zelllinien etabliert. *In vitro* Studien sowie *in vivo* Tumorigenitätsanalysen lieferten übereinstimmend Hinweise darauf, dass verminderte Hugl-1- und Hugl-2-Expressionsspiegel eine signifikante Rolle in der Vermittlung invasiver und tumorigener Eigenschaften von Epithelzellen spielen. Dabei rief der Verlust beider Homologe deutlich stärkere Reaktionen hervor als die Suppression eines einzelnen Homologen. Zudem wiesen die Überexpression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 sowie die Hyperproliferation von Hugl-1- und/oder Hugl-2-depletierten Epithelzellen auf eine wichtige Rolle der beiden Homologe in der Zellzyklusprogression und Zellproliferation hin. Ein geringer Expressionsstatus von Hugl-1 und -2 schien darüber hinaus mit einer verstärkten Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika zu korrelieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die untersuchten T-Lymphozyten nur Hugl-1 exprimieren und dass letzteres notwendig für den F-Aktin-vermittelten Erhalt der T-Zellpolarität und -morphologie ist. Hugl-1-supprimierte, über voneinander unabhängige Signalwege (TCR- oder Chemokinrezeptor) stimulierte

T-Lymphozyten wiesen eine bedeutende Störung der Lamellipodien- und Uropodausbildung auf und ließen eine Interaktion von Hugl-1 auf Ebene des F-Aktins vermuten. Des Weiteren zeigte sich, dass der Polaritätsregulator Hugl-1 die CD3/TCR-induzierte Zelladhäsion positiv beeinflusst. Die Analyse der T-Zellmigration und -motilität offenbarte in Übereinstimmung dazu die Wichtigkeit von Hugl-1 für die Polarisierung und Migration der T-Zellen sowohl im Chemokingradienten als auch auf mDCs.

Für die Aufklärung der funktionellen Rolle von *mgl-2 in vivo* wurde in dieser Arbeit eine Tamoxifen-induzierbare, Cre/loxP-vermittelte konditionale Mauslinie generiert und analysiert. Die *mgl-2*-deletierten Tiere wiesen weder signifikante phänotypische Unterschiede noch Abweichungen in der Organanatomie auf und ließen daher auf eine Kompensation durch das im Darmepithel koexprimierte und möglicherweise funktionell redundante *mgl-1* Gen schließen.

7 Literaturverzeichnis

- Agrawal, N.; Kango, M.; Mishra, A.; Sinha, P. (1995). Neoplastic transformation and aberrant cell-cell interactions in genetic mosaics of lethal(2)giant larvae (lgl), a tumor suppressor gene of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **172**, 218–229.
- American Cancer Society (2010). *Cancer Facts & Figures 2010* (Atlanta).
- Anderson, J. M. (1996). Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol* **6**, 382–384.
- Assemat, E.; Bazellieres, E.; Pallesi-Pocachard, E.; Le Bivic, A.; Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 614–630.
- Atwood, S. X.; Prehoda, K. E. (2009). aPKC phosphorylates Miranda to polarize fate determinants during neuroblast asymmetric cell division. *Curr Biol* **19**, 723–729.
- Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252.
- Banks, L.; Humbert, P. O. (2008). On the guardians of polarity and the disorientation of cancer. *Oncogene* **27**, 6876–6877.
- Betschinger, J.; Mechtler, K.; Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* **422**, 326–330.
- Betschinger, J.; Eisenhaber, F.; Knoblich, J. A. (2005). Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Curr. Biol.* **15**, 276–282.
- Bilder, D. (2001). PDZ proteins and polarity: functions from the fly. *Trends Genet* **17**, 511–519.
- Bilder, D. (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* **18**, 1909–1925.
- Bilder, D.; Schober, M.; Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* **5**, 53–58.
- Bilder, D.; Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* **403**, 676–680.
- Bilder, D.; Li, M.; Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* **289**, 113–116.
- Billadeau, D. D.; Burkhardt, J. K. (2006). Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic* **7**, 1451–1460.
- Billadeau, D. D.; Nolz, J. C.; Gomez, T. S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 131–143.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523.

- Bohl, J.; Brimer, N.; Lyons, C.; Vande Pol, S. B. (2007). The stardust family protein MPP7 forms a tripartite complex with LIN7 and DLG1 that regulates the stability and localization of DLG1 to cell junctions. *J Biol Chem* **282**, 9392–9400.
- Borg, J. P. (2004). hScrib: un nouveau suppresseur de tumeur a l'horizon. *Pathol Biol (Paris)* **52**, 328–331.
- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **115**, 453–466.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Bridges, C. B.; Brehme, K. S. (1944). The mutants of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Washington, Washington DC, Pub **552**.
- Brown, M. J.; Hallam, J. A.; Liu, Y.; Yamada, K. M.; Shaw, S. (2001). Cutting edge: integration of human T lymphocyte cytoskeleton by the cytolinker plectin. *J. Immunol* **167**, 641–645.
- Brumby, A. M.; Richardson, H. E. (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 626–639.
- Brummelkamp, T. R.; Bernards, R.; Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550–553.
- Bryant, D. M.; Mostov, K. E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 887–901.
- Bryant, P. J. (1997). Junction genetics. *Dev Genet* **20**, 75–90.
- Bryant, P. J.; Huwe, A. (2000). LAP proteins: what's up with epithelia? *Nat Cell Biol* **2**, E141–3.
- Burkhardt, J. K.; Carrizosa, E.; Shaffer, M. H. (2008). The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol* **26**, 233–259.
- Cannell, I. G.; Kong, Y. W.; Bushell, M. (2008). How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem. Soc. Trans* **36**, 1224–1231.
- Cavallaro, U.; Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 118–132.
- Cemerski, S.; Shaw, A. (2006). Immune synapses in T-cell activation. *Curr. Opin. Immunol* **18**, 298–304.
- Copp, A. J. (1995). Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* **11**, 87–93.
- Cowin, P.; Rowlands, T. M.; Hatsell, S. J. (2005). Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr. Opin. Cell Biol* **17**, 499–508.

- Crouch, S. P.; Kozlowski, R.; Slater, K. J.; Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **160**, 81–88.
- Cullen, B. R. (2004). Transcription and Processing of Human microRNA Precursors. *Molecular Cell* **16**, 861–865.
- Cullinan, P.; Sperling, A. I.; Burkhardt, J. K. (2002). The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* **189**, 111–122.
- Danielian, P. S.; White, R.; Hoare, S. A.; Fawell, S. E.; Parker, M. G. (1993). Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* **7**, 232–240.
- del Pozo, M. A.; Vicente-Manzanares, M.; Tejedor, R.; Serrador, J. M.; Sánchez-Madrid, F. (1999). Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3609–3620.
- Dow, L. E.; Brumby, A. M.; Muratore, R.; Coombe, M. L.; Sedelies, K. A.; Trapani, J. A.; Russell, S. M.; Richardson, H. E.; Humbert, P. O. (2003). hScrib is a functional homologue of the *Drosophila* tumour suppressor Scribble. *Oncogene* **22**, 9225–9230.
- Dow, L. E.; Humbert, P. O. (2007). Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis. *Int. Rev. Cytol.* **262**, 253–302.
- D'Souza-Schorey, C.; Boettner, B.; van Aelst, L. (1998). Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3936–3946.
- Dustin, M. L.; Chan, A. C. (2000). Signaling takes shape in the immune system. *Cell* **103**, 283–294.
- Efferth, T.; Dunstan, H.; Sauerbrey, A.; Miyachi, H.; Chitambar, C. R. (2001). The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *Int. J. Oncol.* **18**, 767–773.
- el Marjou, F.; Janssen, K.-P.; Chang, B. H.-J.; Li, M.; Hindie, V.; Chan, L.; Louvard, D.; Chambon, P.; Metzger, D.; Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* **39**, 186–193.
- Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498.
- Etienne-Manneville, S. (2008). Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* **27**, 6970–6980.
- Etienne-Manneville, S.; Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635.
- Far, D. F.; Peyron, J. F.; Imbert, V.; Rossi, B. (1994). Immunofluorescent quantification of tyrosine phosphorylation of cellular proteins in whole cells by flow cytometry. *Cytometry* **15**, 327–334.
- Feigin, M. E.; Muthuswamy, S. K. (2009). Polarity proteins regulate mammalian cell-cell junctions and cancer pathogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 694–700.

- Feil, R.; Brocard, J.; Mascrez, B.; LeMeur, M.; Metzger, D.; Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 10887–10890.
- Feil, R.; Wagner, J.; Metzger, D.; Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 752–757.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Friedman, R. S.; Jacobelli, J.; Krummel, M. F. (2005). Mechanisms of T cell motility and arrest: deciphering the relationship between intra- and extracellular determinants. *Semin. Immunol* **17**, 387–399.
- Froldi, F.; Ziosi, M.; Tomba, G.; Parisi, F.; Garoia, F.; Pession, A.; Grifoni, D. (2008). *Drosophila* lethal giant larvae neoplastic mutant as a genetic tool for cancer modeling. *Curr. Genomics* **9**, 147–154.
- Gallego, M. D.; Santamaría, M.; Peña, J.; Molina, I. J. (1997). Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood* **90**, 3089–3097.
- Gangar, A.; Rossi, G.; Andreeva, A.; Hales, R.; Brennwald, P. (2005). Structurally conserved interaction of Lgl family with SNAREs is critical to their cellular function. *Curr Biol* **15**, 1136–1142.
- Gateff, E. (1978). Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* **200**, 1448–1459.
- Gateff, E.; Mechler, B. M. (1989). Tumor-suppressor genes of *Drosophila melanogaster*. *Crit Rev Oncog* **1**, 221–245.
- Gérard, A.; Mertens, A. E. E.; van der Kammen, R. A.; Collard, J. G. (2007). The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J. Cell Biol.* **176**, 863–875.
- Goldstein, B.; Macara, I. G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev. Cell* **13**, 609–622.
- Gomez, T. S.; Billadeau, D. D. (2008). T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv. Immunol.* **97**, 1–64.
- Gotta, M. (2005). At the heart of cell polarity and the cytoskeleton. *Dev Cell* **8**, 629–633.
- Grifoni, D.; Garoia, F.; Bellosta, P.; Parisi, F.; Biase, D. de; Collina, G.; Strand, D.; Cavicchi, S.; Pession, A. (2007). aPKC ζ cortical loading is associated with Lgl cytoplasmic release and tumor growth in *Drosophila* and human epithelia. *Oncogene* **26**, 5960–5965.

- Grifoni, D.; Garoia, F.; Schimanski, C. C.; Schmitz, G.; Laurenti, E.; Galle, P. R.; Pession, A.; Cavicchi, S.; Strand, D. (2004). The human protein Hugl-1 substitutes for *Drosophila* lethal giant larvae tumour suppressor function in vivo. *Oncogene* **23**, 8688–8694.
- Grzeschik, N. A.; Parsons, L. M.; Richardson, H. E. (2010a). Lgl, the SWH pathway and tumorigenesis: It's a matter of context & competition! *Cell Cycle* **9**, 3202–3212.
- Grzeschik, N. A.; Amin, N.; Secombe, J.; Brumby, A. M.; Richardson, H. E. (2007). Abnormalities in cell proliferation and apico-basal cell polarity are separable in *Drosophila* lgl mutant clones in the developing eye. *Dev. Biol.* **311**, 106–123.
- Grzeschik, N. A.; Parsons, L. M.; Allott, M. L.; Harvey, K. F.; Richardson, H. E. (2010b). Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Curr. Biol.* **20**, 573–581.
- Gumbiner, B.; Lowenkopf, T.; Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3460–3464.
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 5–14.
- Hamilton, A. J.; Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950–952.
- Hanada, N.; Makino, K.; Koga, H.; Morisaki, T.; Kuwahara, H.; Masuko, N.; Tabira, Y.; Hiraoka, T.; Kitamura, N.; Kikuchi, A., *et al.* (2000). NE-dlg, a mammalian homolog of *Drosophila* dlg tumor suppressor, induces growth suppression and impairment of cell adhesion: possible involvement of down-regulation of beta-catenin by NE-dlg expression. *Int. J. Cancer* **86**, 480–488.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70.
- Hayward, G. S.; Smith, M. G. (1972). The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **63**, 383–395.
- Huang, L.; Muthuswamy, S. K. (2010). Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 41–50.
- Humbert, P. O.; Grzeschik, N. A.; Brumby, A. M.; Galea, R.; Elsum, I.; Richardson, H. E. (2008). Control of tumorigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module. *Oncogene* **27**, 6888–6907.
- Humbert, P. O.; Dow, L. E.; Russell, S. M. (2006). The Scribble and Par complexes in polarity and migration: friends or foes? *Trends Cell Biol* **16**, 622–630.
- Humbert, P.; Russell, S.; Richardson, H. (2003). Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays* **25**, 542–553.

- Hutterer, A.; Betschinger, J.; Petronczki, M.; Knoblich, J. A. (2004). Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Cell* **6**, 845–854.
- Iden, S.; Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 846–859.
- Indra, A. K.; Warot, X.; Brocard, J.; Bornert, J. M.; Xiao, J. H.; Chambon, P.; Metzger, D. (1999). Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4324–4327.
- Ishidate, T.; Matsumine, A.; Toyoshima, K.; Akiyama, T. (2000). The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene* **19**, 365–372.
- Itoh M; Furuse M; Morita K; Kubota K; Saitou M; Tsukita S (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* **147**, 1351–1363.
- Jan, Y. N.; Jan, L. Y. (1998). Asymmetric cell division. *Nature* **392**, 775–778.
- Jeanes, A.; Gottardi, C. J.; Yap, A. S. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* **27**, 6920–6929.
- Kagami, M.; Toh-e, A.; Matsui, Y. (1998). Sro7p, a *Saccharomyces cerevisiae* counterpart of the tumor suppressor l(2)gl protein, is related to myosins in function. *Genetics* **149**, 1717–1727.
- Kaiser, A.; Donnadieu, E.; Abastado, J.-P.; Trautmann, A.; Nardin, A. (2005). CC chemokine ligand 19 secreted by mature dendritic cells increases naive T cell scanning behavior and their response to rare cognate antigen. *J. Immunol.* **175**, 2349–2356.
- Kallay, L. M.; McNickle, A.; Brennwald, P. J.; Hubbard, A. L.; Braiterman, L. T. (2006). Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains. *J Cell Biochem* **99**, 647–664.
- Kalmes, A.; Merdes, G.; Neumann, B.; Strand, D.; Mechler, B. M. (1996). A serine-kinase associated with the p127-l(2)gl tumour suppressor of *Drosophila* may regulate the binding of p127 to nonmuscle myosin II heavy chain and the attachment of p127 to the plasma membrane. *J. Cell. Sci.* **109 (Pt 6)**, 1359–1368.
- Karnak, D.; Lee, S.; Margolis, B. (2002). Identification of multiple binding partners for the amino-terminal domain of synapse-associated protein 97. *J Biol Chem* **277**, 46730–46735.
- Kashyap, A. (2008). Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Tumor Suppressor Genes Hugl-1 and Hugl-2. Dissertation.
- Katoh, M. (2004). Identification and characterization of human LLGL4 gene and mouse Llg14 gene in silico. *Int J Oncol* **24**, 737–742.

- Khvorova, A.; Reynolds, A.; Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209–216.
- Kim, J. K.; Diehl, J. A. (2009). Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J. Cell. Physiol.* **220**, 292–296.
- Kleinman, H. K.; McGarvey, M. L.; Liotta, L. A.; Robey, P. G.; Tryggvason, K.; Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188–6193.
- Kleinman, H. K.; McGarvey, M. L.; Hassell, J. R.; Star, V. L.; Cannon, F. B.; Laurie, G. W.; Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**, 312–318.
- Klezovitch, O.; Fernandez, T. E.; Tapscott, S. J.; Vasioukhin, V. (2004). Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in Lgl1 knockout mice. *Genes Dev* **18**, 559–571.
- Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583–597.
- Knoblich, J. A. (2010). Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 849–860.
- Koopman, G.; Graaff, M. de; Huysmans, A. C.; Meijer, C. J.; Pals, S. T. (1992). Induction of homotypic T cell adhesion by triggering of leukocyte function-associated antigen-1 alpha (CD11a): differential effects on resting and activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1851–1856.
- Krummel, M. F.; Macara, I. (2006). Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat. Immunol.* **7**, 1143–1149.
- Kupfer, A.; Dennert, G.; Singer, S. J. (1985). The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *J Mol Cell Immunol* **2**, 37–49.
- Kuphal, S.; Wallner, S.; Schimanski, C. C.; Bataille, F.; Hofer, P.; Strand, S.; Strand, D.; Bosserhoff, A. K. (2006). Expression of Hugel-1 is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* **25**, 103–110.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203–209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Larsson, K.; Bohl, F.; Sjostrom, I.; Akhtar, N.; Strand, D.; Mechler, B. M.; Grabowski, R.; Adler, L. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* SOP1 and SOP2 genes, which act in cation homeostasis, can be functionally substituted by the *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor gene. *J Biol Chem* **273**, 33610–33618.

- Lee, S.; Fan, S.; Makarova, O.; Straight, S.; Margolis, B. (2002a). A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol Cell Biol* **22**, 1778–1791.
- Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Radmark, O.; Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419.
- Lee, Y.; Jeon, K.; Lee, J.-T.; Kim, S.; Kim, V. N. (2002b). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* **21**, 4663–4670.
- Lehman, K.; Rossi, G.; Adamo, J. E.; Brennwald, P. (1999). Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J Cell Biol* **146**, 125–140.
- Li, D.; Roberts, R. (2001). WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci* **58**, 2085–2097.
- Li, R.; Gundersen, G. G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 860–873.
- Lippman, Z.; Martienssen, R. (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364–370.
- Lisovsky, M.; Dresser, K.; Baker, S.; Fisher, A.; Woda, B.; Banner, B.; Lauwers, G. Y. (2009). Cell polarity protein Lgl2 is lost or aberrantly localized in gastric dysplasia and adenocarcinoma: an immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* **22**, 977–984.
- Lisovsky, M.; Dresser, K.; Woda, B.; Mino-Kenudson, M. (2010). Immunohistochemistry for cell polarity protein lethal giant larvae 2 differentiates pancreatic intraepithelial neoplasia-3 and ductal adenocarcinoma of the pancreas from lower-grade pancreatic intraepithelial neoplasias. *Hum. Pathol.* **41**, 902–909.
- Liu, J.; Carmell, M. A.; Rivas, F. V.; Marsden, C. G.; Thomson, J. M.; Song, J. J.; Hammond, S. M.; Joshua-Tor, L.; Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437–1441.
- Lorenzo, C. de; Mechler, B. M.; Bryant, P. J. (1999a). What is Drosophila telling us about cancer? *Cancer Metastasis Rev* **18**, 295–311.
- Lorenzo, C. de; Mechler, B. M.; Bryant, P. J. (1999b). What is Drosophila telling us about cancer? *Cancer Metastasis Rev* **18**, 295–311.
- Lu, X.; Feng, X.; Man, X.; Yang, G.; Tang, L.; Du, D.; Zhang, F.; Yuan, H.; Huang, Q.; Zhang, Z., *et al.* (2009). Aberrant splicing of HUGL-1 is associated with hepatocellular carcinoma progression. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3287–3296.
- Ludford-Menting, M. J.; Oliaro, J.; Sacirbegovic, F.; Cheah, E. T.-Y.; Pedersen, N.; Thomas, S. J.; Pasam, A.; Iazzolino, R.; Dow, L. E.; Waterhouse, N. J., *et al.* (2005). A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* **22**, 737–748.

- Lue, R. A.; Brandin, E.; Chan, E. P.; Branton, D. (1996). Two independent domains of hDlg are sufficient for subcellular targeting: the PDZ1-2 conformational unit and an alternatively spliced domain. *J Cell Biol* **135**, 1125–1137.
- Lukowski, R.; Weber, S.; Weinmeister, P.; Feil, S.; Feil, R. (2005). Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum* **11**, 287–290.
- Lutzelschwab, R.; Klambt, C.; Rossa, R.; Schmidt, O. (1987). A protein product of the *Drosophila* recessive tumor gene, *l(2) giant gl*, potentially has cell adhesion properties. *EMBO J* **6**, 1791–1797.
- Martin-Belmonte, F.; Rodriguez-Fraticelli, A. E. (2009). Chapter 3: acquisition of membrane polarity in epithelial tube formation patterns, signaling pathways, molecular mechanisms, and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* **274**, 129–182.
- Massimi, P.; Narayan, N.; Thomas, M.; Gammoh, N.; Strand, S.; Strand, D.; Banks, L. (2008). Regulation of the hDlg/hScrib/Hugl-1 tumour suppressor complex. *Exp. Cell Res.* **314**, 3306–3317.
- Mathew, D.; Gramates, L. S.; Packard, M.; Thomas, U.; Bilder, D.; Perrimon, N.; Gorczyca, M.; Budnik, V. (2002). Recruitment of scribble to the synaptic scaffolding complex requires GUK-holder, a novel DLG binding protein. *Curr Biol* **12**, 531–539.
- Mayer, B.; Emery, G.; Berdnik, D.; Wirtz-Peitz, F.; Knoblich, J. A. (2005). Quantitative analysis of protein dynamics during asymmetric cell division. *Curr Biol* **15**, 1847–1854.
- McAnuff, M. A.; Rettig, G. R.; Rice, K. G. (2007). Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo. *J Pharm Sci* **96**, 2922–2930.
- McCaffrey, L. M.; Macara, I. G. (2009). Widely conserved signaling pathways in the establishment of cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001370.
- McConkey, D. J.; Choi, W.; Marquis, L.; Martin, F.; Williams, M. B.; Shah, J.; Svatek, R.; Das, A.; Adam, L.; Kamat, A., *et al.* (2009). Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 335–344.
- McFarland, W. (1969). Microspikes on the lymphocyte uropod. *Science* **163**, 818–820.
- McLaughlin, M.; Hale, R.; Ellston, D.; Gaudet, S.; Lue, R. A.; Viel, A. (2002). The distribution and function of alternatively spliced insertions in hDlg. *J Biol Chem* **277**, 6406–6412.
- Mechler, B. M.; McGinnis, W.; Gehring, W. J. (1985). Molecular cloning of lethal(2)giant larvae, a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **4**, 1551–1557.
- Mechler, B. M.; Torok, I.; Schmidt, M.; Opper, M.; Kuhn, A.; Merz, R.; Protin, U. (1989). Molecular basis for the regulation of cell fate by the lethal (2) giant larvae tumour suppressor gene of *Drosophila melanogaster*. *Ciba Found Symp* **142**, 166-78; discussion 178-80.
- Mechler, B. M.; Strand, D. (1990). Tumor suppression in *Drosophila*. *Immunol Ser* **51**, 123–144.

- Meister, G.; Landthaler, M.; Patkaniowska, A.; Dorsett, Y.; Teng, G.; Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**, 185–197.
- Meister, G. (2007). miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell* **131**, 25–28.
- Mellman, I.; Nelson, W. J. (2008). Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 833–845.
- Metais, J. Y.; Navarro, C.; Santoni, M. J.; Audebert, S.; Borg, J. P. (2005). hScrib interacts with ZO-2 at the cell-cell junctions of epithelial cells. *FEBS Lett* **579**, 3725–3730.
- Metzger, D.; Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 470–476.
- Metzger, D.; Chambon, P. (2001). Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* **24**, 71–80.
- Moreno-Bueno, G.; Portillo, F.; Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* **27**, 6958–6969.
- Morris, K. V.; Chan, S. W.-L.; Jacobsen, S. E.; Looney, D. J. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* **305**, 1289–1292.
- Müller, H.; Lukas, J.; Schneider, A.; Warthoe, P.; Bartek, J.; Eilers, M.; Strauss, M. (1994). Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 2945–2949.
- Müsch, A.; Cohen, D.; Yeaman, C.; Nelson, W. J.; Rodriguez-Boulan, E.; Brennwald, P. J. (2002). Mammalian homolog of Drosophila tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 158–168.
- Nagasaka, K.; Nakagawa, S.; Yano, T.; Takizawa, S.; Matsumoto, Y.; Tsuruga, T.; Nakagawa, K.; Minaguchi, T.; Oda, K.; Hiraike-Wada, O., *et al.* (2006). Human homolog of Drosophila tumor suppressor Scribble negatively regulates cell-cycle progression from G1 to S phase by localizing at the basolateral membrane in epithelial cells. *Cancer Sci.* **97**, 1217–1225.
- Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289.
- Navarro, C.; Nola, S.; Audebert, S.; Santoni, M. J.; Arsanto, J. P.; Ginestier, C.; Marchetto, S.; Jacquemier, J.; Isnardon, D.; Le Bivic, A., *et al.* (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* **24**, 4330–4339.
- Neer, E. J.; Schmidt, C. J.; Nambudripad, R.; Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297–300.
- Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766–774.

- Neumuller, R. A.; Knoblich, J. A. (2009). Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev* **23**, 2675–2699.
- Nieto, M.; Frade, J. M.; Sancho, D.; Mellado, M.; Martinez-A, C.; Sánchez-Madrid, F. (1997). Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J. Exp. Med* **186**, 153–158.
- Nolz, J. C.; Gomez, T. S.; Zhu, P.; Li, S.; Medeiros, R. B.; Shimizu, Y.; Burkhardt, J. K.; Freedman, B. D.; Billadeau, D. D. (2006). The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr. Biol.* **16**, 24–34.
- Ohshiro, T.; Yagami, T.; Zhang, C.; Matsuzaki, F. (2000). Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast. *Nature* **408**, 593–596.
- Opper, M.; Schuler, G.; Mechler, B. M. (1987). Hereditary suppression of lethal (2) giant larvae malignant tumor development in *Drosophila* by gene transfer. *Oncogene* **1**, 91–96.
- Parsey, M. V.; Lewis, G. K. (1993). Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T cells. *J. Immunol.* **151**, 1881–1893.
- Parsons, L. M.; Grzeschik, N. A.; Allott, M. L.; Richardson, H. E. (2010). Lgl/aPKC and Crb regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway. *Fly (Austin)* **4**, 288–293.
- Peng, C. Y.; Manning, L.; Albertson, R.; Doe, C. Q. (2000). The tumour-suppressor genes *lgl* and *dlg* regulate basal protein targeting in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **408**, 596–600.
- Petronczki, M.; Knoblich, J. A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol* **3**, 43–49.
- Plant, P. J.; Fawcett, J. P.; Lin, D. C.; Holdorf, A. D.; Binns, K.; Kulkarni, S.; Pawson, T. (2003). A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol* **5**, 301–308.
- Rajewsky, K.; Gu, H.; Kühn, R.; Betz, U. A.; Müller, W.; Roes, J.; Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* **98**, 600–603.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 23–36.
- Rao, D. D.; Vorhies, J. S.; Senzer, N.; Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 746–759.
- Real, E.; Faure, S.; Donnadieu, E.; Delon, J. (2007). Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. *J. Immunol.* **179**, 5649–5652.
- Rivas, F. V.; O'Keefe, J. P.; Alegre, M.-L.; Gajewski, T. F. (2004). Actin cytoskeleton regulates calcium dynamics and NFAT nuclear duration. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1628–1639.
- Robine, S.; Jaisser, F.; Louvard, D. (1997). Epithelial cell growth and differentiation. IV. Controlled spatiotemporal expression of transgenes: new tools to study normal and pathological states. *Am. J. Physiol.* **273**, G759-62.

- Romzek, N. C.; Harris, E. S.; Dell, C. L.; Skronek, J.; Hasse, E.; Reynolds, P. J.; Hunt, S. W.; Shimizu, Y. (1998). Use of a beta1 integrin-deficient human T cell to identify beta1 integrin cytoplasmic domain sequences critical for integrin function. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2715–2727.
- Round, J. L.; Tomassian, T.; Zhang, M.; Patel, V.; Schoenberger, S. P.; Miceli, M. C. (2005). Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. *J. Exp. Med.* **201**, 419–430.
- Russell, S. (2008). How polarity shapes the destiny of T cells. *J Cell Sci* **121**, 131–136.
- Sanchez-Madrid, F.; del Pozo, M. A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* **18**, 501–511.
- Sancho, D.; Vicente-Manzanares, M.; Mittelbrunn, M.; Montoya, M. C.; Gordon-Alonso, M.; Serrador, J. M.; Sanchez-Madrid, F. (2002). Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol Rev* **189**, 84–97.
- Sauer, B.; Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5166–5170.
- Schimanski, C. C.; Schmitz, G.; Kashyap, A.; Bosserhoff, A. K.; Bataille, F.; Schäfer, S. C.; Lehr, H. A.; Berger, M. R.; Galle, P. R.; Strand, S., *et al.* (2005). Reduced expression of Hugel-1, the human homologue of Drosophila tumour suppressor gene lgl, contributes to progression of colorectal cancer. *Oncogene* **24**, 3100–3109.
- Schneider, U.; Schwenk, H. U.; Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* **19**, 621–626.
- Schwarz, D. S.; Hutvagner, G.; Du, T.; Xu, Z.; Aronin, N.; Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208.
- Shin, K.; Fogg, V. C.; Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 207–235.
- Shimizu, Y.; van Seventer, G. A.; Horgan, K. J.; Shaw, S. (1990). Costimulation of proliferative responses of resting CD4+ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J. Immunol* **145**, 59–67.
- Siolas, D.; Lerner, C.; Burchard, J.; Ge, W.; Linsley, P. S.; Paddison, P. J.; Hannon, G. J.; Cleary, M. A. (2005). Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* **23**, 227–231.
- Siomi, H.; Siomi, M. C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* **457**, 396–404.
- Smith, C. A.; Lau, K. M.; Rahmani, Z.; Dho, S. E.; Brothers, G.; She, Y. M.; Berry, D. M.; Bonneil, E.; Thibault, P.; Schweisguth, F., *et al.* (2007). aPKC-mediated phosphorylation

- regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J* **26**, 468–480.
- Sonawane, M.; Carpio, Y.; Geisler, R.; Schwarz, H.; Maischein, H. M.; Nuesslein-Volhard, C. (2005). Zebrafish penner/lethal giant larvae 2 functions in hemidesmosome formation, maintenance of cellular morphology and growth regulation in the developing basal epidermis. *Development* **132**, 3255–3265.
- Spaderna, S.; Schmalhofer, O.; Wahlbuhl, M.; Dimmler, A.; Bauer, K.; Sultan, A.; Hlubek, F.; Jung, A.; Strand, D.; Eger, A., *et al.* (2008). The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res.* **68**, 537–544.
- Sripathy, S.; Lee, M.; Vasioukhin, V. (2011). Mammalian Llg12 Is Necessary for Proper Branching Morphogenesis during Placental Development. *Mol. Cell. Biol* **31**, 2920–2933.
- Stanley, P.; Smith, A.; McDowall, A.; Nicol, A.; Zicha, D.; Hogg, N. (2008). Intermediate-affinity LFA-1 binds alpha-actinin-1 to control migration at the leading edge of the T cell. *EMBO J* **27**, 62–75.
- Sternberg, N.; Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* **150**, 467–486.
- Stinchcombe, J. C.; Majorovits, E.; Bossi, G.; Fuller, S.; Griffiths, G. M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* **443**, 462–465.
- Strand, D. (1998). G Proteins, Cytoskeleton and Cancer (R.G. Landes: Georgetown, TX), 61–78.
- Strand, D.; Jakobs, R.; Merdes, G.; Neumann, B.; Kalmes, A.; Heid, H. W.; Husmann, I.; Mechler, B. M. (1994a). The Drosophila lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein forms homo-oligomers and is associated with nonmuscle myosin II heavy chain. *J. Cell Biol.* **127**, 1361–1373.
- Strand, D.; Unger, S.; Corvi, R.; Hartenstein, K.; Schenkel, H.; Kalmes, A.; Merdes, G.; Neumann, B.; Krieg-Schneider, F.; Coy, J. F. (1995). A human homologue of the Drosophila tumour suppressor gene l(2)gl maps to 17p11.2-12 and codes for a cytoskeletal protein that associates with nonmuscle myosin II heavy chain. *Oncogene* **11**, 291–301.
- Strand, D.; Raska, I.; Mechler, B. M. (1994b). The Drosophila lethal(2)giant larvae tumor suppressor protein is a component of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **127**, 1345–1360.
- Stucke, V. M.; Timmerman, E.; Vandekerckhove, J.; Gevaert, K.; Hall, A. (2007). The MAGUK protein MPP7 binds to the polarity protein hDlg1 and facilitates epithelial tight junction formation. *Mol Biol Cell* **18**, 1744–1755.
- Tanentzapf, G.; Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat. Cell Biol.* **5**, 46–52.
- Tanos, B.; Rodriguez-Boulan, E. (2008). The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* **27**, 6939–6957.

- Thomas, K. R.; Capecchi, M. R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503–512.
- Tomotsune, D.; Shoji, H.; Wakamatsu, Y.; Kondoh, H.; Takahashi, N. (1993). A mouse homologue of the *Drosophila* tumour-suppressor gene *l(2)gl* controlled by Hox-C8 in vivo. *Nature* **365**, 69–72.
- Tsukita S; Yamazaki, Y.; Katsuno, T.; Tamura, A. (2008). Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* **27**, 6930–6938.
- Tsuruga, T.; Nakagawa, S.; Watanabe, M.; Takizawa, S.; Matsumoto, Y.; Nagasaka, K.; Sone, K.; Hiraike, H.; Miyamoto, Y.; Hiraike, O., *et al.* (2007). Loss of Hugl-1 expression associates with lymph node metastasis in endometrial cancer. *Oncol. Res.* **16**, 431–435.
- van der Krol, A. R.; Mur, L. A.; Beld, M.; Mol, J. N.; Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291–299.
- Vasioukhin, V. (2006). Lethal giant puzzle of Lgl. *Dev. Neurosci.* **28**, 13–24.
- Vicente-Manzanares, M.; Choi, C. K.; Horwitz, A. R. (2009a). Integrins in cell migration—the actin connection. *J. Cell. Sci.* **122**, 199–206.
- Vicente-Manzanares, M.; Rey, M.; Jones, D. R.; Sancho, D.; Mellado, M.; Rodriguez-Frade, J. M.; del Pozo, M. A.; Yáñez-Mó, M.; Ana, A. M. de; Martínez-A, C., *et al.* (1999). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J. Immunol* **163**, 4001–4012.
- Vicente-Manzanares, M.; Sánchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 110–122.
- Vicente-Manzanares, M.; Ma, X.; Adelstein, R. S.; Horwitz, A. R. (2009b). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 778–790.
- Vieira, V.; Houssaye, G. de la; Lacassagne, E.; Dufier, J. L.; Jaïs, J. P.; Beermann, F.; Menasche, M.; Abitbol, M. (2008). Differential regulation of Dlg1, Scrib, and Lgl1 expression in a transgenic mouse model of ocular cancer. *Mol. Vis.* **14**, 2390–2403.
- Vignjevic, D.; Fre, S.; Louvard, D.; Robine, S. (2007). Conditional mouse models of cancer. *Handb Exp Pharmacol*, 263–287.
- Vlahakis, S. R.; Villasis-Keever, A.; Gomez, T.; Vanegas, M.; Vlahakis, N.; Paya, C. V. (2002). G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J. Immunol* **169**, 5546–5554.
- Vukicevic, S.; Kleinman, H. K.; Luyten, F. P.; Roberts, A. B.; Roche, N. S.; Reddi, A. H. (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp. Cell Res.* **202**, 1–8.

- Wang, H.-R.; Zhang, Y.; Ozdamar, B.; Ogunjimi, A. A.; Alexandrova, E.; Thomsen, G. H.; Wrana, J. L. (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**, 1775–1779.
- Waring, M. J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **13**, 269–282.
- Wei, X.; Tromberg, B. J.; Cahalan, M. D. (1999). Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca(2+) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 8471–8476.
- Williams, B. R. (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans* **25**, 509–513.
- Wirtz-Peitz, F.; Knoblich, J. A. (2006). Lethal giant larvae take on a life of their own. *Trends Cell Biol.* **16**, 234–241.
- Wirtz-Peitz, F.; Nishimura, T.; Knoblich, J. A. (2008). Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell* **135**, 161–173.
- Wodarz, A.; Ramrath, A.; Kuchinke, U.; Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* **402**, 544–547.
- Wodarz, A.; Näthke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1016–1024.
- Worbs, T.; Mempel, T. R.; Bölter, J.; Andrian, U. H. von; Förster, R. (2007). CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med* **204**, 489–495.
- Woodhouse, E.; Hersperger, E.; Shearn, A. (1998). Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes. *Dev Genes Evol* **207**, 542–550.
- Xavier, R.; Rabizadeh, S.; Ishiguro, K.; Andre, N.; Ortiz, J. B.; Wachtel, H.; Morris, D. G.; Lopez-Illasaca, M.; Shaw, A. C.; Swat, W., *et al.* (2004). Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation. *J Cell Biol* **166**, 173–178.
- Yamanaka, T.; Horikoshi, Y.; Sugiyama, Y.; Ishiyama, C.; Suzuki, A.; Hirose, T.; Iwamatsu, A.; Shinohara, A.; Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol* **13**, 734–743.
- Yamanaka, T.; Horikoshi, Y.; Izumi, N.; Suzuki, A.; Mizuno, K.; Ohno, S. (2006). Lgl mediates apical domain disassembly by suppressing the PAR-3-aPKC-PAR-6 complex to orient apical membrane polarity. *J. Cell. Sci.* **119**, 2107–2118.
- Yamanaka, T.; Ohno, S. (2008). Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front. Biosci.* **13**, 6693–6707.

- Zamore, P. D.; Tuschl, T.; Sharp, P. A.; Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25–33.
- Zamore, P. D.; Haley, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* **309**, 1519–1524.
- Zhang, Y.; Riesterer, C.; Ayrall, A. M.; Sablitzky, F.; Littlewood, T. D.; Reth, M. (1996). Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **24**, 543–548.

8 Abkürzungsverzeichnis

AJ	<i>Adherens Junctions</i>
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
aPKC	Atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	<i>Actin-related protein</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL19	<i>C-C motif chemokine ligand 19</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFA	<i>Colony formation assay</i> (Koloniebildungsversuch)
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CLSM	Konfokales Laserscanmikroskop
cpERM	C-terminal phosphorylierte Form von Ezrin, Radixin und Moesin
Cre	<i>Causes recombination</i>
DC	<i>Dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DEA	Diethanolamin
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
Dlg	<i>Discs large</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Dinukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E-Cadherin	Epithel-Cadherin
E. Coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i> (Epithelial-Mesenchymaler Übergang)
ER	Estrogenrezeptor
ERM	Ezrin, Radixin und Moesin
ES	Embryonale Stammzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)

Abkürzungsverzeichnis

F-Aktin	Filamentöses Aktin
Flox	<i>Flanked by loxP</i> (Flankiert von loxP)
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$); Gramm
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GMC	<i>Ganglion mother cell</i> (Ganglienmutterzelle)
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
GTP	Guanosintriphosphat
GUK	<i>Guanylate kinase-like</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hugl	<i>Human giant larvae</i>
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IS	Immunologische Synapse
Kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LAP	LRR and PDZ
LB	Luria-Broth
LCR	<i>Low complexity region</i>
Lgl	<i>Lethal giant larvae</i>
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i> (Leucin-reiche Wiederholungen)
LSM	Laserscanmikroskop
Lx	Lux
M	Molar
m	Milli
mA	Milliampere
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i> (Magnetische Zellsortierung)
MAGUK	<i>Membrane associated Guanylatkinase</i> (Membran-assoziierte Guanylatkinase)
mDC	<i>Mature dendritic cell</i> (Reife Dendritische Zelle)
MDCK	Madin-Darby canine kidney
mg	Milligramm
Mgl	Murine Lethal Giant Larvae
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplexes)
miRNA	Mikro-RNA
ml	Milliliter
mol	Mol
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
ms	Millisekunde

MTOC	<i>Microtubule organizing center</i> (Mikrotubuli-organisierendes Zentrum)
MW	<i>Molecular weight</i> (Molekulargewicht)
N-Cadherin	Neurales Cadherin
ng	Nanogramm
NOD-SCID	<i>Non-obese diabetic – severe combined immunodeficiency</i> (Nicht-fettleibig diabetisch – Schwere, kombinierte Immundefizienz)
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
oNPG	O-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
PACT	<i>PKR-activating protein</i>
Pals-1	<i>(Protein associated with Lin-7)-1</i>
Par	Partitioning defective
Patj	Pals1-associated tight-junction protein
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (Periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
P-Cadherin	Plazentales Cadherin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDL	Poly-D-Lysin
PDZ	PSD-95, Discs large und ZO-1
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PKR	dsRNA-aktivierte Proteinkinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pon	<i>Partner of Numb</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	Quantitative RT-PCR
RASSF	<i>Ras-associated factor</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RLU	<i>Relative light units</i> (Relative Lichteinheiten)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RP-II	RNA-Polymerase-II
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	<i>Real time; Reverse transcriptase</i> ; Raumtemperatur
Scrib	Scribble
SDF-1 α	<i>Stromal cell-derived factor-1α</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i> (kurze Haarnadel RNA)
siRISC	Aktivierter RISC
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> (kleine interferierende RNA)
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SWH	Salvador/Warts/Hippo

Abkürzungsverzeichnis

Tat	HIV-1 <i>transactivation responsive element</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCR	<i>T-cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THR	<i>Tomosyn homology region</i>
TJ	<i>Tight Junctions</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Tumor Nekrosefaktor α)
TRBP	Tat RNA- <i>bindig protein</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	<i>Volume per volume</i> (Volumen per Volumen)
Vil	Villin
w/v	<i>Weight per volume</i> (Gewicht per Volumen)
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i> (Wiskott-Aldrich Syndromprotein)
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous</i>
WD40	Tryptophan (W) Asparaginsäure (D) 40
Wt	Wildtyp
Yki	Yorkie
ZO	Zonula occludens
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung
β -Gal	β -Galactosidase
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen

Publikationen

Sieber S, Kashyap A, Strand S, Strand D (2012). Hugi-1 regulates lymphocyte polarity and motility. *Manuscript in preparation*.

Sertel S, Eichhorn T, **Sieber S**, Sauer A, Weiss J, Plinkert PK and Efferth T (2010). Factors determining sensitivity or resistance of tumor cell lines towards artesunate. *Chem Biol Interact* **185**, 42–52.

Sieber S, Gdynia G, Roth W, Bonavida B and Efferth T (2009). Combination treatment of malignant B cells using the anti-CD20 antibody rituximab and the anti-malarial artesunate. *Int J Oncol* **35**, 149–158.

Gdynia G, Lehmann-Koch J, **Sieber S**, Tagscherer KE, Fassl A, Zentgraf H, Matsuzawa S, Reed JC and Roth W (2008). BLOC1S2 interacts with the HIPPI protein and sensitizes NCH89 glioblastoma cells to apoptosis. *Apoptosis* **13**, 437–447.

Gdynia G, Grund K, Eckert A, Bock BC, Funke B, Macher-Goeppinger S, **Sieber S**, Herold-Mende C, Wiestler B and Wiestler OD, Roth W. (2007). Basal caspase activity promotes migration and invasiveness in glioblastoma cells. *Mol Cancer Res* **5**, 1232–1240.

Posterpräsentation

Sieber S, Efferth T, Bonavida B. Immunotherapy of Non-Hodkin's Lymphoma with Monoclonal Antibody Rituximab and Artesunate. The 2005-2006 UCLA MIMG Retreat, University of California, Los Angeles (UCLA), March 2006, Los Angeles, USA.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe.

(Datum, Unterschrift)