

Untersuchung zur Funktion des LIM-only Proteins FHL2 im Mammakarzinom



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaft

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Kai Kleiber
aus Hanau

Frankfurt am Main, 2008

(D 30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. V. Müller

Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn und Herr Prof. Dr. K. Strebhardt

Datum der Disputatio:

Angefertigt am
Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Arbeitskreis Prof. Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt
Unter der Betreuung von Dr. rer. nat. Bernd T. Martin

Für meine Eltern

“To a scientist, a thought experiment is an argument that you can run through in your head, after which you understand what's going on so well that there's no need to do a real experiment, which is of course a great saving in time and money and prevents you from getting embarrassingly inconvenient results.”

Terry Pratchett

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Das Mammakarzinom	8
1.2 Molekulare Grundlagen der Brustkrebsentstehung	9
1.3 Die Familie der LIM-Proteine	13
1.4 FHL2 im Tumor	16
1.5 Interaktionspartner von FHL2 die bei der Brustkrebsentstehung eine Rolle spielen	17
1.6 FHL2 in der Zellzyklusregulation	18
1.7 Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Verwendete Materialien und Geräte	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Enzyme	21
2.1.3 Antikörper	21
2.1.4 Konstrukte	22
2.1.4.1 Expressionsplasmide	23
2.1.4.2 shRNA Plasmide	24
2.1.4.3 siRNA	24
2.1.4.4 Primer	24
2.1.5 Bakterienstämme	24
2.1.6 Zelllinien	25
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.7.1 Trockenmaterialien	25
2.1.7.2 Flüssigkeiten und Agenzen	26
2.1.7.3 Kits	27
2.1.8 Laborgeräte	27
2.1.9 Software	29
2.2 Verwendete Lösungen und Puffer	29
2.2.1 Bakterien und DNA	29

2.2.3 Proteinisolation, Proteinexpression, Immunhistochemie und Western Blot	32
2.3 Molekularbiologische Methoden	37
2.3.1 Generierung kompetenter Zellen	37
2.3.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen	37
2.3.3 Isolation von Plasmid-DNA	38
2.3.4 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	38
2.3.5 Anlegen einer Gefrierkultur mit Bakterien	38
2.3.6 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	38
2.3.7 Enzymatischer Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	38
2.3.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA Fragmenten	39
2.3.9 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	39
2.3.10 Ligation	39
2.3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.3.12 Semiquantitative PCR	41
2.4 Zellkultur	41
2.4.1 Passagieren von Zellkulturlinien	42
2.4.2 Transfektion von Zelllinien	42
2.4.2.1 Transfektion von Plasmid-DNA	42
2.4.2.2 Transfektion von siRNA	42
2.4.3 Anlegen einer Gefrierkultur mit Mammaliazellen	42
2.4.4 Herstellung einer induzierbaren stabil FHL2-exprimierenden Zelllinie	43
2.5 Reporteranalysen	43
2.6 Immunoblot	44
2.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellkulturlinien	44
2.6.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus Tumorproben	44
2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	45
2.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	45
2.6.5 Western Blot	46
2.6.6 Coomassie-Färbung	46
2.6.7 Ponceau Färbung	46
2.6.8 Immunodetektion	47
2.6.9 „Strippen“ einer Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran)	47
2.7 Interaktionsstudien	47

2.7.1 <i>Pull-Down Assay</i>	47
2.7.2 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	48
2.7.3 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	48
2.8 Zellfärbungen	50
2.8.1 Immunfluoreszenz	50
2.8.2 Immunhistochemie.....	50
2.9 Proliferationsbestimmung von Zellen.....	51
2.10 Colony-Forming Assay	51
2.11 Zellzyklusbestimmung.....	52
2.11.1 Synchronisation von Zellen.....	52
2.11.2 Durchflusszytometrie mittels FACS-Analyse.....	52
3. Ergebnisse.....	54
3.1 Expression von FHL2 im Brustgewebe.....	54
3.1.1 Expression von FHL2 im primärem Mammakarzinom	54
3.1.2 Expression von FHL2 in Zellkulturlinien.....	55
3.2 Lokalisation von FHL2 im Brustgewebe	56
3.2.1 Primäres Mammakarzinom.....	56
3.2.2 Zellkulturlinien	57
3.3. Integration einer Expressionskassette in verschiedene Zelllinien.....	58
3.4 FHL2 im MAPK-Signaltransduktionsweg	61
3.5 Die FHL2-abhängige AP-1-Regulierung	66
3.6 Die Interaktion zwischen FHL2 und c-jun.....	71
3.7 Die Rolle von FHL2 in der Zellzyklusregulation	75
3.8 Die FHL2-abhängige p21-Regulation	84
3.9 Effekt der FHL2-abhängigen p21-Regulation auf CDE/CHR-regulierte Proteine	92
3.10 Effekt der FHL2-Expression auf zellmatrixunabhängiges Wachstum.....	94
4. Diskussion.....	97
4.1 FHL2 wird im Brustkrebs exprimiert	97

4.2 Das FHL2-Expressionsprofil verschiedener Brustkrebszelllinien	99
4.3 Die Lokalisation von FHL2 in der Krebszelle.....	100
4.4 FHL2 moduliert die c-jun-abhängige Transkription	101
4.5 FHL2 induziert die Expression von Cyclin D1, IL-6 und IL-8.....	103
4.6 FHL2 interagiert mit c-jun im Nukleus.....	105
4.7 FHL2 ist in die Zellzyklusregulation involviert	106
4.8 FHL2 reguliert p21 unabhängig von p53	107
4.9 p21 wird über FHL2 und den MAPK-Signaltransduktionsweg reguliert...	109
4.10 FHL2 reprimiert über p21 CDE/CHR-abhängige Proteine	110
4.11 FHL2 fördert zellmatrixunabhängiges Wachstum.....	111
5. Zusammenfassung	113
6. Literatur	115
7. Abkürzungsverzeichnis.....	123
8. Danksagung.....	126
9. Erklärung	128
10. Lebenslauf	129

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Krebs ist einer der führenden Todesursachen in westlichen Industrieländern und für circa 25% aller Todesfälle verantwortlich. Jedes Jahr wird bei 0,5% der Bevölkerung eine Krebsneuerkrankung diagnostiziert. Bei erwachsenen Männern ist dies vor allem Prostatakrebs, gefolgt von Lungen- und Darmkrebs. Bei Kindern sind Krebserkrankungen hingegen selten, treten aber dennoch auf. Am häufigsten ist hier die Leukämie vertreten. Es gibt jedoch eine Krebsart, das Rhabdomyosarkom, das aus dem Muskel abstammt und beinahe ausschließlich bei Kindern auftritt. Dieses Sarkom ist jedoch sehr selten und betrifft hauptsächlich Kinder bis ungefähr zum 14. Lebensjahr¹.

Die häufigsten Krebserkrankungen bei erwachsenen Frauen sind Brust-, Lungen- und Darmkrebs, wobei Lungenkrebs in beiden Geschlechtergruppen die höchste Mortalität besitzt².

Brustkrebs ist mit 47.000 Neuerkrankungen pro Jahr das am häufigsten diagnostizierte Malignom in der westlichen Welt und gleichzeitig die häufigste, durch Krebs verursachte Todesursache bei Frauen zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr³. Im Jahr 2005 war Brustkrebs für 502.000 Sterbefälle weltweit verantwortlich. Dies sind 7% aller Krebstoten und 1% aller Todesfälle⁴. Da das Brustgewebe bei Männern und Frauen identisch aufgebaut ist, kann auch bei Männern Brustkrebs auftreten, allerdings mit einer 100-fach geringeren Wahrscheinlichkeit. Die statistische Überlebensrate ist aber mit der bei Frauen vergleichbar⁵.

Man unterscheidet verschiedene Formen des Mammakarzinoms. Die häufigste Karzinomart ist mit 60-70% aller Fälle das invasive duktale Karzinom. Seltener hingegen sind das lobuläre (10-15%), medulläre (5%) und das tubuläre (2%) Mammakarzinom. Das invasive duktale Karzinom breitet sich in der Regel in den Milchgängen aus und bleibt anfangs auf die Brust beschränkt. Eine weitere, allerdings prämaligne Form ist das *Ductal Carzinoma in situ* (DCIS). Hierbei handelt es sich um eine nicht invasive Form des Mammakarzinoms, welches oft schon im Anfangsstadium erkannt wird und somit schnell behandelt werden kann.

Die Brustkrebsentwicklung wird in mehrere Stadien unterteilt. Beim Stadium 0 handelt es sich um das bereits erwähnte DCIS, welches selbst noch keinen Krebs

darstellt. Bei einem Auftreten des Karzinoms in situ besteht allerdings ein um 25% erhöhtes Risiko in den nächsten 25 Jahren an Brustkrebs zu erkranken. Wenn ein Tumor kleiner als 2 cm und noch nicht metastasiert ist, spricht man vom Stadium I. Im Stadium II ist der Tumor entweder bis zu 5 cm groß und kann bereits in die axillaren Lymphknoten metastasiert sein, bzw. ist er über 5 cm groß, aber noch nicht metastasiert. Beim Stadium III werden nochmals die Subkategorien A und B unterschieden. Im Stadium IIIA ist der Tumor bereits in die Lymphknoten unter den Achseln metastasiert, im Stadium IIIB ist dieser bereits in das umliegende Gewebe eingewandert. Hiervon betroffen können Haut und Brustkorb, einschließlich der Rippen und Muskeln sein. Wenn sich der Krebs über die Brust hinaus verbreitet und andere Organe befallen hat, spricht man vom Stadium IV. Dabei bilden sich in der Regel Metastasen in der Lunge, den Knochen, der Leber und Gehirn. Diese können sich aber auch lokal in der Haut, in den Lymphknoten des Nackens und in der Nähe des Schlüsselbeins ansiedeln. Natürlich spielen bei der Klassifizierung des Mammakarzinoms noch andere Faktoren neben der Tumorgröße, der Anzahl der befallenen Lymphknoten und der Invasivität eine Rolle. Es werden auch die Differenzierung des Hormonstatus (Östrogen und Progesteron), des Status des *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (Her2/neu) und das Alter des Patienten berücksichtigt⁶.

Die Entstehung von Brustkrebs kann von verschiedenen Faktoren, wie hormonelle Veränderungen, Umwelteinflüssen oder karzinogenen Substanzen, gefördert werden. Aber auch die genetische Prädisposition spielt eine wichtige Rolle, vor allem bei Tumorerkrankungen vor dem 35. Lebensjahr. Dabei ist meistens eine Mutation in den Tumorsuppressorgenen *Breast Cancer 1, early onset* und *Breast Cancer Type 2 susceptibility protein* (BRCA1 und BRCA2) oder p53 zu finden^{7,8}.

1.2 Molekulare Grundlagen der Brustkrebsentstehung

Eine der Hauptursachen des Wechsels vom normalen zum malignen Zellwachstum stellt die direkte oder indirekte Störung der Zellzyklusregulation dar. Dessen Deregulation führt zu einer ungehinderten Zellteilung, da bestimmte Kontrollmechanismen, welche Proliferation, Zellwachstum und Apoptose steuern, nicht mehr korrekt funktionieren⁹. Dadurch können sich benigne Tumore bilden, die zwar nicht mehr der normalen Wachstumskontrolle unterliegen, von denen aber in

der Regel keine gesundheitliche Gefahr ausgeht. Maligne Tumore dagegen besitzen, neben dem Verlust der Wachstumskontrolle, zudem die Eigenschaft in benachbartes Gewebe einzudringen und zu metastasieren. Dabei lösen sich Zellen vom Haupttumor, wandern in die Blutgefäße oder Lymphbahnen ein und bilden sekundäre Tumore in anderen Bereichen des Körpers aus. Das unkontrollierte Wachstum sowie die Invasivität können zum Funktionsausfall der betroffenen Organe und letztendlich zum Tod des Patienten führen.

Bei 30% der metastasierten Mammakarzinome ist eine Überexpression des Brustkrebsmarkers Her2/neu, auch ErbB-2 genannt, aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF)-Rezeptoren feststellbar. Er gehört zu den *orphan receptors* die nicht die üblichen Wachstumssignale, wie den EGF oder den transformierende Wachstumsfaktor (TGF), benötigen. Zur Aktivierung der Her2/neu-abhängigen Signalkaskade dimerisiert dieser mit einem anderen Rezeptor aus der ErbB-Familie, was letztendlich zur Expression proliferationsfördernder Zielgene führt^{10, 11}.

Bei 5% der Frauen sind erblich bedingte Ursachen für die Krebserkrankung mitverantwortlich. Dabei spielen die vier Tumorsuppressorgene BRCA1, BRCA2, p53⁷ und das *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM)¹² eine besondere Rolle. Bei einer Mutation des Tumorsuppressorgens p53 steigt die Wahrscheinlichkeit einer Tumorerkrankung um 10%, bei einer Mutation im BRCA1 oder BRCA2 Gen steigt diese sogar auf 85%¹³.

Die Mutation im BRCA1-Gen kann auf zwei verschiedenen Wegen zu einer Tumorerkrankung führen. BRCA1 kann als Koaktivator von p53 fungieren oder durch direkte bzw. indirekte Induktion der p14ARF-Expression eine Akkumulation von p53 verursachen. In beiden Fällen zeigt BRCA1-stabilisiertes p53 eine erhöhte sequenzspezifische DNA-Bindung und damit transkriptionelle Aktivität auf. Wenn aber BRCA1 oder p53 mutiert bzw. inaktiviert ist, wird der p53-abhängige Signaltransduktionsweg inhibiert⁸.

Letztendlich führen alle in der Onkogenese involvierten Schritte zu einer Deregulation der Zellzykluskontrolle. Der Zellzyklus kann in die zwei Hauptphasen, Mitose-Phase (M-Phase) und Interphase, eingeteilt werden. Die Interphase wird

weiter in G1-, S- und G2-Phase unterteilt. Wenn sich die Zelle im Ruhezustand befindet, z.B. wegen eines Mangels an Wachstumsfaktoren oder unzureichender Nährstoffversorgung, tritt sie in die G0-Phase ein. Bei Zugabe von Wachstumsfaktoren geht die Zelle in die G1-Phase und startet die Proteinsynthese. Nach der S-Phase, in der die DNA-Replikation stattfindet, folgt die G2-Phase, in der die Zelle auf die Mitose vorbereitet wird (Abbildung 1b)¹⁴.

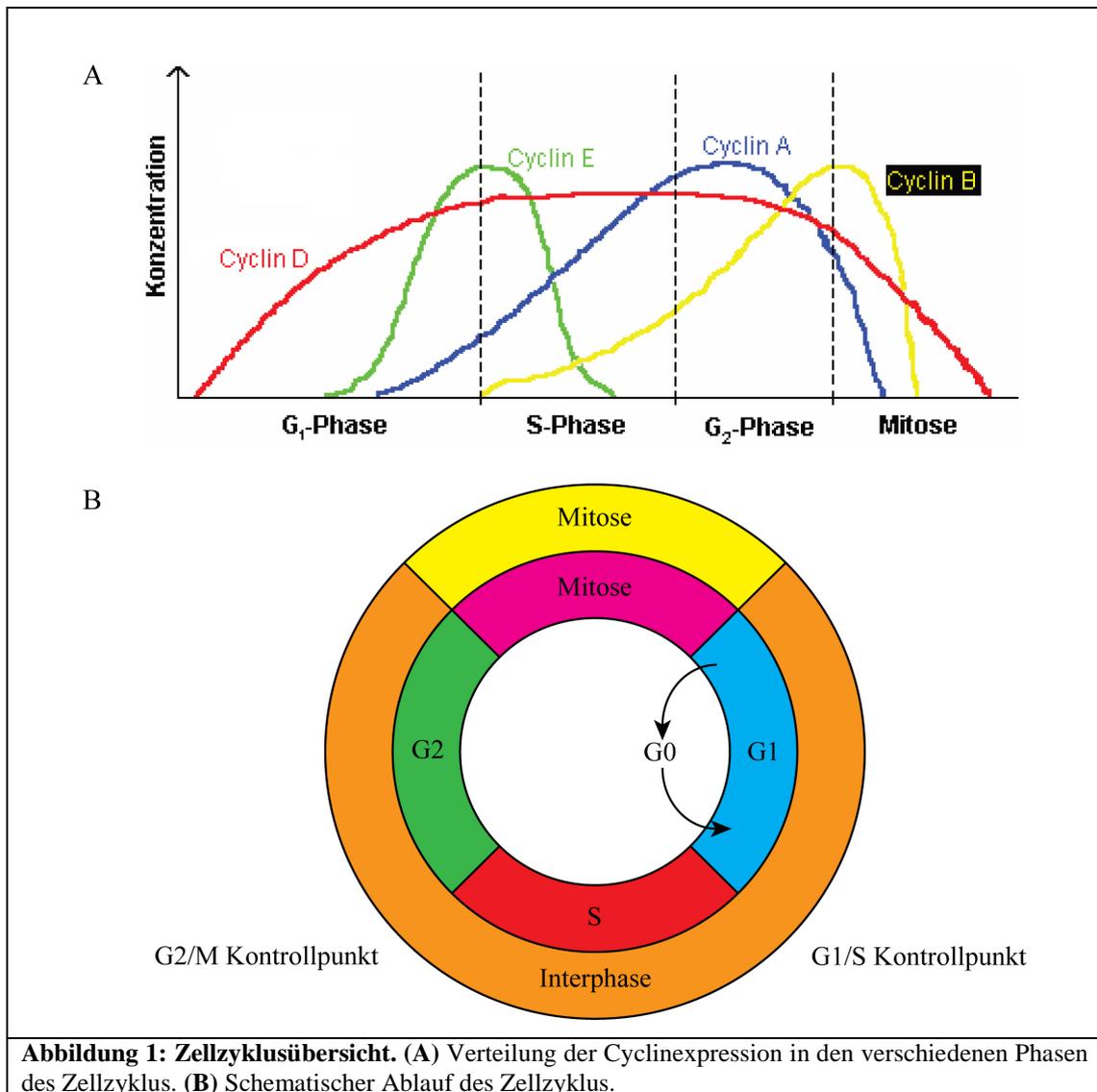
Um eine fehlerfreie Zellteilung zu garantieren, gibt es zwischen den einzelnen Phasen Kontrollpunkte. In diesen kann der Zellzyklus angehalten werden kann, solange nicht alle erforderlichen Schritte für die nächste Phase abgeschlossen sind. Wird zum Beispiel die DNA vor oder während der G2-Phase beschädigt, so wird der Zellzyklus erst nach der Reparatur des Defekts fortgesetzt. Falls die DNA so beschädigt ist, dass sich eine Reparatur als unmöglich erweist, geht die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose). Dadurch wird sichergestellt, dass keine geschädigten Zellen proliferieren und letztendlich entarten können¹⁵.

Bei der Krebsentstehung ist unter anderem die Regulation der Kontrollpunkte über die Cycline und CDKs sowie deren abhängige Proteine, wie p21 oder p53, defekt. Dies führt zu einem vorzeitigen Übergang in die S-Phase oder Mitose, obwohl noch nicht alle notwendigen Schritte abgeschlossen sind. Da alle Tumorzellen solche Kontrollpunktdefekte gemein haben, ist die Untersuchung und gegebenenfalls Wiederherstellung des Kontrollpunktübergangs ein interessanter Angriffspunkt für therapeutische Maßnahmen¹⁵.

Cycline spielen, zusammen mit den Cyclin-Dependent Kinases (CDKs), eine zentrale Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus. Die Familie der Cycline umfasst Cyclin D, Cyclin E, Cyclin A und Cyclin B, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellzyklusprogression exprimiert werden und somit die Kontrollpunkte regulieren (Abbildung 1a).

Ein wichtiger Gegenspieler der Cycline ist der p53-abhängige Zellzyklusinhibitor p21^{CIP/WAF} (nachfolgend p21 genannt). Es inhibiert Cyclin-*Cyclin-dependent Kinase* (CDK) Komplexe und somit die Zellzyklussteuerung. Daher führt ein Ausfall von p53 zu einer reduzierten Expression von p21, wodurch die Cyclin-CDK Komplexe permanent aktiv sind und den Zellzyklus vorantreiben¹⁶.

Das Zusammenspiel zwischen p53 und p21 spielt zudem eine essentielle Rolle bei der Regulierung von DNA-Schädigungen. Durch Chemotherapeutika oder Strahlung verursachte DNA-Schäden führen zu einem Zellzyklusarrest. Dieser gibt der Zelle die Möglichkeit, Defekte zu reparieren oder, wenn der Schaden zu groß ist, in den programmierten Zelltod (Apoptose) zu gehen. Einer der Hauptagonisten, der für die Steuerung dieser Prozesse nach einer DNA-Schädigung verantwortlich ist, ist das Tumorsuppressorprotein p53¹⁷. Dieses aktiviert über verschiedene Proteine, wie zum Beispiel die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie, den intrinsischen Apoptose-Signaltransduktionsweg¹⁸.



Obwohl p53 in 50% aller Karzinome nicht funktional ist und diese somit eine erhöhte Apoptoseresistenz gegenüber DNA-schädigenden Agenzien zeigen¹⁹, gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass einige Tumore trotz nichtfunktionellem p53 sensitiver gegenüber der Apoptose werden. Dies deutet auf eine anti-apoptotische Rolle für p53 hin²⁰⁻²². Der Mechanismus, welcher dem protektiven Effekt von p53 zugrunde liegt, ist bisher allerdings nicht bekannt. Wahrscheinlich spielen verschiedene p53-gesteuerte Proteine dabei eine Rolle, unter anderem 14-3-3²³, Slug²⁴ und vor allem der CDK Inhibitor p21^{25,26}.

p21 ist in der Lage, CDKs²⁷, und somit deren aktivierende Cycline, sowie den E2F Transkriptionsfaktor, der essentiell für den Eintritt der Zelle in ihre replikative Phase ist²⁶, zu inhibieren. Dies führt dazu, dass eine Überexpression von p21 die Zelle vor strahlungsinduzierter Apoptose schützen kann²⁸.

Obwohl p53 im allgemeinen als klassischer p21 Regulator gilt, sind inzwischen weitere p53-unabhängige Regulatoren für p21 bekannt, zum Beispiel SP1/3, Smads, BRCA1, E2F-1/E2F-3 und Ap2²⁹. Dies zeigt, dass Tumorzellen trotz inaktivem p53 über alternative Signaltransduktionswege p21 regulieren können.

1.3 Die Familie der LIM-Proteine

Die Signalweiterleitung in der Zelle wird über Protein-Protein-Wechselwirkung gewährleistet. Um solche Interaktionen zu vermitteln, benötigt ein Protein eine spezifische Erkennungssequenz bzw. Interaktionsdomäne, an die andere Proteine binden können. Eine typische Protein-Protein Interaktionsdomäne stellt dabei die aus zwei Zinkfingern bestehende LIM-Domäne dar.

Die LIM-Domäne ist ein Acronym aus Lin-11, Isl-1 und Mec-3. Lin-11 und Mec-3 stammen aus *Caenorhabditis elegans* und Isl-1 aus der Ratte. Sie ist cysteinreich, hat eine ungefähre Größe von 50 Aminosäuren und wird durch die folgende Konsensussequenz definiert:

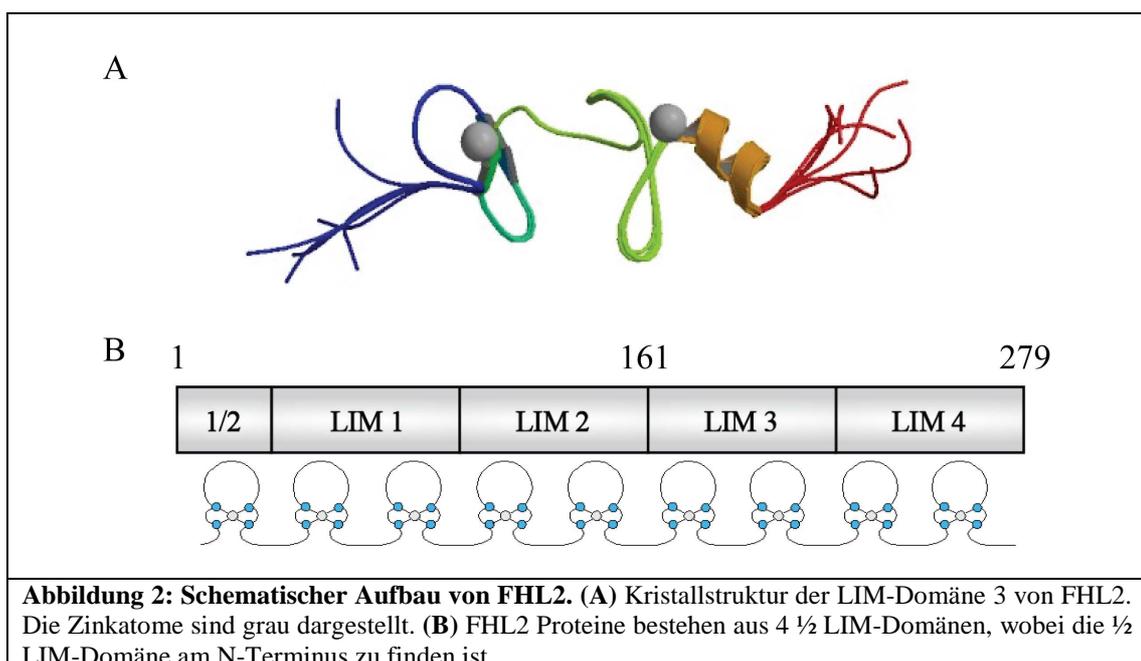
[C]-[X]₂₋₄-[C]-[X]₁₃₋₁₉-[W]-[H]-[X]₂₋₄-[C]-[F]-[LVI]-[C]-[X]₂₋₄-[C]-[X]₁₃₋₂₀-C-[X]₂₋₄-[C]

C = Cystein, F = Phenylalanin, H = Histidin, L = Leucin,
V = Valin, W = Tryptophan, X = beliebige Aminosäure

Eine LIM-Domäne besteht aus zwei, sich tandemartig wiederholenden Zinkfingermotiven (Abbildung 2a). NMR Studien der cytoplasmatischen LIM-Proteine CRP1 und CRIP haben gezeigt, dass ein Fingermotiv über vier Cysteinreste ein Zinkatom koordiniert und strukturelle Verwandtschaft zum GATA-ähnlichen Zinkfinger aufweist³⁰. Der zweite Zinkfinger koordiniert dagegen über ein Histidin und drei Cysteinreste ein Zinkatom, besitzt aber keine Ähnlichkeit mit dem GATA Zinkfinger. Ein Zinkfinger besteht also typischerweise aus zwei β -Faltblattstrukturen mit jeweils einem Cysteinrest und einer α -Helix mit jeweils einem Cystein- oder Histidinrest. Diese vier Aminosäuren binden mit ihren Seitenketten (SH bei Cystein und $C_3N_2H_4$ bei Histidin) an das zentrale Zinkatom. Zwischen den zinkbindenden Motiven befindet sich ein Bereich von ca. 16 – 24 Aminosäuren, der in seinem Aufbau variabel ist und die Bindungsspezifität der LIM-Domäne bestimmt.

LIM-Proteine gehören zu einer funktionell heterogenen Proteinfamilie, bei der man vier Klassen unterscheidet:

1. LIM-Proteine mit einer Homodomäne (LIM-hd-Proteine)
2. LIM-Domänen assoziiert mit einer Kinasedomäne (LIM-Kinasen)
3. Proteine mit einer C-terminalen LIM-Domäne
4. Proteine, die ausschließlich aus LIM-Domänen bestehen (LIM-only-Proteine)



LIM-hd-Proteine spielen in der Zelldetermination, der Morphogenese und Organogenese vor allem in der Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle. Ein Beispiel für ein LIM-hd-Protein ist Lhx1, welches die Entwicklung der anterioren Kopfstrukturen in Mäusen steuert³¹. LIM-Kinasen sind in der Lage, die Aktinpolymerisierung durch die Phosphorylierung von Cofilin zu regulieren^{32, 33}. Beispiele dieser Kinasen sind Lmk1 und Lmk2. Sie bestehen aus zwei N-terminalen LIM-Domänen, kombiniert mit einer C-terminalen Kinasedomäne³⁴⁻³⁷.

Viele weitere LIM-Proteine sind mit dem Aktin-Cytoskelett assoziiert, wo sie vorwiegend strukturelle Aufgaben erfüllen. Dazu gehören zum Beispiel Ril, Zyxin, Prickle und Paxillin. Ril besitzt nur eine LIM-Domäne, wogegen Prickle und Zyxin drei und Paxillin vier LIM-Domänen an ihrem C-terminalen Ende aufweisen^{38, 39}.

LIM-only Proteine bestehen strukturell ausschließlich aus LIM-Domänen und können verschiedene Aufgaben in der Zelle übernehmen. Sie fungieren als transkriptionelle Kofaktoren, wobei sie unter anderem auch wichtige Aufgaben in der Onkogenese übernehmen⁴⁰. Eine Subklasse der LIM-only Proteine sind die FHL Proteine (Four and a Half LIM). Sie bestehen aus viereinhalb LIM-Domänen und besitzen somit neun Zinkfinger-Motive (Abbildung 2b). Aus der FHL-Familie sind bisher fünf Mitglieder bekannt: FHL1, FHL2, FHL3, FHL4 und ACT (activator of CREM in testis), wobei FHL2 das bisher am gründlichsten untersuchte ist (Tabelle 1). Obwohl die LIM-Domäne der LIM-only Proteine Ähnlichkeit mit der DNA Bindedomäne DNA-bindender Proteinen aufweist³⁸, konnte bisher keine direkte Interaktion von LIM-only Proteinen mit der DNA nachgewiesen werden⁴¹⁻⁴³. LIM-only-Proteine spielen, neben ihrer Rolle als Adapterproteine, vor allem als Kofaktoren bei der Transkriptionsregulation eine Rolle und sind auch nur in bestimmten Geweben anzutreffen^{44, 45}.

Protein	Synonym	Lokalisation
FHL1	SLIM1	Skelettmuskel ⁴⁶ (Loughna <i>et al.</i> 2000)
FHL2	SLIM 3, DRAL	Herzmuskel, Niere, Tumore ⁴⁷ (Genini <i>et al.</i> 1997)
FHL3	SLIM2	Skelettmuskel ⁴⁸ (Morgan und Madgwick 1999)
FHL4		Testis ⁴⁸ (Morgan und Madgwick 1999)
ACT		Testis ⁴⁹ (Morgan und Whawell 2000)

Tabelle 1: Synonyme und hauptsächliche Lokalisation der LIM-only Proteine mit viereinhalb Domänen

1.4 FHL2 im Tumor

Das Proteinexpressionsprofil in bisher untersuchten Tumoren unterscheidet sich von dem im gesunden Gewebe. Dies gilt auch für FHL2. In vielen Organen gibt es einen signifikanten Unterschied im FHL2-Status zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe. Ursprünglich wurde FHL2 in einem Substraktionsansatz von Myoblasten und Rhabdomyosarkomzellen identifiziert⁴⁷. Im normalen Muskelgewebe fand sich dabei eine hohe FHL2-Expressionsrate, im Rhabdomyosarkom hingegen nicht. Dies führte zum ursprünglichen Namen DRAL (Down-Regulated in Rhabdomyosarkoma LIM-Protein) und zur anfänglichen Klassifizierung als potentieller Tumorsuppressor. Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass FHL2 nicht nur im Herz- und Skelettmuskel exprimiert wird, sondern in einer Vielzahl verschiedener Gewebe vorkommt^{44, 45}. Dabei unterscheidet sich das Expressionsprofil von FHL2 bei gesundem Gewebe und Tumorgewebe. In einigen gesunden Geweben, z.B. im Muskel⁴⁷ oder in der Prostata⁴², wird FHL2 exprimiert. Wenn diese Gewebe aber entarten, kann kein FHL2 mehr detektiert werden. Das Gegenteil ist in einer Vielzahl von Tumoren zu beobachten, zum Beispiel im Mamma-⁵⁰, Kolon-^{51, 52} oder Bronchialkarzinom⁵³. Hier findet sich im gesunden Gewebe kein FHL2, wohl aber im Karzinom. Eine Übersicht der FHL2 Expression in ausgewählten Organen findet sich in Tabelle 2.

Gewebe	Normal	Entartet
Brust ⁵⁰	-	+
Darm ^{51, 52}	-	+
Lunge ⁵³	-	+
Muskel ^{43, 47}	+	-
Gebärmutter ⁵⁴	-	+
Prostata ⁵⁵	+	-
Haut ⁵⁶	?	+

Tabelle 2: Expressionsprofil von FHL2 im Tumor und gesundem Gewebe

1.5 Interaktionspartner von FHL2 die bei der Brustkrebsentstehung eine Rolle spielen

Das Expressionsprofil von FHL2 lässt keine klare Aussage darüber zu, ob es sich bei diesem Protein um ein Onkoprotein oder ein Tumorsuppressorprotein handelt. Wie bereits erwähnt, ist FHL2 in einigen Tumoren, im Vergleich zum gesunden Gewebe, überexprimiert, wogegen in anderen Tumoren die FHL2-Expression bei der Onkogenese aufgehoben wird. Diese duale Funktion ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es sich bei FHL2 um einen transkriptionellen Kofaktor handelt, welcher in der Lage ist, mit vielen Proteinen zu interagieren und dessen Funktion zu modulieren. Inzwischen sind eine Vielzahl von krebsrelevanten Interaktionspartnern von FHL2 bekannt, unter anderem das Onkogen BRCA-1⁵⁷, β -Catenin^{43, 52}, p53⁵⁸ und c-jun^{59, 60}. Eine weitere Auswahl verschiedener Interaktionspartner findet sich in Tabelle 3.

Eine Besonderheit von FHL2 ist, dass es eine duale Funktion als transkriptioneller Aktivator oder Repressor, abhängig vom Gewebe in der das Protein exprimiert wird, einnehmen kann. Im Muskel wurde FHL2 als Interaktionspartner von β -Catenin identifiziert, wo es als Ko-Repressor fungiert⁴³. In Leberzellen hingegen führt die Interaktion von FHL2 mit β -Catenin zu einer transkriptionellen Aktivierung⁵². Aufgrund dieser dualen Funktion, die FHL2 mit verschiedenen Partnern einnehmen kann, ist die Auswirkung einer Interaktion nicht vorherzusagen.

Interaktionspartner	Funktion	Referenz
Androgen Receptor ⁴²	Ko-Aktivator	Müller <i>et al.</i> 2000
AP-1 (c-jun) ⁵⁹	Ko-Aktivator	Morlon and Sassone-Corsi 2003
BRCA1 ⁵⁷	unbekannt	Yan <i>et al.</i> 2003
CBP/p300 ⁶¹	Ko-Aktivator	Labalette <i>et al.</i> 2004
CDC47 ⁶²	unbekannt	Chan <i>et al.</i> 2000
E4F1 ⁶³	Ko-Repressor	Paul <i>et al.</i> 2006
ERK2 ⁶⁴	Ko-Repressor	Purcell <i>et al.</i> 2004
Estrogen Receptor alpha ⁶⁵	unbekannt	Kobayashi <i>et al.</i> 2004
FOXO1 ⁶⁶	Ko-Repressor	Yang <i>et al.</i> 2005
HIPK2 ⁵⁸	Ko-Aktivator	Lee <i>et al.</i> 2006
Pp125FAK ⁵⁴	unbekannt	Gabriel <i>et al.</i> 2004
SKI ⁵⁶	Ko-Aktivator	Chen <i>et al.</i> 2003
β 1-Integrin ⁶⁷	unbekannt	Wixler <i>et al.</i> 2000
β -Catenin ^{43, 52}	Ko-Repressor Ko-Aktivator	Martin <i>et al.</i> 2002 Wei <i>et al.</i> 2003

Tabelle 3: Funktion von FHL2 bei der Interaktion mit ausgewählten Partnern

1.6 FHL2 in der Zellzyklusregulation

Ein erstes Anzeichen für eine Rolle von FHL2 im Zellzyklus ist die Interaktion mit CDC47⁶². CDC47 gehört zu der Familie der MCM-Proteine (Mini Chromosome Maintenance), die in der frühen Phase der chromosomalen DNA-Replikation eine Rolle spielen. Dabei wird CDC47 während der Mitose in den Kern importiert und interagiert dort mit FHL2, bis es zum Beginn der S-Phase wieder aus dem Kern exportiert wird^{62, 68}. Welche Rolle FHL2 als Interaktionspartner von CDC47 spielt, ist bisher nicht bekannt.

FHL2 beeinflusst den Zellzyklus nicht ausschließlich über die Interaktion mit zellzyklusregulierenden Proteinen. Durch Zusammenspiel mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren kann FHL2 zudem die Aktivität verschiedener Signaltransduktionswege modulieren. Über die Interaktion mit β -Catenin moduliert FHL2 zum Beispiel den WNT-Signaltransduktionsweg und die nachfolgende, über die Regulation der TCF/CRE Promotorregion gesteuerte Cyclin D1-Expression^{43, 69}.

Ein weiterführender Einfluss von FHL2 auf den Zellzyklus zeigt sich in der Einbindung in den *Mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Signaltransduktionsweg^{60, 64} und damit auf den Transkriptionsfaktor c-jun⁵⁹. Der MAPK-Signaltransduktionsweg und der darin involvierte AP-1-Transkriptionsfaktor, der, unter anderem, aus einem fos/jun Heterodimer bzw. einem jun/jun Homodimer besteht, ist an vielen regulatorischen Prozessen des Zellzyklus beteiligt^{70, 71}. Dies wird vor allem durch die Expressionssteuerung verschiedener Zielproteine, wie zum Beispiel p16, p53, Cyclin D1 und p21, erreicht^{72, 73}.

FHL2 ist nicht nur potentiell in der Lage, Cyclin D1 über zwei unabhängige Signalwege zu regulieren^{69, 73}, es übt auch einen Einfluss auf weitere zellzyklusspezifische Proteine aus.

1.7 Ziel der Arbeit

Es konnte bereits gezeigt werden, dass FHL2 bei der Entartung von gesundem Gewebe eine Rolle spielt⁴⁴. Wie bereits erwähnt, ist es im Rhabdomyosarkom, im Gegensatz zu normalen Muskelzellen, reduziert⁴⁷, im Mammakarzinom jedoch überexprimiert⁵⁰. Durch die Beteiligung von FHL2 in verschiedenen Signaltransduktionswegen ist bekannt, dass FHL2 selbst mit dem gleichen Interaktionspartner sowohl aktivierend, als auch inhibierend wirken kann^{43, 74}. Aufgrund der Fähigkeit, die Aktivität von Signaltransduktionswegen und Transkriptionsfaktoren zu modulieren, beeinflusst FHL2 die Expression verschiedener krebsrelevanter Proteine⁴⁴ und agiert dabei sowohl als Onkoprotein als auch als Tumorsuppressor. Da FHL2 nicht nur die Expression zellzykluspezifischer Proteine reguliert sondern auch mit solchen interagiert, trägt FHL2 wahrscheinlich zur Onkogenese bei^{60, 69}.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle von FHL2 im Mammakarzinom genauer beleuchtet werden. Hierfür soll das Expressionsprofil von FHL2 im Mammakarzinom, im gesunden Brustepithel und in Mammakarzinomzelllinien bestimmt werden. In welchem Maße FHL2 eine Rolle in der Onkogenese spielt, soll vor allem unter der Berücksichtigung verschiedener krebsrelevanter Signaltransduktionswege untersucht werden. Dabei soll besonderes Augenmerk auf der Steuerung des Zellzyklus liegen. In weiteren Studien steht der Effekt der FHL-abhängigen Expression verschiedener Regulatoren und derer nachgeschalteten Faktoren im Vordergrund.

Mittels Western-Blot Analysen und Reportergenanalysen soll der Einfluss von FHL2 im MAPK-Signaltransduktionsweg im allgemeinen und c-jun im speziellen, sowie die Regulationsmechanismen der c-jun- und FHL2-abhängigen Zellzyklusregulation auf Promotorebene untersucht werden. Des Weiteren soll das FHL2-abhängige phänotypische Verhalten von Krebszellen sowohl durch die stabile Integration eines FHL2-Expressionsplasmids in FHL2-negativen Zellen, als auch durch die stabile Integration einer shRNA-Kassette gegen FHL2 in FHL2-überexprimierenden Zellen bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs; CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in der Qualitätsstufe p.a. bezogen.

2.1.2 Enzyme

Für die Reaktionen mit folgenden Enzymen wurden die von den jeweiligen Herstellern mitgelieferten Puffer verwendet und die angegebenen Reaktionsbedingungen berücksichtigt.

Enzym	Charakterisierung	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI	Restriktionsendonuklease	NEB (Schwalbach)
Benzonase	Restriktionsendonuklease	Merck (Darmstadt)
CIP	Phosphatase	NEB (Schwalbach)
<i>Dpn</i> I	Restriktionsendonuklease	NEB (Schwalbach)
<i>EcoRI</i>	Restriktionsendonuklease	NEB (Schwalbach)
Lysozym	Hydrolase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Not</i> I	Restriktionsendonuklease	NEB (Schwalbach)
<i>Pfx</i> -Polymerase	DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Reverse Transkriptase	Reverse Transkriptase	Stratagene (Ja Jolla)
T4-Ligase	DNA-Ligase	NEB (Schwalbach)
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA-Polymerase	NaTuTec (Frankfurt)
<i>XhoI</i>	Restriktionsendonuklease	NEB (Schwalbach)

2.1.3 Antikörper

Folgende primäre und sekundäre Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper, die gegen Maus IgG und Kaninchen IgG gerichtet sind, wurden eingesetzt:

Antigen	Charakteristik	Spezies	Bezeichnung	Bezugsquelle/ Referenz
Aktin	Monoklonal	Maus	AS441	Sigma-Aldrich
CDC25A	Monoklonal	Maus	Sc-7389	Santa Cruz
CDC25C	Monoklonal	Maus	Sc-13138	Santa Cruz
c-jun	Polyklonal	Kaninchen	Sc-1694	Santa Cruz
c-jun	Monoklonal	Kaninchen	#1965	Cell Signaling
Cyclin D1	Monoklonal	Maus	Sc-450	Santa Cruz
Cyclin D2	Polyklonal	Kaninchen	Sc-754	Santa Cruz
Cyclin E	Monoklonal	Maus	Sc-248	Santa Cruz
FHL2	Monoklonal	Maus	F4B2-B11	Dr. Victor Wixler
FHL2	Polyklonal	Kaninchen		Dr. Bernd Martin
MEKK1	Polyklonal	Kaninchen	Sc-252	Santa Cruz
p21	Monoklonal	Maus	#2946	Cell Signaling
p21	Monoklonal	Maus	Sc-817	Santa Cruz
p53	Monoklonal	Maus	Sc-126	Santa Cruz
p-JNK	Monoklonal	Maus	Sc-6254	Santa Cruz
Plk1	Monoklonal	Maus	Sc-17783	Santa Cruz
p-p44/42 MAP	Monoklonal	Maus	#9102	Cell Signaling
p-P53 (Ser15)	Monoklonal	Maus	#9286S	Cell Signaling
RB-Protein	Monoklonal	Maus	Sc-102	Santa Cruz
Sekundärantikörper	Meerrettich- peroxidase gekoppelt	Anti Kaninchen IgG	Sc-2030	Santa Cruz
Sekundärantikörper	Meerrettich- peroxidase gekoppelt	Anti Maus IgG	Sc-2031	Santa Cruz
Tubulin	Monoklonal	Maus	CLT9002	Cedarlane
X-press	Monoklonal	Maus	R91025	Invitrogen

2.1.4 Konstrukte

Folgende Plasmide und siRNA wurden in den Versuchen eingesetzt. Alle verwendeten Konstrukte wurden in Wasser oder TE-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.1.4.1 Expressionsplasmide

Name	Plasmid	Referenz/Bezugsquelle
c-jun	pRSV	Dr. Victor Wixler, Universität Münster
ERK2		Dr. Aria Baniahmad, Universität Gießen
FHL2 161-279	pcDNA/His3.1	Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
FHL2 3-161	pcDNA/His3.1	Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
FHL2 Xpress	pcDNA/His3.1	Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
GST-FHL2		Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
GST-FHL2 113-279		Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
GST-FHL2 161-279		Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
GST-FHL2 20-161		Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
GST-FHL2 20-279		Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
GST-FHL2 3-161		Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
hFHL2		Dr. Victor Wixler, Universität Münster
MEK5		Dr. Aria Baniahmad, Universität Gießen
MKK7		Dr. Aria Baniahmad, Universität Gießen
p21	pcDNA/His3.1	
p38		Dr. Aria Baniahmad, Universität Gießen
p53	pFC	Stratagene (Ja Jolla)
pAP-1-IL2-Luc		Dr. Monika Raab, Universität Frankfurt
pAP-1-Luc		Stratagene (Ja Jolla)
pcDNA3.1/His A		Invitrogen
pFC-MEKK1	pFC	Stratagene (Ja Jolla)
plkLuc	pGL2	Dr. Bernd Martin, Universität Frankfurt
pP21Luc 2,5 kb	pGL4.1	Anna Saramäki, University of Birmingham
pP21Luc 5,0 kb	pGL4.1	Anna Saramäki, University of Birmingham
pP53-Luc		Stratagene (Ja Jolla)

2.1.4.2 shRNA Plasmide

Die shRNA Plasmide wurden bei Biomol entworfen und bestellt. Die Konstrukte basieren auf dem sureSilence Plasmid von Promega.

Name	Sequenz	Beschreibung
shFHL2-1	CCCTGCTATGAGAAACAACAT	shRNA gegen hFHL2
shFHL2-2	GGAATGCAAGAAGACCATCAT	shRNA gegen hFHL2
shFHL2-3	TTCACAGCTCGCCATGACTTT	shRNA gegen hFHL2
shFHL2-4	GCACTGGCATGAAGCCTGTTT	shRNA gegen hFHL2
shSCR	GGAATCTCATTTCGATGCATAC	shRNA Kontrolle

2.1.4.3 siRNA

Die siRNA gegen p21 und p53 wurden bei Santa Cruz bestellt, die siRNA gegen FHL2 sowie die Kontrollsequenzen wurde von Invitrogen konstruiert und generiert.

Name	Sequenz/Produktnummer	Beschreibung	Firma
siP21	sc-29427	siRNA p21	Santa Cruz
siP53	sc-29435	siRNA p53	Santa Cruz
siFHL2	ACUGAGCGCUUUGACUGCCACCAUU	siRNA FHL2	Invitrogen
siSCR	unbekannt	Kontrolle	Invitrogen

2.1.4.4 Primer

Alle Primer wurden bei Qiagen, Hilden bestellt.

Name	Sequenz
p21-Primer	5' -CAC CAC TGA GCC TTC CTC AC-3' 5' -CTG ACT CCC AGC ACA CAC TC-3'
GAP-DH	5' -TAA AGG GCA TCC TGG GCT ACA CT-3' 5' -TTA CTC CTT GGA GGC CAT GTA GG-3'
IL-6	5' -ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GCC-3' 5' -CTA CAT TTG CCG AAG AGC CCT CAG-3'
IL-8	5' -ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GC-3' 5' -TTA TGA ATT CTC AGC CCT CTT-3'

2.1.5 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden für Transformationen benutzt. Sie wurden in Glycerin schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Stamm	Genotyp
Dh5 α	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁻) <i>supE44</i> , <i>thi</i> ⁻ , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , 80dlacI ^q ZD M15
BL21 (DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (r _B ^{-m} _B -) <i>dcm</i> , <i>gal</i> , lambda (DE3), pLysS (Cm ^r)

2.1.6 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden eingesetzt. Alle wurden gemäß Datenblatt bei 37 °C und 5 % CO₂ sowie mit den angegebenen, spezifischen Nährmedien versorgt.

Zelllinie	Zellart	Bezugsquelle
BT474	Mammakarzinom	ATCC
BT594	Mammakarzinom	ATCC
C2C12	Muskelvorfürerzellen	ATCC
DU4475	Mammakarzinom	ATCC
EFM-192A	Mammakarzinom	ATCC
EFM-192B	Mammakarzinom	ATCC
HeLa	Ovarialkarzinom	ATCC
MCF7	Mammakarzinom	ATCC
MDA-MB 231	Mammakarzinom	ATCC
MTSV1-7	Gesundes Brustepithel	Dr. Jiri Bartek
SKBR3	Mammakarzinom	ATCC
T47D	Mammakarzinom	ATCC

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

2.1.7.1 Trockenmaterialien

Autoklavierband (Roth, Karlsruhe)

Blot-Papier (Schleicher und Schuell, Dassel)

Combitips plus 5 ml; 10 ml; 50 ml (Eppendorf, Köln)

Costar Stripette 1 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml (Corning Incorporated, USA)

Disposable Scalpel No. 10 (Produkte für die Medizin AG, Köln)

Falcon[®]: 15 ml, 50 ml (Becton-Dickinson, Heidelberg)
Filterpapier (Merck, Darmstadt)
Gewebekulturschalen: 10 cm; 15 cm; 96well; 48well; 24well; 12well; 6well (Greiner, Solingen)
Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Immobilon[™]-P Transfer (PVDF-) Membranes (Millipore, Schwalbach)
Kanülen (Microlance; Becton-Dickinson, Heidelberg)
Küvetten (Brand, Wertheim)
Lysis Puffer (Promega, Mannheim)
Multipette[®] plus (Eppendorf, München)
Non-Sterile Latex Examination Gloves (Ansell, München)
Parafilm (American National Can[™], Menasha, USA)
Safe-Lock Tubes 1,5 ml; 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)
Spritzen: Omnifix-F 1 ml (Braun, Melsungen)
Sterilfilter: Stericup 50 ml; 500 ml; 1000 ml (Millipore, Eschborn)
Super Sensitive Detection Kit (Bio Genex, USA)

2.1.7.2 Flüssigkeiten und Agenzen

Aquatex (Merck, Deutschland)
BIO-Rad Protein Assay-Lösung (BIO-Rad, München)
DMEM High Glucose (Cambrex)
DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Doxorubicin (Merck Biosciences, Darmstadt)
FCS (Fetal Calf Serum) (BD Biosciences, Heidelberg)
FuGENE Transfektionsreagenz (Roche, Mannheim)
Glutamin (Gibco, Karlsruhe)
Hygromycin (BD Biosciences, Palo Alto)
Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe)
Molekulargewichtsmarker für DNA-Fragmente 1 kb (NEB Schwalbach)
Molekulargewichtsmarker für DNA-Fragmente 100 bp (NEB Schwalbach)
Molekulargewichtsmarker für Proteine (Santa Cruz, Heidelberg)
Molekulargewichtsmarker für Proteine, M-Marker (BIO-Rad, München)
PD98059 (Merck Biosciences, Darmstadt)

Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe)
Proteaseinhibitor-Cocktail Complete™ (Roche, Mannheim)
Protein A Agarose (Santa Cruz)
Protein A/G Agarose (Santa Cruz)
Roti-Load 1 ml 4x konz. (Roth, Karlsruhe)
SP600125 (Merck Biosciences, Darmstadt)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Pierce, Bonn)

2.1.7.3 Kits

CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (ProMega, Mannheim)
DNA Gel Extraktion Kit (Millipore, Eschborn)
GenElute™ High Performance (HP) Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich)
Luciferase Assay Substrate (Promega, Mannheim)
PureYield Plasmid Midprep (Promega, Mannheim)
QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)
QIAfilter Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden)
RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

2.1.8 Laborgeräte

12-Kanal Pipette 5-200 µl (Eppendorf, Hamburg)
Bakterienschüttler Certomat BS-1 (B. Braun, Melsungen)
Blotting-Apparatur Mini Transfer-Blot Transfer Cell (BIO-Rad, München)
Brutschrank 37 °C Kelvitron (Heraeus, Hanau)
Brutschrank BBD 6060 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank BBD 6220 (Heraeus, Hanau)
CELLQuest (BD Biosciences, Heidelberg)
Elektrophoreseapparatur Mini-Protein III (BIO-Rad, München)
Elektrophoreseapparatur Mini-Sub Cell GT (BIO-Rad, München)
Entwicklermaschine Optimax Typ TF (MS Laborgeräte, Wiesloch)
Filmkassette X-Omatic® (Kodak, Stuttgart)
Gefrierschrank -20 °C (Liebherr, Ochsenhausen)
Gefrierschrank -80 °C (Revco Scintific, Veenendal/Niederlande)

Geltrockner Model 583 Gel Dryer (BIO-Rad, München)
Gummikratzer (Sigma, Taufkirchen)
Kühlschrank +4 °C (Liebherr, Ochsenhausen)
Magnetrührer Ikamak RTC (IKA Labortechnik, Staufen)
Mikro-Dismembrator II (B. Braun, Melsungen)
Mikrowellengerät (Bosch, Stuttgart)
Multipette (Eppendorf, Hamburg)
Netzgerät Power PAC 300 (BIO-Rad, München)
pH-Meter Mikroprozessor pH-Meter HI9321 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
Pipetten 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl
(Eppendorf, Hamburg)
Pipettierhilfe Automatic Sarpetta (Gesaga, Wiesloch)
QIA Vac 24 Vacuum Manifold (Qiagen, Hilden)
QIArack (Qiagen, Hilden)
Rotator (Fischer-Scientific, Nidderau)
Schüttler (Fischer-Scientific, Nidderau)
SpeedVac SVC100 Vakuumpumpe (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt/M.)
Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Sterilbank HB2448 (Heraeus, Hanau)
Sterilbank HERAsafe (Heraeus, Hanau)
Stickstoffbehälter (AirLiquide, Wiesbaden)
Thermoblock DRI-Block BB-3A (Techne, Burkhardtsdorf)
Thermo-Cycler (Eppendorf, Hamburg)
Thermo-Cycler (Perkin Elmer Cetus, Köln)
Transilluminator (Vilber Lourmat, Frankreich)
Trockenschrank 6200 (Heraeus, Hanau)
VacConnector (Qiagen, Hilden)
Vakuumpumpe Membranpumpe (Vacuumbrand GmbH + Co., Wertheim)
Vakuumentrifuge RT100 (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt/M.)
Vortex Janke & Kunkel (Ika Labortechnik, Staufen)
Waage Mettler PM 2000 (Mettler Instruments GmbH, Gießen)
Wasserbad groß (Mettler, Schwabach)
Wasserbad klein (Mettler, Schwabach)

XCell SureLock Mini-Cell Blottingapparatur (Invitrogen, Karlsruhe)

Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Zentrifuge Rotanta/RPC (Hettich, Tuttlingen)

2.1.9 Software

Adobe Illustrator CS2, Adobe

Corel Paint Shop Pro, Corel

Endnote X1, Thomson

ImageJ, Wayne Rasband

Microsoft Office 2003, Microsoft

ModFIT LT, Verity Software House

OpenOffice 2.4.1

2.2 Verwendete Lösungen und Puffer

2.2.1 Bakterien und DNA

11x DNA-Probenpuffer

10 mM EDTA (v/v)

75% Glycerol (v/v)

0,1% Bromphenolblau (w/v)

ad 2 ml H₂O bidest.

50x TAE Puffer

2 M Tris

0,05 M EDTA

1 M Eisessig

Agaroselösung für ein (x) %iges Gel (100 ml)

(x)g Agarosegel in 100 ml 1% TAE aufkochen und anschließend Gel gießen

Ampicillin Stammlösung

1 g Ampicillin

add 10 ml H₂O bidest

sterilfiltrieren, 1 ml Aliquots bei -20 °C lagern

einsetzen im Verhältnis 1:1000

Ethidiumbromid-Färbelösung (1 l)

100 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)
ad 1 l 1x TAE

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid (EtBr) in 1x TAE

Kanamycin Stammlösung 50 mg/ml

500 mg Kanamycin
add 10 ml H₂O bidest
sterilfiltrieren, 1 ml Aliquots bei -20 °C lagern
einsetzen im Verhältnis 1:1000

LB-Agarplatten

LB-Medium mit 1,5 % Bacto Agarosegel
autoklavieren

LB-Medium

1 % Casein-Hydrolysat (Peptone) (w/v)
0,5 % Cacto-Hefe-Extrakt (w/v)
1 % NaCl (w/v)
pH 7,0, mit NaOH einstellen
autoklavieren

Na-Acetat

3 M NaAc
in H₂O bidest. lösen
mit Essigsäure (96%) auf pH 5,2 einstellen

SOB Medium (1 l)

2 % Casein-Hydrolysat (Peptone) (w/v)
0,5 % Bacto-Hefe-Extrakt (w/v)
0,05 % NaCl (w/v)
add 950 ml H₂O bidest
pH mit HCl oder NaOH auf 7,0 einstellen
2,5 mM KCl
add 1 l H₂O bidest
autoklavieren
5 ml (2 M) MgCl₂ (steril, frisch hinzugeben)

TE Puffer

10 mM Tris pH 7,5

TFB I Puffer

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM CH₃COOH
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin (v/v)
sterilfiltrieren und bei +4 °C lagern

TFB II Puffer

10 mM MOPS pH 7,5
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % Glycerin (v/v)
Einstellen auf pH 6,8
sterilfiltrieren und bei +4 °C lagern

2.2.2 Zellkultur

Colony Forming Assay, Bottom Agar

2% low melting Agarose in H₂O bidest
Autoklavieren und im Wasserbad auf 37 °C abkühlen
Zugabe von 37 °C warmem Medium zu einer Endkonzentration von 1,6% Agarose
Gießen in eine Zellkulturschale

Colony Forming Assay, Top Agar

3% low melting Agarose in Wasser
Autoklavieren und im Wasserbad auf 37 °C abkühlen
Zugabe von 37 °C warmem Medium mit abtrypsinierten Zellen zu einer
Endkonzentration von 0,3% Agarose
Gießen auf das *Bottom Agar*

Inhibitoren und Agenzen

PD98059 (ERK-Inhibitor) in DMSO (eingesetzt zu einer Endkonzentration von 50
µM)
SP600125 (JNJ-Inhibitor) in DMSO (eingesetzt zu einer Endkonzentration von 20
µM)
Doxorubicin in Wasser (eingesetzt zu einer Endkonzentration von 3,4 µM)

Zellkulturmedium

DMEM High Glucose
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % Glutamin
10 % FCS

Zellkulturmedium für stabile MDA-MB 231 siFHL2 und MCF7-FHL2 Klone

DMEM High Glucose
1 % Penicillin/Streptomycin
2 % Glutamin
10 % FCS
800 µg/ml Hygromycin

2.2.3 Proteinisolation, Proteinexpression, Immunhistochemie und Western Blot

10 % SDS

100 g SDS (Gelelektrophoresequalität)
in 900 ml H₂O (67 °C)
abkühlen auf RT
pH mit HCl auf ~7,2 einstellen
ad 1 l H₂O

10x Running Buffer (RB) Stammlösung

288 g Glycin
60 g Tris
ad 2 l H₂O

1x Running Buffer

100 ml 10x RB
20 ml 10 % SDS
ad 1 l H₂O

20% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

2 g (NH₄)₂S₂O₈
ad 10 ml H₂O
vortexen
sterilfiltrieren
Aliquots á 1 ml bei -20 °C lagern

4x SDS-Probenpuffer

240 mM Tris-HCl pH 6,8
0,6% Bromphenolblau (w/v)
40% Glycerol (v/v)
5% β-Mercaptoethanol (v/v)
6% SDS (w/v)

Bakterien-Lyse-Puffer

250 mM NaCl
50 mM Tris-HCl pH 8,0
10% Glycerol
1% Triton-X-100

Blocking Buffer I

5 % Magermilchpulver in 1x PBS
mit Magnetrührer dispergieren
lagern bei +4 °C

Blocking Buffer II

2 % BSA in 1x PBST
mit Magnetrührer dispergieren
lagern bei +4 °C

Blot-Puffer für Western Blots

100 ml 10x RB
200 ml MeOH
ad 1 l H₂O

ChIP 1X Dialysis buffer

2 mM EDTA
50 mM Tris-HCl pH 8.0
0,1% Sarkosyl (bei monoklonalen Antikörpern weglassen)

ChIP 5X PK buffer

50 mM Tris-HCl pH 7.5
25 mM EDTA
1,25% SDS

ChIP Elution buffer

50 mM NaHCO₃
1% SDS

ChIP IP Dilution Buffer

0,01% SDS
1,1% Triton X 100
1,2 mM EDTA
16,7 mM Tris-HCl pH 8.1
167 mM NaCl

ChIP IP Waschpuffer

100 mM Tris-HCl pH 9.0 (8.0 für monoklonale Antikörper)
500 mM LiCl
1% NP40
1% Deoxycholic acid

ChIP Kernlysepuffer

50 mM Tris-Cl pH 8.1
10 mM EDTA
1% SDS
Proteaseinhibitoren (50x Complete)

ChIP Zellysepuffer

5 mM PIPES pH 8.0
85 mM KCL
0.5% NP40
Proteaseinhibitoren

Coomassie Färbelösung

2,5g Coomassie[®] Brilliant Blue G250
454 ml MeOH
454 ml H₂O
92 ml Essigsäure
30 min auf Magnetrührer
über Faltenfilter filtrieren

DTT-Stammlösung

1 M DTT
in H₂O bidest. lösen und mit 10 mM NaAc auf pH 5,2 einstellen
bei -20 °C lagern

Elutionspuffer pH 8,5

45 mM Tris-HCl pH 8,0
0,19 M NaCl
21 mg Glutathion
pH mit 1 M NaOH einstellen

Entfärber

Ethanol (v/v) 7,5 %
Essigsäure (v/v) 5 %

Na₃VO₄-Stammlösung 100 mM pH 9,5

100 mM Na₃VO₄ (w/v)
in H₂O bidest. lösen und mit 0,1 M NaOH auf pH 9,5 einstellen

Kinase-Puffer

20 mM HEPES pH 7,4
150 mM KCl
10 mM MgCl₂
1 mM EGTA
0,5 mM DTT
5 mM NaF
0,1 mM Na₃VO₄

NETN-Puffer

0,5% NP40
0,1m M EDTA
20 mM Tris, ph 7,4
300 mM NaCl

PBS

137 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM N₂HPO₂ x 2H₂O bidest
1,5 mM KH₂PO₄
mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen

PBST

0,2% Tween-20 in 1x PBS

PMSF

0,2 M PMSF in DMSO lösen

Ponceau-Rot-Lösung

0,01% Essigsäure (v/v)
0,15% TCA (w/v)
0,15% Sulfosalicylsäure (w/v)
0,2% Ponceau-Rot (w/v)

Proteasen- und Phosphataseninhibitor (50x)

1 Tablette Proteaseinhibitor Complete™
in 1 ml H₂O lösen
bei -20 °C lagern

Pull-Down Lysepuffer

250 mM NaCl
50 mM Tris pH 8.0
1% Triton X-100, 10% Glycerol

Puffer A

20 mM Tris-HCl pH 7,5
 20% (w/v) Sucrose
 1 mM EDTA

RIPA Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7,4
 1 % (v/v) NP-40
 0,28 % (v/v) Na-Deoxycholat
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0,1 % SDS
 50 mM NaF
 lagern bei +4 °C

Stripping-Puffer für Western-Blot Membranen

0,2 M Glycin
 1% SDS
 pH 2,5 mit HCl einstellen

TIF Puffer

150 mM NaCl
 20 mM Tris pH 8.0
 1 mM MgCl₂
 0.1% NP-40
 10% Glycerol

Tris-gepufferten Salzlösung

0,05 M Tris
 0,15 M NaCl
 Mit HCl und NaOH einstellen auf pH 7,4

Tris-Glycin-Gele für SDS-PAGE

x%iges Trenngel

x% Acrylamid/Bis aus 30%iger
 Stammlösung (v/v)
 3,35 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8
 90 µl 10% SDS-Lösung
 ad H₂O auf 9 ml Gesamtvolumen
 30 µl 20% APS-Lösung
 6 µl TEMED
 mischen und umgehend das Gel gießen

4,5%iges Sammelgel

557 µl Acrylamid/Bis aus 30%iger
 Stammlösung
 417 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8
 33 µl 10% SDS
 ad 3,4 ml H₂O
 33 µl 20% APS-Lösung
 3,3 µl TEMED
 mischen und umgehend das Gel gießen

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Generierung kompetenter Zellen

E. coli Bakterien sind in der Lage, durch Behandlung mit Rubidiumchlorid, Manganchlorid und Calciumchlorid bei niedriger Temperatur freie DNA aus dem sie umgebenden Medium aufzunehmen. Das Erlangen dieser Chemokompetenz erfolgt nach dem Protokoll von Hanahan⁷⁵.

Dazu werden kompetente *E. coli* Bakterien aus einem Glycerinstock in 5 ml SOB Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Diese Vorkultur wird in 200 ml MgCl₂ SOB Medium überführt und abermals für 2-3 Stunden bei 37 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ 0,4-0,6 erreicht ist. Nach dem Abkühlen für 10 min auf Eis unter gelegentlichem Schwenken werden die Zellen für 5 min bei 5000 g und 4 °C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 30 ml kaltem TFB I Puffer resuspendiert und abermals 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 5000 g und 4 °C. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 4 ml kaltem TFB II Puffer resuspendiert und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert. Nach dem Schockgefrieren im flüssigem Stickstoff werden die Zellen bei -80 °C gelagert.

Um die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen zu ermitteln, wird eine Transformation gemäß Protokoll durchgeführt. Die Effizienz berechnet sich wie folgt:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Koloniezahl} \times \text{Verdünnung} \times 1000 \times 10}{\text{ingesetzte Plasmid - DNA in ng}}$$

2.3.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

Durch Transformation ist es möglich, chemokompetenten Zellen fremde Plasmid-DNA zuzuführen⁷⁵. Als Selektionsmarker dient hierbei ein auf der Plasmid-DNA vorhandenes Antibiotikaresistenzgen.

Um Plasmid-DNA in kompetente Zellen zu transformieren, werden 200 µl kompetente Zellen für 15 min auf Eis aufgetaut, mit 1-100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Damit die Zellen die fremde DNA aufnehmen, folgt anschließend eine Hitzeinkubation bei 37 °C für 5 min oder bei 42 °C für 2 min. Nach erneutem Abkühlen der Bakterien für 2 min auf Eis werden diese in 1 ml

LB-Medium aufgenommen, für 45 min bei 37 °C, inkubiert, bei 5000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Diese wird über Nacht bei 37 °C inkubiert und nachfolgend die gewachsenen Bakterienkolonien analysiert.

2.3.3 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wird eine Übernachtskultur von 50 ml mit Hilfe eines Midipräparationskits (ProMega, Mannheim oder Qiagen, Hilden) nach Herstelleranleitung aufgearbeitet. Die gewonnene DNA wird in H₂O oder TE-Puffer resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Gewinnung der RNA aus eukaryotischen Zellen wird das RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.5 Anlegen einer Gefrierkultur mit Bakterien

Für einen Glycerinstock werden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl Glycerin in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß versetzt, gut durchmischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gefrierkultur wird bei -80 °C gelagert.

2.3.6 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung wird photometrisch bei einer Absorption von 260 nm bestimmt. Die Reinheit liegt bei $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$.

2.3.7 Enzymatischer Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen gehören zu der Gruppe der Nukleinsäure-modifizierenden Enzyme. Sie sind in der Lage, DNA an spezifischen Sequenzen zu hydrolysieren. Dadurch entstehen stumpfe oder überhängende Enden, die je nach Schnittsequenz komplementär oder nicht komplementär sind.

Die enzymatische Spaltung der DNA wird in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und erfolgt jeweils nach der Empfehlung des Enzymherstellers (NEB, Schwalbach). Die Inkubationszeit beträgt dabei zwischen 30-60 min.

2.3.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA Fragmenten

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wird die Agarosegelelektrophorese angewendet. Dabei wird DNA mit einem Ladepuffer auf ein Agarosegel geladen und eine Spannung angelegt. Durch die negativen Phosphatgruppen wandert die DNA durch das Gel zur Anode und wird dabei der Größe nach aufgetrennt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente erfolgt auf 0,5-1 %igem Agarosegel in TAE Puffer bei einer konstanten Spannung von 1,5 V/cm. Als Ladepuffer für die Nukleinsäurelösung wird 6x DNA Probenpuffer verwendet. Die 100 bp-Leiter und die 1 kb-Leiter (NEB, Schwalbach) dienen als Größenstandard.

Nach dem Auftrennen werden die Gele für mindestens 1 min in eine ca. 1 %ige Ethidiumbromidlösung⁷⁶ gelegt. Dabei interkaliert das EtBr mit dem Doppelstrang der DNA und wird durch die Bestrahlung mit UV Licht bei 300nm angeregt. Dadurch strahlen DNA-haltige Gelbereiche stärker als Bereiche ohne DNA.

2.3.9 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit Hilfe des Gelextraktionskits der Firma Millipore nach Herstellerangaben.

2.3.10 Ligation

Doppelsträngige DNA-Fragmente werden unter Einsatz der Ligase zusammengefügt. Diese katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einer 5'-Phosphatgruppe eines Nukleotidtriphosphates und einer frei vorliegenden 3'-OH-Gruppe. Dabei wird das zu ligierende DNA-Fragment im 5-fachen molaren Überschuss zu einem mittels Endonukleasen geöffnetem Plasmid gegeben und mit 0,5 µl T4-DNA-Ligase (NEB, Schwallbach) für 30 min bei Raumtemperatur in 20 µl Volumen inkubiert. Es wird der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. Der Ligationsansatz kann nachfolgend in kompetente Bakterien transformiert werden.

2.3.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen, wie Plasmid-DNA oder genomischer DNA. Für die Durchführung einer PCR wird eine Vorlage, z.B. Plasmid-DNA oder genomische DNA, sequenzspezifische Oligonukleotidpaare (*Primer*), eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder Platinum® *Pfx*-Polymerase aus *Thermococcus sp.*), dNTPs (Desoxyribonukleotid-Triphosphate; Invitrogen, Karlsruhe) und der Polymerase entsprechende Salze benötigt. Dabei besitzt die *Pfx*-Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und hat somit eine geringere Fehlerquote als die *Taq*-Polymerase.

Eine PCR ist in mehrere Schritte unterteilt. Als erstes findet die initiale Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für eine Minute statt, anschließend kommen mehrere Amplifikationszyklen bestehend aus Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und Elongation (DNA-Synthese) und letztendlich die terminale Elongation.

Durch die Denaturierung der DNA entstehen DNA-Einzelstränge, an die *Primer*, die das zu amplifizierende DNA-Fragment definieren, hybridisieren können. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert, dabei führen die Amplifikationszyklen zu einer exponentiellen Mengenzunahme des DNA-Fragments. Ein typischer PCR-Ansatz sieht wie folgt aus:

<i>Taq</i>-Polymerase	<i>Pfx</i>-Polymerase
5 µl 10x Puffer 1,5 µl dNTPs (10 mM) 1,5 µl <i>sense Primer</i> (10 µM) 1,5 µl <i>antisense Primer</i> (10 µM) 0,5 µl DNA-Polymerase x µl DNA ad 50 µl H ₂ O	5 µl 10x Puffer 1 µl MgSO ₄ (50 mM) 1,5 µl dNTPs (10 mM) 1,5 µl <i>sense Primer</i> (10 µM) 1,5 µl <i>antisense Primer</i> (10 µM) 0,5 µl DNA-Polymerase x µl DNA ad 50 µl H ₂ O

Folgende PCR-Programme wurden, sofern nicht anders angegeben, verwendet:

	<i>Taq</i> -Polymerase		<i>Pfx</i> -Polymerase	
<i>Denaturierung</i>	95 °C	1 min	95 °C	3 min
<i>Amplifikation (35x)</i>	95 °C	20 sec	95 °C	30 sec
	(56 °C)	(180 sec)	(56 °C)	(90 sec)
	72 °C	20 sec	68 °C	40 sec
<i>Elongation</i>	72 °C	5 min	68 °C	40 sec

Die verwendete Schmelztemperatur der *Primer* wurde dem mitgelieferten Datenblatt entnommen.

2.3.12 Semiquantitative PCR

Bei einer semiquantitativen PCR ist es möglich, den RNA-Gehalt von Zellen zu bestimmen. Dazu wird RNA isoliert und mittels einer Reversen Transkriptase (Stratagene, Ja Jolla) und dNTPs bei 50 °C für 30 min und entsprechendem Puffer in DNA umgeschrieben. Die gewonnenen DNA-Fragmente wurden danach als Vorlage für eine PCR mit entsprechenden *Primer* und folgendem Programm eingesetzt:

	<i>Taq</i> -Polymerase	
<i>Denaturierung</i>	95 °C	15 min
<i>Amplifikation (35x)</i>	95 °C	30 sec
	59 °C	45 sec
	72 °C	60 sec
<i>Elongation</i>	72 °C	10 min

2.4 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank HERAsafe und Sterilbank Lamin Air, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Der Transport der Zellen außerhalb der Werkbank erfolgt in geschlossenen Zellkulturschalen. Alle Medien, Puffer und Lösungen, die mit Zellen in Berührung kommen, werden ebenfalls nur unter sterilen Bedingungen geöffnet und angesetzt. Die verwendeten Werkbänke und Handschuhe werden vor jeder Verwendung mit 70 %igem Ethanol oder Aerodesin 2000 (Lysoform, Berlin) gereinigt. Alle verwendeten Zellen werden in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert und bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank gehalten.

2.4.1 Passagieren von Zellkulturlinien

Nach dem Entfernen des alten Wachstumsmediums werden die Zellen mit ca. 10 ml PBS gewaschen und in 2 ml Trypsin (Gibco) für ca. 5 min inkubiert. Dadurch werden die Integrinbindungen zum Zellkulturschalenboden gelöst und die Zellen dissoziieren ab. Die Trypsinierung wird mit 8 ml frischem Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen im Medium verteilt.

Zur Vermehrung der Zellen wird die Zellsuspension in verschiedenen Konzentrationen in neue Zellkulturschalen überführt. Üblich sind hierbei Verdünnungen zwischen 1:2 und 1:20, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie.

2.4.2 Transfektion von Zelllinien

Um Nukleotidsequenzen (Plasmid-DNA oder siRNA) in Zellen einzuschleusen, werden diese transfiziert. Dazu werden zunächst je ca. $1,5-2,5 \times 10^5$ Zellen pro well auf 6-well Platten oder $1-1,5 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale ausgesät.

2.4.2.1 Transfektion von Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Zelllinien mit Plasmid-DNA wird nach dem Herstellerprotokoll (FuGENE™, Roche) verfahren. Das Transfektionsreagenz wird im Verhältnis 1:3 (Plasmid-DNA in µg : FuGENE™ in µl) verwendet. Ca. 24-48 Stunden nach der Transfektion können Proteinextrakte aus den Zellen gewonnen werden.

2.4.2.2 Transfektion von siRNA

Zur Transfektion von Zelllinien mit siRNA wird nach dem Herstellerprotokoll (Lipofectamin 2000, Invitrogen) verfahren. Ca. 48 Stunden nach Transfektion können Proteinextrakte aus den Zellen gewonnen werden.

2.4.3 Anlegen einer Gefrierkultur mit Mammaliazellen

Die abtrypsinieren und somit gelösten Zellen werden für 10 min bei 5000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 800 µl Zellkulturmedium resuspendiert, mit 60 µl DMSO versetzt und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden bei -80 °C gelagert.

2.4.4 Herstellung einer induzierbaren stabil FHL2-exprimierenden Zelllinie

Zunächst werden Zellen mit dem stabil zu integrierenden Plasmid transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wird ein dem Plasmid entsprechendes Selektionsantibiotikum zum Zellmedium gegeben und über mehrere Wochen hinweg in gleichbleibender Konzentration erneuert. Durch den ständigen Selektionsdruck werden die Zellen abgetötet, die die Plasmid-DNA mit der entsprechenden Resistenz gegen den Selektionsmarker nicht in ihr Genom integriert haben.

Um den Mischklon zu vereinzeln, wird eine Zellsuspension so weit verdünnt, dass sich in 100 µl Medium rechnerisch höchstens eine Zelle befindet. Diese wird in 96-well Platten aliquotiert und die wachsenden Klone bei Bedarf auf immer größere Zellkulturschalen bis 10 cm Durchmesser überführt.

2.5 Reporteranalysen

Durch die Luciferase-Reporteranalysen ist es möglich, die Aktivität eines Proteins auf einen bestimmten Promotor *in vivo* zu ermitteln. Dazu werden bei der Transfektion gemäß Protokoll ein Reporterplasmid und bei Bedarf weitere Plasmide, die zum Beispiel für Proteine kodieren, in die Zelle transfiziert. Als Kontrolle dient dabei eine Transfektion mit einem Reporterplasmid und einem Leervektor.

Die Reporteranalyse basiert darauf, dass hinter einem spezifischen Promotor das Luciferasegen der Feuerfliege *photinus pyralis* liegt. Durch die Aktivität verschiedener Transkriptions- und Kofaktoren wird der Promotor und somit die Luciferaseexpression induziert oder reprimiert. Dadurch lässt sich ermitteln, wie bestimmte Proteine auf spezifische Promotoren wirken. Wenn ein Protein eine inhibierende Wirkung auf einen Promotor hat, wird weniger, wenn es eine aktivierende Wirkung hat, mehr Luciferase gebildet.

Die *Firefly* Luciferase (Photinus-luciferin:oxygen 4-oxireductase) ist ein 61 kD großes Protein, welches die Oxidation des Substrats D-Luciferin katalysiert. Um die Luciferaseaktivität zu messen, werden ca. 24 – 48 Stunden nach Transfektion die Zellen mit dem Luciferase Lysepuffer (Promega, Mannheim) für mindestens 10 min lysiert, abgeschabt, und bei 4 °C, 13.700 g für 10 min pelletiert. Eine identische Menge Protein, üblicherweise in 20 µl Volumen, werden mit 50 µl D-Luciferin in eine undurchsichtige 96-well Schale versetzt.

Zur Standardisierung werden je drei identische Transfektionen angesetzt. Die Messung erfolgt für je 10 Sekunden pro Ansatz in einem Luminometer. Die dabei gemessene Lichtemission wird in RLU (Relative Light Units) angegeben und für die Auswertung ein Mittelwert aus den Tripletten gebildet. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Differenz der drei Einzelwerte und wird rechnerisch in Microsoft ExcelTM oder OpenOffice CalcTM ermittelt.

2.6 Immunoblot

Beim Immunoblot, auch Western-Blot genannt, werden Proteine durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Auf dieser können mittels Antikörper spezifische Proteine detektiert werden.

2.6.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellkulturlinien

Das Zellmedium in der Zellkulturschale wird verworfen und die adhären Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach dem entfernen des PBS, werden die Zellen für 10 min bei 4 °C in RIPA, welcher mit Proteasen- und Phosphataseninhibitor versetzt ist, lysiert. Auf einer 10 cm Zellkulturschale werden dabei 300 µl RIPA eingesetzt, auf 6-Well Schalen jeweils 100 µl RIPA pro Well.

Nach der Lyse werden die Zellen durch den Einsatz eines Gummikratzers von der Zellkulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die nicht benötigten Zelltrümmer zu pelletieren, wird das gewonnene Proteinextrakt für 10 min bei 4 °C und 13.700 g pelletiert. Der Überstand wird bei Bedarf in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.6.2 Gewinnung von Proteinextrakten aus Tumorproben

Tumorproben werden in ca. 50 mg große Stücke zerschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels eines Mikro-Dismembrator, in dem eine Wolframkugel das Gewebe pulverisiert, zerkleinert und in 500 µl RIPA Lysepuffer aufgenommen. Die Zelltrümmer werden für 10 min bei 13.700 g und 4 °C pelletiert und verworfen. Die Proteinkonzentration des Überstands wird bestimmt und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach der Methode von Bradford⁷⁷. Hierzu wird BIO-Rad Protein Assay-Lösung im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt, 1 ml in einer Messküvette vorgelegt und zwischen 1 µl und 5 µl des Proteinextrakts hinzugegeben. Nach einer ca. 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die optische Dichte bei 595 nm im Photometer bestimmt. Als Nullwert wird die 1:5 Verdünnung ohne Proteinextrakt verwendet. Nach der Eichgeraden entspricht eine Absorption von OD₅₉₅=1 einer Proteinkonzentration von 19,89 µg/µl.

Die Proteinkonzentration des Proteinextrakts ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Proteinkonzentration} = \frac{\text{Optische Dichte bei 595 nm} \times 19,89}{\text{eingesetztes Proteinextrakt in } \mu\text{l}}$$

2.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese⁷⁸ werden Polypeptide in einem Proteinextrakt nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch das Detergenz SDS und β-Mercaptoethanol werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zerstört, so dass eine entfaltete Polypeptidkette vorliegt. Das negativ geladene SDS lagert sich durch hydrophobe Wechselwirkung an die Polypeptidkette an, wodurch ein Überschuss negativer Ladung entsteht und somit die Eigenladung der Polypeptide überlagert. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung ist es nun möglich, die Polypeptide in einem Polyacrylamidgel ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, ohne dass die Eigenladung der Proteine Einfluss auf das Laufverhalten hat.

Es werden Gele mit einer Dicke von 0,75 mm in einem BIO-Rad Gießstand gegossen, wobei das Sammelgel maximal 2 cm hoch ist. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine, werden Trenngele verschiedener Konzentrationen verwendet. Sofern nicht anders erwähnt, sind 12 %ige Gele verwendet worden.

Die Proben werden mit 5x Rotiload (Roth) versetzt und für mindestens fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Das Polyacrylamidgel wird in einer Elektrophoresekammer (BIO-Rad) gespannt und mit Laufpuffer gefüllt (Running Buffer, RB). Der Einlauf in das Sammelgel erfolgt bei 80 V. Bei der späteren Auftrennung im Trenngel wird eine

Spannung von 150 V angelegt. Der Gellauf wird beendet, wenn die Bromphenolblaufront am unteren Rand angekommen ist. Als Standard wird der sichtbare M-Standard (BIO-Rad) und der erst durch einen Sekundärantikörper auf einem Röntgenfilm sichtbare Santa-Cruz Marker verwendet.

2.6.5 Western Blot

Der Western Blot dient dazu, die Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran zu überführen⁷⁹.

Die Membran wird für eine Minute in Methanol inkubiert, um diese zu aktivieren. Danach wird sie für fünf Minuten in Wasser gewaschen und bis zur Verwendung in Transferpuffer (Blotting Buffer) equilibriert. Der Aufbau der Blotting Apparatur erfolgt wie nachstehend beschrieben (von der Kathodenseite zur Anodenseite): Ein Schwamm, zwei dünne Whatmanpapier, ein Polyacrylamidgel, eine aktivierte PVDF-Membran, zwei Whatmanpapiere und ein Schwamm. Der Transfer erfolgt für 90 min bei 80 V in der Mini-Sub Cell GT der Firma BIO-Rad oder für 60 min bei 30 V in der Invitrogen XCell SureLock Mini-Cell.

2.6.6 Coomassie-Färbung

Nach dem Western Transfer des Polyacrylamidgels kann dieses für eine Stunde bis über Nacht in einer Coomassie Färbelösung inkubiert werden. Durch den Coomassiefarbstoff werden die Proteine, die in dem Gel verblieben sind, blau angefärbt. Der Rest des Farbstoffs wird mit einem Entfärber gewaschen. Um ein gefärbtes Gel aufzubewahren, wird dieses gewässert und auf einem Whatmanpapier im Gelrockner für eine Stunde bei 80 °C getrocknet.

2.6.7 Ponceau Färbung

Der Erfolg des Proteintransfers kann mittels einer Ponceau Färbung überprüft werden. Hierbei wird die PVDF-Membran für ca. 5 min in Ponceau-Rot-Lösung gelegt. Dabei werden die übertragenen Proteine rot eingefärbt. Anschließend wird die Membran mit PBS und PBST wieder vollständig entfärbt.

2.6.8 Immunodetektion

Auf der Membran aus dem Western Transfer werden Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Um unspezifische Bindestellen zu blockieren, wird die Membran für mindestens 30 min in Milchpuffer abgesättigt. Danach wird der Primärantikörper in Milchpuffer für mindestens 45 min auf der Membran inkubiert. Nichtgebundene Antikörper werden in drei 10-minütigen Waschschrritten, zweimal mit PBST und einmal mit PBS, entfernt. Der Sekundärantikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und in der Lage ist, den Primärantikörpern zu detektieren, wird in Milchpuffer für mindestens 30 min auf die Membran gegeben. Nach drei erneuten 10-minütigen Waschschrritten, um die überschüssigen Antikörper von der Membran zu entfernen, erfolgt die chemiluminometrische Detektion mit ECL („enhanced chemiluminescent solution“, Pierce, Bonn). Je 2 ml der beiden ECL Komponenten werden auf eine Membran gegeben und für mindestens 1 min inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wird auf ein Papiertuch abgetropft und die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak oder Amersham) in eine Filmkassette gelegt. Die Peroxidase des zweiten Antikörpers wandelt das ECL unter Emission von Licht um. Dadurch wird der Röntgenfilm an der entsprechenden Stelle belichtet, was nach dem Entwickeln durch einen schwarzen Punkt auf dem Film zu sehen ist. Die Expositionszeit kann, abhängig von der Signalstärke, zwischen wenigen Sekunden und einer halben Stunde liegen.

2.6.9 „Strippen“ einer Polyvinylidfluoridmembran (PVDF-Membran)

Membranen, die bereits für eine Immuninkubation verwendet worden sind, können für weitere Immuninkubationen mit anderen Primärantikörpern verwendet werden. Dazu wird die Membran für 30 min bei 55 °C in Stripping Puffer inkubiert, wodurch die Antikörperkomplexe entfernt werden. Danach wird die Membran für 2x 10 min in PBST und 1x 10 min in PBS gewaschen. Für eine erneute Antikörperbehandlung wird nach dem Protokoll der Immundetektion verfahren.

2.7 Interaktionsstudien

2.7.1 Pull-Down Assay

Beim Pull-Down Assay kann *in Vitro* die Interaktion zwischen aus Zelllinien isolierten Proteinen mit bakteriell exprimierten GST-gekoppelten Protein

nachgewiesen werden. Dazu wird ein Plasmid, welches für ein GST-Fusionsprotein kodiert, in *E. coli* (BL21, *DE3*, *codon+*) transformiert. Die transformierten Bakterien werden in einer 50 ml Kultur angeimpft, am nächsten Tag in 1l LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 1,0 inkubiert.

Zur Induzierung der Proteinexpression wird IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 mM für 90 min zum Medium gegeben. Danach werden die Bakterien bei 4 °C pelletiert, in Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen nochmals zweimal bei 4 °C pelletiert, in eiskaltem Wasser aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem zweiten Resuspensionsschritt werden die Zellen durch die Zugabe von Benzonase und dreimaligem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff sowie Auftauen im 36 °C Wasserbad lysiert. Nachdem die Zelltrümmer pelletiert wurden, kann der Überstand mit den isolierten Proteinen aliquotiert und bei -80 °C gelagert werden.

Nach der Lyse werden die Proteine mittels Gluthation-Sepharose 4B *Beads* (Amersham Bioscience, Freiburg) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Im Pull-Down Assay werden die *Bead*-gekoppelten Proteine dreimal mit Pull-Down Lysepuffer und zweimal mit TIF-Puffer gewaschen. Anschließend werden diese mit Proteinextrakten aus einer Zelllinie für mindestens 4 h bei 4 °C inkubiert, mehrmals mit NETN-Puffer gewaschen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und in Western-Blot Analysen eingesetzt.

2.7.2 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Bei der Co-IP kann die Interaktion von Proteinen *in Vivo* direkt in der Zelle nachgewiesen werden. Dazu wird Proteinextrakt aus Zellkulturlinien gewonnen, mit spezifischen Antikörpern des zu fällenden Proteins versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend werden Protein A/G Agarose-Beads (20 µl eines 50% *Slurrys*) zu den Zellen gegeben und für 1 h inkubiert. Das Immunopräzipitat wird danach 3x in Lysepuffer gewaschen, anschließend mit SDS-Ladepuffer versetzt und in Western-Blot Analysen eingesetzt.

2.7.3 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Bei der ChIP kann die Interaktion zwischen DNA und Protein, zum Beispiel das Binden eines Transkriptionsfaktors auf einem Promotorelement, nachgewiesen

werden. Dazu werden Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% bei zellspezifischen Bedingungen gehalten. Danach wird zum *Crosslinken* der Protein-DNA Interaktion Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 1% zum Medium gegeben und für 10 – 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Crosslinkingreaktion wird mit einer Endkonzentration von 0,125 M Glycin abgestoppt.

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem PBS werden diese mit 20 % Trypsin in PBS für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinreaktion wird mit gleichem Volumen FCS abgestoppt, die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit komplementiertem PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit einer ausreichenden Menge ChIP Zellysepuffer für 10 min auf Eis lysiert, die Kerne pelletiert (5.000 upm, 5 min, 4 °C) und nachfolgend das Pellet in Kernlysepuffer für 10 min auf Eis lysiert. Die an die Proteine gekoppelte DNA wird daraufhin mittels eines Sonicaters, 5 x 1 min, 60% Stärke (je 5 min Pause zwischen den Behandlungen) in ~ 300 – 1000 bp große Fragmente zerstückelt. Die isolierten Chromatin-Protein Komplexe können mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

Der Chromatin-Protein Komplex wird abgefugt und der Überstand zum *Preclearing* für 15 min bei 4 °C mit 100 µl Protein A Agarose / Salmon Sperma *Slurry* inkubiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µg eines entsprechenden Antikörpers versetzt. Bei Bedarf kann die Probe auf 200 – 500 µl mit ChIP *IP Dilution Buffer* aufgefüllt werden. Die Inkubation erfolgt für 3 h – über Nacht bei 4 °C.

Danach werden 25 µl Protein A Agarose / Salmon Sperma *Slurry* zu den Proben gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur oder 1 h bei 4 °C inkubiert. Das Protein A Agarose / Salmon Sperma *Slurry* wird pelletiert und 2x mit 1 x ChIP Dialysepuffer und 4 x mit ChIP Waschpuffer gewaschen.

Zum Eluieren des Antikörper-Protein-DNA Komplexes wird 150 µl ChIP *IP* Elutionspuffer zugegeben, für 15 min gemischt und pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dies wird zweimal durchgeführt, so dass man letztendlich 300 µl Volumen erhält. Nach der Zugabe von 2 µl RNase A (10 mg / ml) und NaCl zu einer Endkonzentration von 0,3 M wird die Probe für 4 – 6 h bei 67 °C inkubiert. Danach werden 25 µl 5x PK Buffer und 1,5 µl Proteinkinase K (je 100 µl Probenvolumen) hinzugegeben und für 1 – 2 h bei 45 °C inkubiert. Die DNA wird

daraufhin mittels Phenol-Chloroform-Fällung isoliert und in einer PCR mit entsprechenden Primern eingesetzt.

2.8 Zellfärbungen

2.8.1 Immunfluoreszenz

Durch die Immunfluoreszenzfärbung ist es möglich, die Lokalisation nativer Proteine in Zellen nachzuweisen. Dazu werden Zellen auf Objektträgern ausgesät und bei Bedarf transfiziert. 24 h nach Aussaat bzw. nach Transfektion werden diese mit 4% PFA in PBS für mindestens 15 min fixiert und die Zellmembranen nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBS mit 0,2% Triton-X für 15 min permeabilisiert. Nach abermaligem dreifachen Waschen wird der erste Antikörper, gelöst im Verhältnis 1:100 in 1%igem BSA in PBS für eine Stunde auf den Zellen inkubiert. Nach erneutem dreifachen Waschen wird ein Fluochrom-gekoppelter Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist, für 45 min auf die Zellen gegeben. Bei einem der letzten drei Waschschrte wird DAPI im Verhältnis 1:2000 im PBS gelöst und für 5 min auf den Zellen inkubiert. DAPI färbt die DNA und somit die Zellkerne an, was später zur besseren Orientierung dient.

Um die mit dem Erst- und Zweitantikörper gefärbten Proteine zu erkennen, kommt ein Immunfluoreszenzmikroskop zum Einsatz. Dieses emittiert Licht in einer dem Fluorchrom des Zweitantikörpers entsprechenden Wellenlänge, so dass dieser fluoresziert und dadurch im Mikroskop betrachtet werden kann. Die Bilder werden mit einer EOS 300D (Canon) aufgenommen.

2.8.2 Immunhistochemie

Um Tumorproben auf die Expression bestimmter Proteine zu untersuchen, werden Gefrierschnitte angefertigt und mittels Immunhistochemie mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Dazu werden Tumorproben in TissueTek™ eingefroren, im Kryostaten 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger für 10 min bei 4 °C in Aceton fixiert. Darauf folgt ein Waschschrte mit einer Tris-gepufferten Salzlösung. Zum Nachweis von FHL2 in Gewebeproben wird der monoklonale Primärantikörper FHL2 1:50 verdünnt und für 30 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Die Detektion erfolgt durch das Super Sensitive Detection Kit (Bio Genex, USA) mit "Fast Red" als Substrat für die an den Antikörper gekoppelte

alkalische Phosphatase. Als letztes wurden die Zellkerne auf den Schnitten mit Hematoxylin gegengefärbt und die Schnitte mit Aquatex (Merck, Deutschland) versiegelt.

2.9 Proliferationsbestimmung von Zellen

Für die Bestimmung der Zellproliferationsrate wurde das CellTiter-96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega verwendet. Dieses beruht auf einer colorimetrischen Methode zur Bestimmung lebender Zellen und ist daher für Proliferationsbestimmungen geeignet. Dazu werden Zellen in 96-well Platten ausgesät und unter zellspezifischen Bedingungen inkubiert. Für die Bestimmung der Zellzahl werden an verschiedenen Zeitpunkten die Zellen mit dem CellTiter-Reagenz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium] (MTS) und Phenatinesulfat (PES) versetzt und für eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit wird das Reagenz in den Farbstoff Formazan umgewandelt, welcher in einem Luminometer bei 490 nm Absorption nachgewiesen werden kann. Die Menge an Formazan korreliert dabei mit der Anzahl der Zellen in der Zellkulturschale.

Alle Ansätze werden in Triplets ausgeführt, die Standardabweichung ergibt sich aus der Differenz der drei Einzelwerte und wird rechnerisch in Microsoft ExcelTM oder OpenOffice CalcTM ermittelt.

2.10 Colony-Forming Assay

Die meisten Zellen benötigen eine Zellmatrix, damit sie wachsen können. Geht diese Matrix verloren, stellen sie in der Regel das Wachstum ein. Daher ist die Fähigkeit des zellmatrixunabhängigen Wachstums ein Indikator für die Entartung einer Zelle und somit für ihre tumorigene Eigenschaft. Eine Hypothese für die Entstehung von Zellmatrixabhängigkeit basiert darauf, dass Rezeptoren für Wachstumsfaktoren auf der Zellmembran exponiert liegen, wenn diese auf einer Zellmatrix wachsen. Wenn sich die Zelle allerdings in Suspension befindet, bildet sie hunderte von Falten, wodurch die Membran nur noch beschränkt zugänglich ist und Wachstumsfaktoren nicht mehr an die Rezeptoren binden können.

Um die Fähigkeit der Zellen für zellmatrixunabhängiges Wachstum zu testen, werden diese in einen *Colony-Forming Assay* eingesetzt. Dazu wird 2%ige und 3%ige

Low-Melting Agarose in Wasser autoklaviert und im Wasserbad auf 37 °C abgekühlt. Die 2%ige Agarose wird mit Zellmedium zu einer Endkonzentration von 1,6% verdünnt und als untere Agaroseschicht in Zellkulturschalen gegeben. Für die obere Agaroseschicht werden Zellen abtrypsiniert und in Zellmedium aufgenommen. Mit diesem wird die 3%ige Agarose zu einer Endkonzentration von 0,3% verdünnt und über die erstarrte untere Agaroseschicht gegeben. Damit die Agarose nicht austrocknet wird diese ständig mit Zellmedium überschichtet. Die Zellen wurden vor der Auswertung für 14 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.11 Zellzyklusbestimmung

2.11.1 Synchronisation von Zellen

Um den Zeitpunkt zu bestimmen, wann Zellen einen bestimmten Punkt im Zellzyklus erreicht haben und um das Expressionsprofil auch von gering exprimierten, zellzyklusregulierten Proteinen zu bestimmen, werden Zellen mittels eines doppelten Thymidinblocks in der G1/S-Phase synchronisiert. Thymidin ist ein Nukleosid, welches in erhöhter Konzentration die DNA-Replikation reversibel blockiert.

Zur Synchronisation werden 2 mM Thymidin für 16 h zum Medium gegeben. Danach wird der Zellblock durch einen Mediumwechsel für 8 h aufgehoben und anschließend mit Thymidin ein zweiter Block für 16 h gesetzt. Nach dem folgenden Mediumwechsel werden die Zellen nach bestimmten Zeitpunkten geerntet. Dazu werden diese abtrypsiniert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgt für 30 min bei 4 °C mit 1 ml 70%igem Ethanol.

2.11.2 Durchflusszytometrie mittels FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Meßsystem, das einzelne, in Suspension vorliegende Zellen erfassen kann. Dabei passieren diese in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl, wobei die Zellen den Strahl ablenken. Es wird zwischen Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) und Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*) unterschieden, wodurch die relative Größe und Granularität der Zellen ermittelt werden kann. Dadurch kann mit Hilfe von DNA- und RNA-interkalierenden Stoffen wie Propidiumiodid (PI), der DNA/RNA-Gehalt der Zelle und somit die Zellzyklusphasen der Zelle bestimmt werden.

Der Zellzyklus wird mit Hilfe des FACScan-Gerätes (BD Biosciences, Heidelberg) ermittelt. Alle Zentrifugenschritte (Zentrifuge Minifuge GL) erfolgen 10 min lang bei 1.400 upm und 4 °C.

Für die Bestimmung der Zellzyklusphase werden die in Ethanol fixierten Zellen pelletiert und mit 100 µl RNase A (10 µg/ml) versetztem PBS sowie Propidiumiodid für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei wird die RNA in den Zellen hydrolysiert und die DNA angefärbt. In der Messung im Durchflusszytometer werden 5.000 Zellen eingesetzt und deren Zellzyklusverteilung (G0/G1, S oder G2/M) mittels der MODFIT LT 2.0 Software (Verity Software House, Topsham) in prozentualen Anteilen ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von FHL2 im Brustgewebe

FHL2 wird in vielen, jedoch nicht allen Krebsarten überexprimiert^{44, 47, 80}. Es ist zudem in der Lage, mit vielen krebsrelevanten Proteinen zu interagieren, zum Beispiel mit Mitgliedern aus dem MAP-Kinase Signaltransduktionsweg (Mitogen-activated Protein)^{59, 64, 81} oder aber auch mit p53⁵⁸.

Zu Beginn der Arbeit war die Rolle von FHL2 im Mammakarzinom weitgehend unbekannt. Es gab allerdings Hinweise, dass dieses Protein durchaus einen Einfluss auf die Brustkrebsentwicklung hat. Yan *et. al* konnte schon 2003 in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Interaktion zwischen dem C-Terminus des prominenten brustkrebsrelevanten Proteins BRCA1 (BRCT2) und FHL2 nachweisen⁵⁷. Wie sich diese Interaktion allerdings auswirkt, ist bisher nicht bekannt.

3.1.1 Expression von FHL2 im primärem Mammakarzinom

Zur Ermittlung des FHL2-Expressionsstatus im Mammakarzinom, wurden kryokonservierte Tumorproben, DCIS und Normalgewebe herangezogen. Dafür wurden aus jeweils 57 Tumorproben, vier DCIS und acht Normalgeweben Proteinextrakte generiert und in Western-Blot Analysen eingesetzt. Als Primärantikörper wurde der monoklonale FHL2 Antikörper (F4B2-B11) verwendet, der in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Wixler (Münster) hergestellt wurde und spezifisch die erste LIM-Domäne von FHL2 detektiert. Als Ladekontrolle kam ein monoklonaler Aktin-Antikörper zum Einsatz.

In Abbildung 3a ist das FHL2-Expressionsprofil einiger ausgesuchter Tumorproben dargestellt. Die meisten Tumorproben exprimieren FHL2 (T1-T5), wogegen im Normalgewebe keine FHL2-Expression festgestellt werden kann (N1-N2). Interessant ist das Expressionsprofil der DCIS Proben (D1-D4), hier ist eindeutig eine geringere FHL2-Expression als im malignen Tumor detektierbar. Dies weist auf eine Korrelation zwischen der FHL2-Expression und der Aggressivität des Tumors hin. In Abbildung 3b ist das FHL2-Expressionsprofil aller untersuchten Proben zusammengefasst. Dabei konnten in 90% der Fälle (55 von 61) hohe Mengen an FHL2 detektiert werden. Wie bereits in der Western-Blot Analyse zu sehen, exprimiert das Normalgewebe kein FHL2.

3.1.2 Expression von FHL2 in Zellkulturlinien

Das Expressionsprofil verschiedener Proteine kann in Primärgewebe und Zellkulturlinien voneinander abweichen. Daher wurde anschließend der FHL2 Status verschiedener Brustkrebszelllinien getestet (Abbildung 3c). Dazu wurden Proteinextrakte aus zehn verschiedenen Zelllinien in Western-Blot Analysen auf FHL2-Expression getestet.

Es zeigt sich ein sehr differenziertes Bild. Die Zelllinien T47D (Spur 7), SKBR3 (Spur 8) und MDA-MB 231 (Spur 10) weisen eine sehr hohe FHL2-Expression auf, wogegen in den Zelllinien EFM-192A (Spur 4) und EFM-192B (Spur 6), sowie den BT549 (Spur 2) nur geringe Mengen an FHL2 zu sehen sind. In den Zelllinien MCF7 (Spur 1), DU 4475 (Spur 3), MDA-MB 435 (Spur 5) und BT474 (Spur 9) konnte hingegen kein FHL2 detektiert werden.

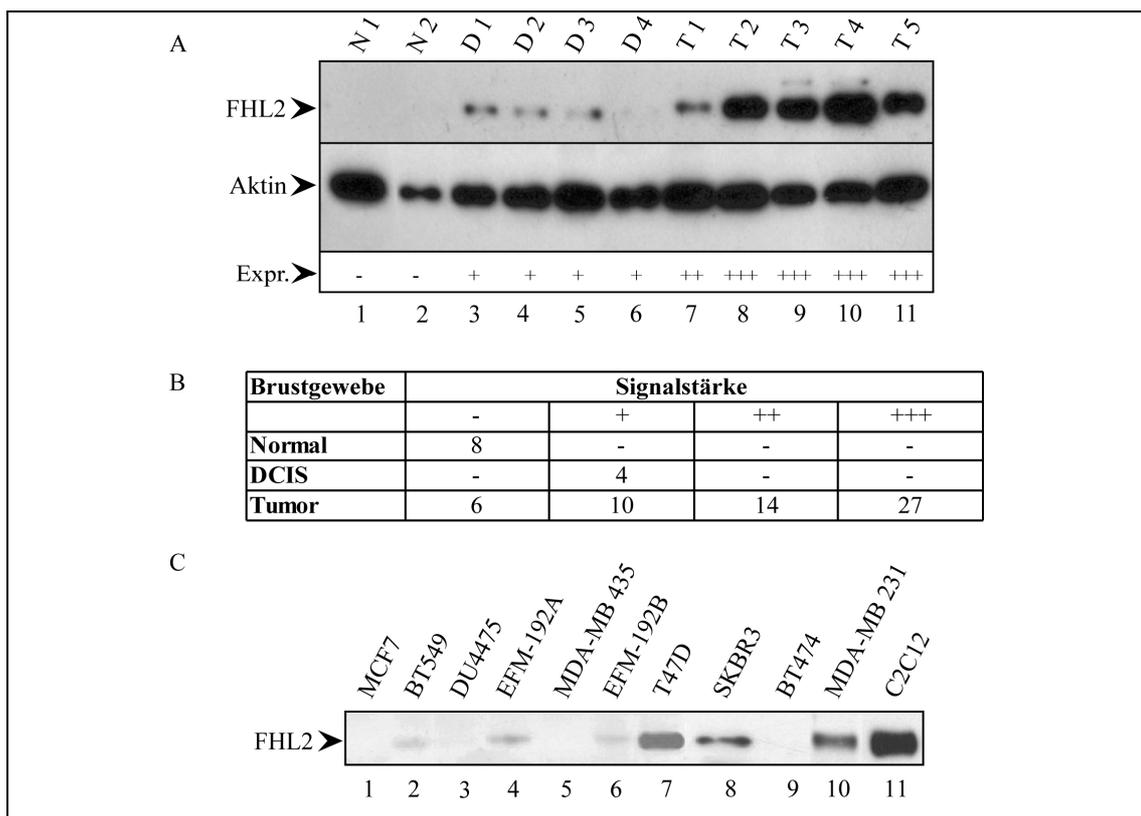


Abbildung 3: FHL2-Expression im Normalen- und Brustkrebsgewebe sowie in verschiedenen Brustkrebszelllinien. (A) Proteinextrakte aus kryokonservierten Gewebeproben wurden durch Western-Blot Analyse mittels des F4B2 FHL2 Antikörpers untersucht. Der Blot zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei Normalgeweben (N1, N2), vier DCIS (D1-D4) und fünf Brustkrebsproben (T1-T5). Die Signalstärke wurde mit negativ (-), schwach (+), mittel (++) und stark (+++) indiziert. (B) Zusammenfassung der Western-Blot Analyse von acht Normalen-, vier DCIS und 57 Tumorgewebe-Extrakten. Die Signalstärke wurde wie in A bestimmt. (C) Der FHL2-Status verschiedener Brustkrebszelllinien wurde mittels Western-Blot Analyse ermittelt. Die C2C12 Mausmyoblasten Zelllinie (11) wurde als Positivkontrolle verwendet.

Es ist somit nur unter Vorbehalt möglich, von den Zellkulturexperimenten auf Mammakarzinome *in vivo* zu schließen. Es konnte gezeigt werden, dass fast alle untersuchten Mammakarzinome, aber nicht alle Mammakarzinomzelllinien, FHL2 exprimieren. Es stellt sich nun die Frage, welche Funktion FHL2 in der Tumorzelle ausübt. Daher wurden für weitere Experimente die FHL2-negative Zelllinie MCF7 und die hochinvasive, FHL2-positive Zelllinie MDA-MB 231 verwendet.

3.2 Lokalisation von FHL2 im Brustgewebe

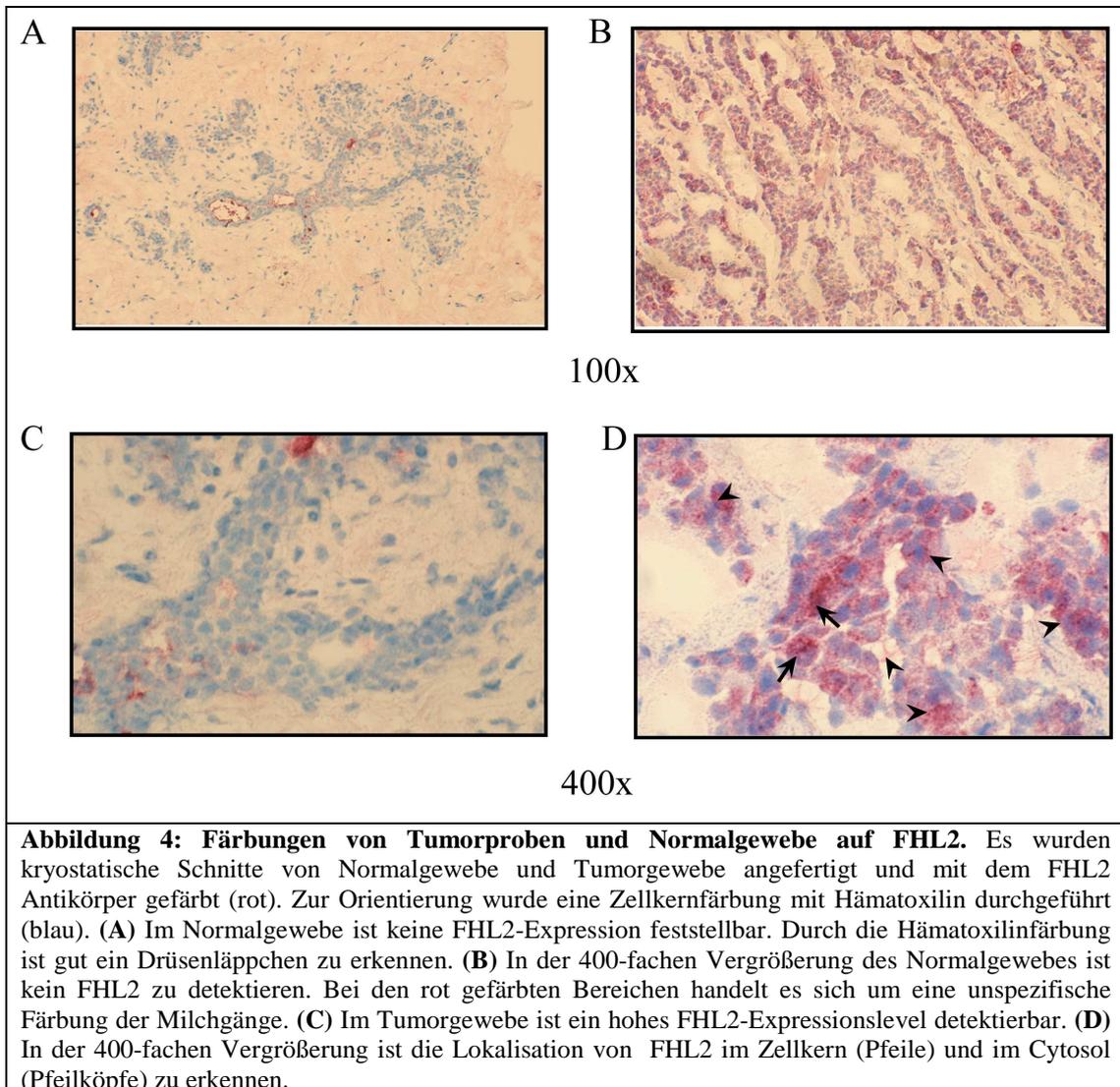
3.2.1 Primäres Mammakarzinom

FHL2 kann in der Membran, im Cytosol und im Zellkern lokalisiert sein. Um die Lokalisation im primären Mammakarzinomgewebe zu bestimmen, wurden immunhistochemische Färbungen auf FHL2 durchgeführt. Dazu wurden Kryoschnitte von normalem und malignem Gewebe angefertigt. FHL2 wurden mit dem F4B2 Antikörpers und „Fast Red“ rot gefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxilin blau eingefärbt.

Die immunhistologische Färbung bestätigt die Beobachtung aus den Western-Blot Analysen. Wie in Abbildung 4a zu sehen, sind in der 100-fachen Vergrößerung im normalen Gewebe, durch die Hämatoxilin-Kernfärbung intakte Strukturen, wie zum Beispiel ein Drüsenläppchen, klar erkennbar. Eine FHL2-Expression ist aber selbst in der 400-fachen Vergrößerung nicht zu erkennen (Abbildung 4c). Im Tumorgewebe hingegen ist selbst in der 100-fachen Vergrößerung eine klare FHL2-Färbung (rot) zu sehen (Abbildung 4b). In der 400-fachen Vergrößerung kann man erkennen, dass FHL2 nicht nur im Cytosol (Pfeilköpfe), sondern auch im Zellkern (Pfeile) lokalisiert ist (Abbildung 4d).

Anhand der immunhistochemischen Untersuchung der Tumorproben konnte zudem der Tumoranteil in den verschiedenen Proteinextrakten identifiziert werden. Dabei stellte sich heraus, dass einige Proben nicht ausschließlich aus Tumor, sondern auch aus Normalgewebe bestanden. Es besteht daher die Wahrscheinlichkeit, dass die in den Western-Blot Analysen FHL2-negativen Tumorproben einen höheren Anteil an normalem Gewebe besaßen und somit das Ergebnis leicht verfälschten. Dies würde mit den Daten von 85 untersuchten Brusttumoren von Gabriel *et al.* übereinstimmen⁵⁰. Da es sich bei der Immunhistologie allerdings um

zweidimensionale Schnitte aus einem dreidimensionalen Tumor handelt, kann dies nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden.

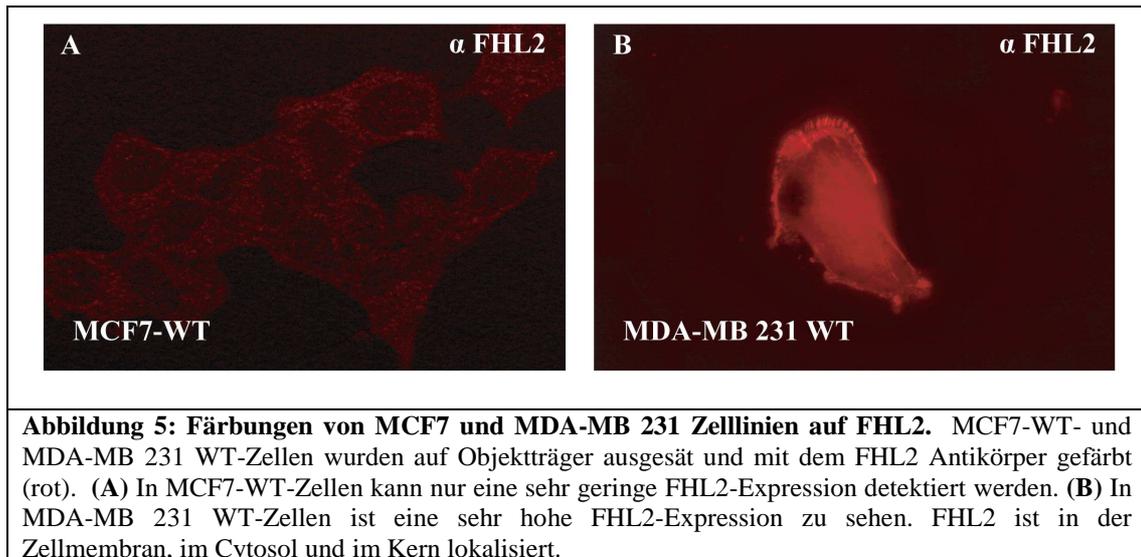


3.2.2 Zellkulturlinien

Die Lokalisation von FHL2 in Mammakarzinomzelllinien wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen von FHL2-negativen Wildtyp MCF7 (MCF7-WT) und FHL2-positiven Wildtyp MDA-MB 231 (MDA-MB 231 WT) Zellen bestimmt. Dazu wurden beide Zelllinien auf Objektträger ausgesät, am nächsten Tag fixiert und die Zellmembran permeabilisiert. Die FHL2-Färbung erfolgte dem monoklonalen FHL2 Antikörper und einem Fluochrom-konjugierten Zweitantikörper (Abbildung 5).

Die Immunfluoreszenzfärbung spiegelt das Proteinexpressionsmuster aus den Western-Blot Analysen wieder. Wie in den FHL2-negativen MCF7-WT-Zellen, ist

auch hier sehr wenig bis kein FHL2 zu sehen (Abbildung 5a). In den MDA-MB 231 wird dagegen ein hohes Maß an FHL2 exprimiert (Abbildung 5b). Auch die bereits in den immunhistologischen Färbungen beobachtete Lokalisierung von FHL2 lässt sich hier nochmals nachvollziehen. FHL2 ist in der Zellmembran, genauer gesagt in den Fokalkontakten, im Cytosol und im Kern lokalisiert



3.3. Integration einer Expressionskassette in verschiedene Zelllinien

Wie bereits erwähnt, unterscheidet sich die FHL2-Expression im Tumor und Normalgewebe. Daher wurde, um die Rolle von FHL2 in der Brustkrebsentwicklung genauer zu beleuchten, in verschiedene Zelllinien eine Expressionskassette für FHL2 sowie eine Expressionskassette für eine *short-hairpin* FHL2 (shFHL2) integriert. Die FHL2-negative MCF7 Zelllinie diente als Grundlage für die Integration eines FHL2-Expressionsplasmids. Die FHL2-positiven MDA-MB 231 hingegen dienten als Grundlage für eine durch RNA-Interferenz vermittelte FHL2-Reduktion (MDA-MB 231 shFHL2).

Zur Integrierung des FHL2-Expressionsplasmids in MCF7-Zellen kam ein Expressionsplasmid mit murinem FHL2 zum Einsatz. Für die stabile FHL2-Reduktion in MDA-MB 231-Zellen wurden vier verschiedene Plasmide mit einer shRNA-Sequenz gegen FHL2 (shFHL2), sowie ein Kontrollplasmid mit einer nichtcodierenden shRNA-Sequenz (shSCR), verwendet.

Für Integration der Plasmide in den jeweiligen Zelllinien wurden die Zellen transfiziert und über mehrere Wochen mit dem Selektionsmarker Hygromycin

weitergezogen. Nach acht Wochen wurde der entstanden Mischklone mit dem stabil integrierten Plasmid vereinzelt und durch Western-Blot Analysen der FHL2-Status überprüft.

Wie in Abbildung 6 zu sehen, konnte das FHL2-Expressionsplasmid erfolgreich in die eigentlich FHL2-negative MCF7 Zelllinie (MCF7-WT) integriert werden. Diese Zelllinie wird nachfolgend MCF7-FHL2 genannt. In einer Auftrennung in Membran, Cytosol und Zellkern (Abbildung 6a), sowie in Immunfluoreszenzfärbungen (Abbildung 6b), ist eine Lokalisation von FHL2 in allen drei Zellkompartimenten feststellbar, wogegen im Wildtyp kein FHL2 detektiert werden kann.

In MDA-MB 231-Zellen konnte ebenfalls erfolgreich ein shRNA-Plasmid gegen FHL2 integriert werden (nachfolgend MDA-MB 231 shFHL2 genannt), wobei das shFHL2-3 Plasmid die effektivste Reduktion des endogenen FHL2-Status aufweist.

In Abbildung 6c sind verschiedene, mit dem shFHL2-3-Plasmid generierte Einzelklone zu sehen. Dabei zeigt Klon 3 (Spur 3) eine robuste Reduktion der FHL2-Expression auf. Als Kontrolle wurde nach dem gleichen Muster ein shRNA-Plasmid mit einer Kontrollsequenz (gleiche Basen wie die shRNA-FHL2 Sequenz, aber in einer anderen Reihenfolge) stabil in MDA-MB 231-Zellen integriert. Diese Zellen wurden als Kontrollzelllinie genutzt (MDA-MB 231 shSCR) und exprimieren noch immer endogen FHL2 (Abbildung 6d, Spur 1).

Diese vier Zelllinien, MCF7-WT, MCF7-FHL2, MDA-MB 231 shSCR und MDA-MB 231 shFHL2, wurden für weitere Untersuchungen über die Rolle von FHL2 im Mammakarzinom sowie in krebisrelevanten Signaltransduktionswegen verwendet (Tabelle 4).

Zelllinie	FHL2-Status
MCF7-WT	-
MCF7-FHL2	+
MDA-MB 231 shSCR	+
MDA-MB 231 shFHL2	-
Tabelle 4: FHL2-Status von MCF7 und MDA-MB 231-Zellen nach der Integration verschiedener Expressionskassetten	

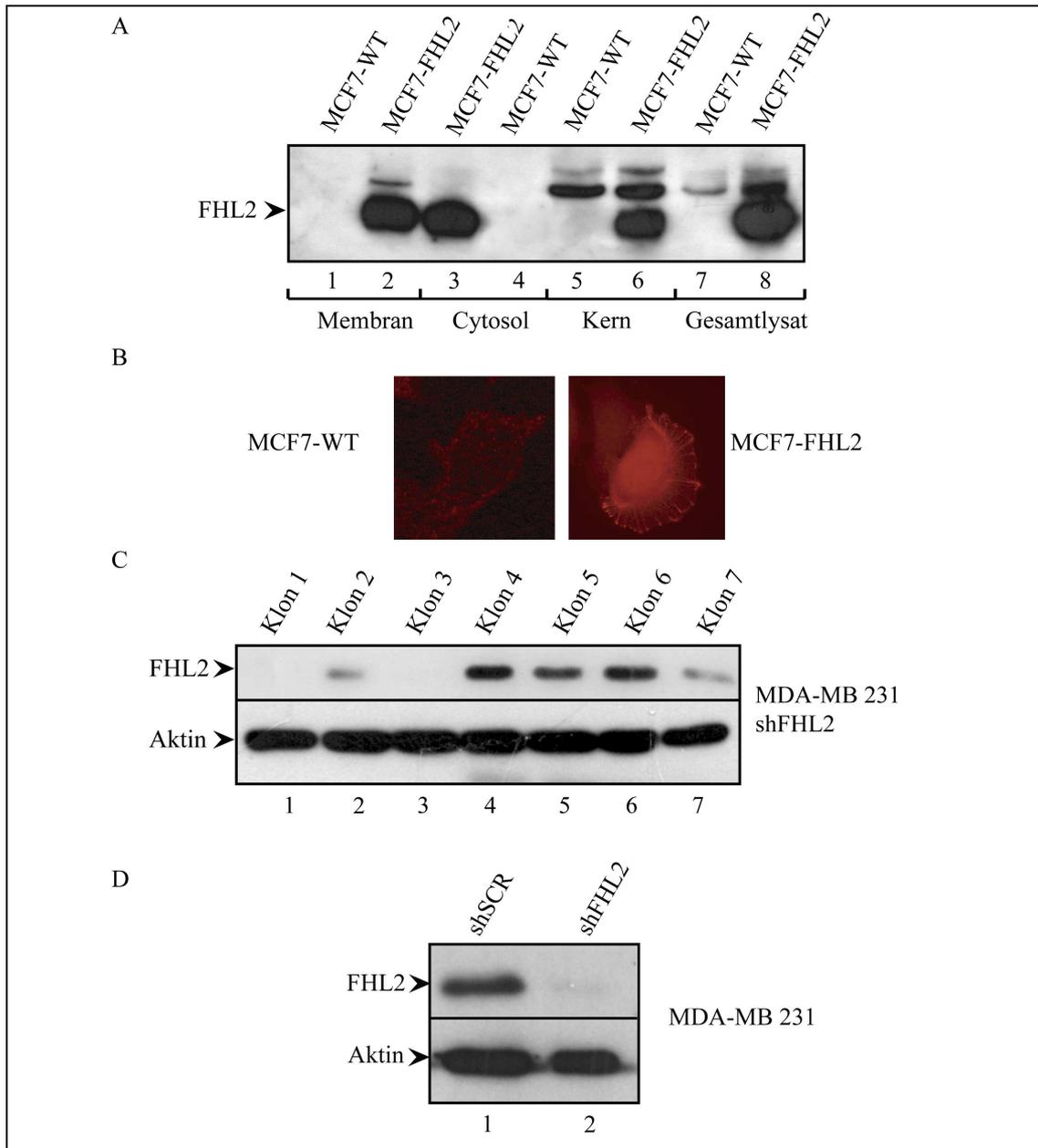


Abbildung 6: FHL2 Status der stabil transfizierten MCF7 und MDA-MB 231 Zelllinien. In die FHL2-negative MCF7 Zelllinie wurde ein FHL2-Expressionsplasmid, und in die FHL2-positive MDA-MB 231 Zelllinie ein Plasmid codierend für eine shRNA gegen FHL2 stabil integriert. **(A)** Um den FHL2-Status der stabil FHL2-exprimierenden MCF7-Zelllinie (MCF7-FHL2) zu überprüfen, wurde diese in Membran (Spur 1 und 2), Cytosol (Spur 3 und 4) und Zellkern (Spur 5 und 6) aufgeteilt und der FHL2-Status überprüft. Die MCF7-WT und Proteinlysate aus der gesamten Zelle (Spur 7 und 8) dienen als Kontrolle. FHL2 ist sowohl in der Membran (Spur 2), im Cytosol (Spur 3) und im Zellkern (Spur 6) der MCF7-FHL2 Zelllinie lokalisiert. In MCF7-WT-Zellen ist kein FHL2 detektierbar (Spur 1, 4, 5 und 7). Bei dem über dem FHL2 liegenden Bande handelt es sich um ein unspezifisches Signal. **(B)** In Immunfluoreszenzversuchen ist die Lokalisation von FHL2 in der Membran, im Cytosol und im Kern zu erkennen (links). In MCF7-WT-Zellen kann kein FHL2 detektiert werden (rechts). **(C)** Der FHL2-Status in den stabil FHL2-reduzierten MDA-MB 231 (MDA-MB 231 shFHL2) wurde durch Western-Blot Analysen ermittelt. In den Klone 1 und 3 (Spur 1 und 3) ist die FHL2-Reduktion am stärksten. **(D)** Die FHL2-Expression des Klon 3 aus (C) (MDA-MB 231 shSCR) und einer Kontrollzelllinie (MDA-MB 231 shSCR), wurde in Western-Blot Analysen miteinander verglichen. In der Kontrollzelllinie wird FHL2 stark exprimiert (Spur 1), in den stabil FHL2-reduzierten Zellen nur eine sehr geringe FHL2-Expression zu sehen (Spur 2).

3.4 FHL2 im MAPK-Signaltransduktionsweg

FHL2 interagiert mit verschiedenen krebsrelevanten Transkriptionsfaktoren und moduliert deren Funktion⁴⁴. Ein prominenter Transkriptionsfaktor ist das Onkoprotein c-jun, ein Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors. In Affennierenzellen fungiert FHL2 dabei als Ko-Aktivator der c-jun-abhängigen AP-1-Expression⁵⁹.

FHL2 kann als gewebeabhängiger Ko-Aktivator und Ko-Repressor des gleichen Transkriptionsfaktors auftreten. Welche Rolle FHL2 in Mammakarzinomzellen einnimmt, sollte daher in Reporteranalysen mit c-jun untersucht werden. Dazu wurden Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit verschiedenen Mengen eines FHL2-Expressionsplasmids, mit 0,5 µg c-jun-Expressionsplasmid sowie 0,5 µg eines AP-1-abhängigen Reporterplasmids mit einem nachgeschalteten Luciferasegen (pAP-1), welches Bindestellen für den AP-1 Transkriptionsfaktor besitzt, ko-transfiziert.

48 h nach Transfektion wurde aus den Zellen Proteinextrakt gewonnen und mit D-Luciferin (ProMega, Mannheim) versetzt. Die entstandene Lumineszenz wurde in einem Luminometer ermittelt und in RLU (Relative Light Units) angegeben. Alle Versuche wurden in Tripletten durchgeführt und ein Mittelwert sowie eine Standardabweichung ermittelt.

Wie in Abbildung 7 zu sehen, tritt FHL2 in MCF7 als Ko-Repressor der c-jun-abhängigen Aktivierung des AP-1-sensitiven Promotors auf. In einer Konzentrationsreihe mit 0 µg bis 1,5 µg FHL2-Expressionsplasmid sowie einer konstanten Menge von 0,5 µg des c-jun-Expressionsplasmids zeigt sich, dass das Maß der Repression von der Menge an exprimierten FHL2 abhängig ist. (Abbildung 7a). In der Positivkontrolle, also der Transfektion von c-jun ohne FHL2, ist zu sehen, dass c-jun das pAP-1-Reporterplasmids um das 78-fache gegenüber dem Basallevel induziert. Bei der Zugabe von 0,5 µg FHL2 ist zwar noch immer eine robuste Aktivierung des pAP-1-Reporterplasmids zu beobachten, hier beträgt die Induzierung aber nur noch das 39-fache des Basalwerts. Bei 1,0 µg geht diese Induzierung auf das 20-fache zurück, bei 1,5 µg sogar auf das 10-fache.

c-jun wird durch verschiedene Mitglieder des MAPK-Signaltransduktionswegs aktiviert, z.B. durch die N-terminale Phosphorylierung durch ERK1/2 (Extracellular signal-regulated Kinase 1/2) oder JNKs (c-jun N-terminal Kinases)⁸². Zudem weiß

man, dass FHL2 in Kardiomyozyten die ERK2-abhängige Aktivierung durch die Interaktion mit ERK2 im Cytosol inhibiert und das Einschleusen in den Kern verhindert⁶⁴. Daher wurde eine im MAPK-Signaltransduktionsweg höherliegende Kinase, eine konstitutiv aktive MEKK1 (pFC-MEKK1), zur Aktivierung des AP-1-abhängigen Promotors mit FHL2 ko-transfiziert. Wie in Abbildung 7b gezeigt, übt FHL2 auch bei der Aktivierung von endogenem c-jun durch eine andere Kinase einen reprimierenden Effekt auf die pAP-1-Reporterplasmidaktivität aus. Da das pAP-1-Reporterplasmid einen idealisierten AP-1-Promotor besitzt der in dieser Form nicht natürlich vorkommt, war das Verhalten eines natürlich vorkommenden AP-1-Promotors interessant. Daher wurden FHL2 und c-jun mit einem Reporterplasmid, welches den AP-1-abhängigen, natürlich vorkommenden Promotor des Interleukin-2 Gens besitzt (pAP-1-IL2), ko-transfiziert (Abbildung 7c). Dabei konnten die Beobachtungen aus Abbildung 7a und b verifiziert werden. Auf diesem natürlich vorkommenden Promotor konnte die c-jun-abhängige Aktivierung ebenfalls durch FHL2 reprimiert werden.

Die Interaktion zwischen FHL2 und anderen Proteinen kann durch verschiedene LIM-Domänen vermittelt werden. Daher sollte in weiteren Reporteranalysen festgestellt werden, über welchen Teil von FHL2 der beobachtete Effekt vermittelt wird. Dazu wurden zwei FHL2-Deletionskonstrukte mit c-jun ko-transfiziert. Einmal der N-Terminus mit den LIM Domänen 1/2-2 (FHL2 3-161) und einmal der C-Terminus mit den LIM-Domänen 3-4 (FHL2 161-279). In Abbildung 7c ist zu sehen, dass der N-Terminus, ebenso wie das vollständige FHL2 mit den LIM-Domänen 1/2-4 (FHL2), die c-jun-abhängige Aktivierung des AP-1-IL2-Promotors induziert, nicht aber der C-Terminus. Die Modulation der c-jun-Aktivität wird anscheinend ausschließlich über die ersten beiden LIM-Domänen vermittelt.

Es stellte sich nun die Frage, ob endogenes FHL2 den gleichen Effekt auf die c-jun-abhängige Expression des AP-1-abhängigen Promotors hat. Daher wurde das pAP-1-Reporterplasmid mit c-jun in die endogen FHL2 exprimierenden MDA-MB 231 shSCR und in die FHL2-reduzierten MDA-MB 231 shFHL2-Zellen transfiziert. Hier ergab sich aber, verglichen mit den Beobachtungen in den MCF7-WT-Zellen, überraschenderweise ein völlig anderes Bild. Bei der Transfektion

der shSCR-Zellen mit c-jun gab es, wie erwartet, eine robuste Aktivierung des pAP-1-Reporterplasmids.

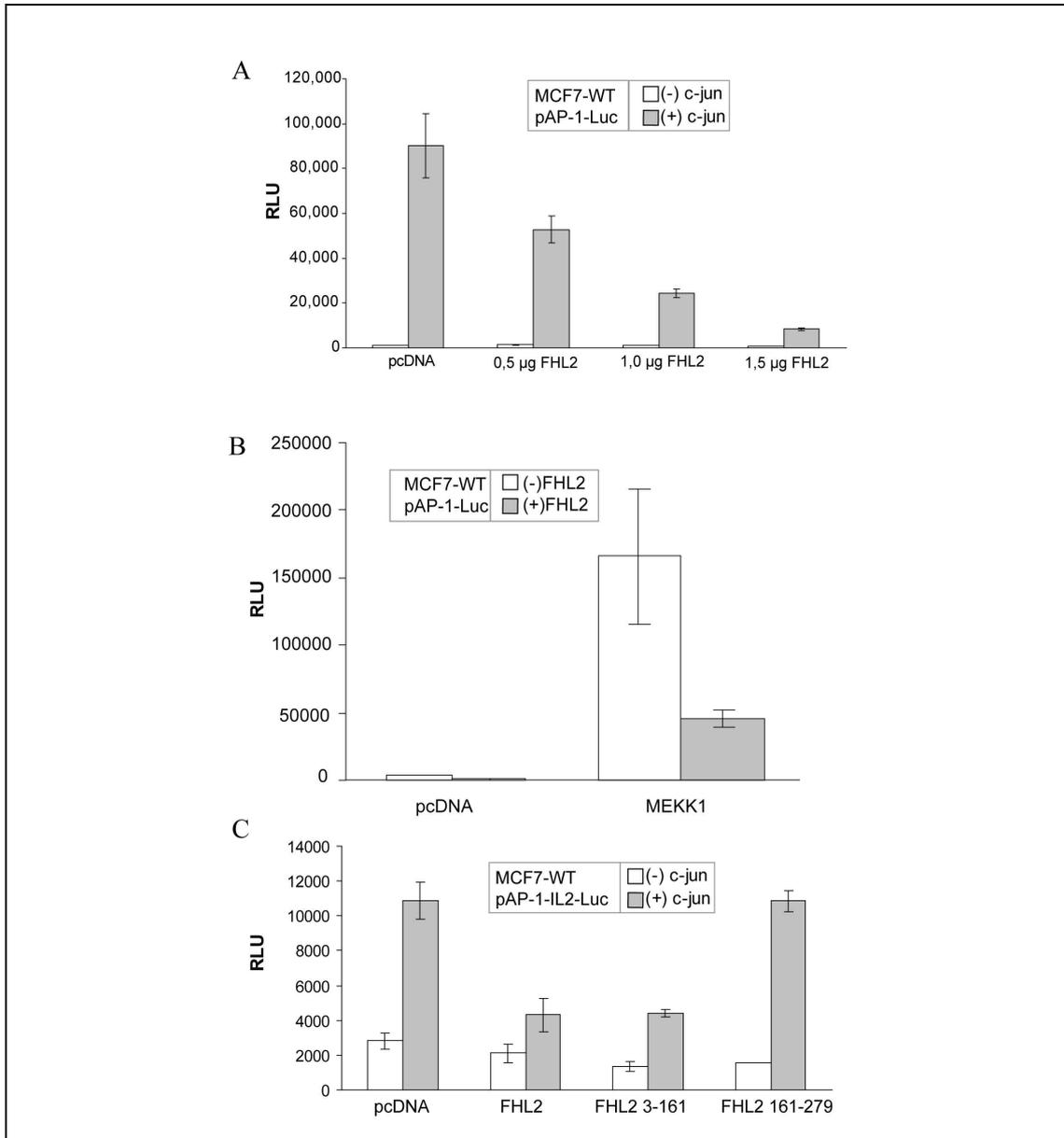


Abbildung 7: Effekt von FHL2 und c-jun auf einen AP-1 induzierbaren Promotor in MCF7-Zellen. In MCF7-Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, 0,5 µg der Expressionsplasmide c-jun, MEKK1 und FHL2 sowie Deletionsmutanten in verschiedenen Kombinationen mit einem AP-1-abhängigen Reporterplasmid transfiziert. **(A)** Zwischen 0,5 µg und 1,5 µg des FHL2-Expressionsplasmids wurden mit dem c-jun-Expressionsplasmid und dem pAP-1-Reporterplasmid transfiziert. Dabei reprimiert FHL2 konzentrationsabhängig die c-jun-induzierte AP-1-abhängige Promotoraktivität. **(B)** FHL2 wurde mit einer konstitutiv aktiven MEKK1-Kinase (pFC-MEKK1) und dem pAP-1-Reporterplasmid ko-transfiziert. Analog zu (A) wird die durch pFC-MEKK1 vermittelte AP-1-Aktivität durch FHL2 reprimiert. **(C)** Ein c-jun Expressionsplasmid wurde mit vollständigem FHL2 sowie einer N-terminalen (FHL2 3-161) und einer C-terminalen (FHL2 161-279) Deletionsmutante und dem AP-1-abhängigen Reporterplasmid mit einem Promotor vom Interleukin-2 (pAP-1-IL2-Luc) ko-transfiziert. Das vollständige FHL2 und die N-terminale Deletionsmutante reprimieren die AP-1-abhängige Expression, nicht aber die C-terminale Mutante.

Aufgrund der Beobachtungen in MCF7-WT-Zellen war damit zu rechnen, dass in shFHL2-Zellen die AP-1-Promotoraktivität nochmals induziert wird, da die beobachtete FHL2-abhängige Repression der c-jun-Aktivität wegfallen sollte. Stattdessen ist c-jun nicht in der Lage, in Abwesenheit von FHL2, den AP-1-Promotor zu aktivieren (Abbildung 8a). Die Vermutung lag nahe, dass die beobachtete Diskrepanz der FHL2-abhängigen AP-1-Aktivität darauf beruht, dass FHL2 in MCF7-WT überexprimiert, in MDA-MB 231 aber reduziert wurde. Um dies zu testen, wurde abermals der Aktivator der c-jun-phosphorylierenden Kinasen ERK1/2 und JNK, die konstitutiv aktive MEKK1, in MDA-MB 231 transfiziert. Die shFHL2-Zellen zeigen, verglichen mit den shSCR-Zellen dabei eine deutlich geringere Aktivierung des AP-1-Promotors auf (Abbildung 8b). Auch wurde der Versuch mit c-jun wiederholt. Dabei zeigte sich aber das identische Bild.

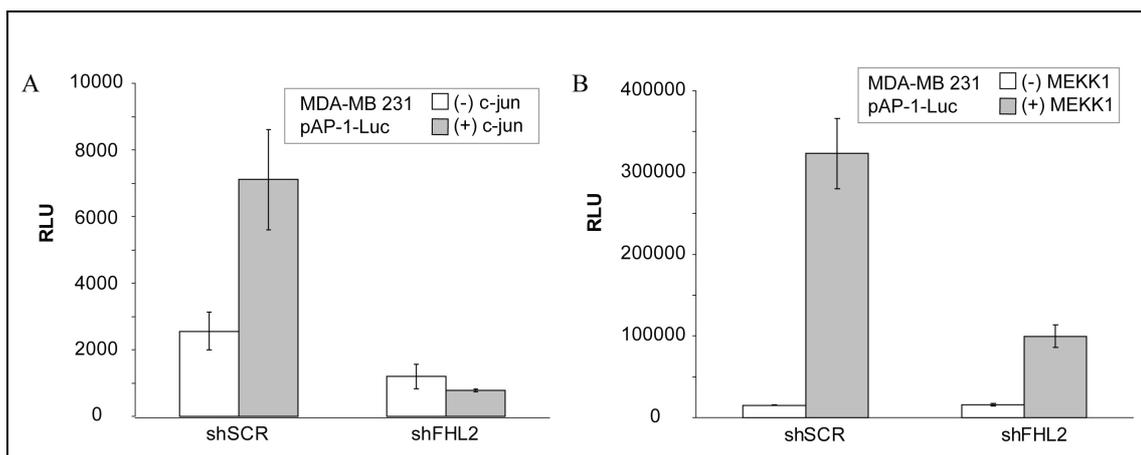


Abbildung 8: Effekt von FHL2 und c-jun auf einen AP-1 induzierbaren Promotor in MDA-MB 231-Zellen. MDA-MB 231 shSCR und shFHL2-Zellen wurden mit verschiedenen Konstrukten transfiziert (A) Es wurden 0,5 µg pAP-1-Reporterplasmid und 0,5 µg c-jun-Expressionsplasmid ko-transfiziert. Dabei aktiviert c-jun in den shSCR Kontrollzellen den AP-1-Promotor, nicht aber in den FHL2-defizienten shFHL2-Zellen. (B) Es wurden 0,5 µg pAP-1-Reporterplasmid und 0,5 µg MEKK1-Expressionsplasmid transfiziert. Analog zu (A) führt die Aktivierung der c-jun-phosphorylierender Kinasen in den shSCR-Kontrollzellen zu einer robusten Aktivierung des pAP-1-Reporterplasmids. In den FHL2-defizienten shFHL2-Zellen fällt diese Aktivierung deutlich geringer aus.

Durch die Integration der shRNA-Plasmide in das Genom der MDA-MB 231-Zellen bestand die Möglichkeit, dass wichtige Gene inaktiviert wurden. Um also auszuschließen, dass es sich bei den Beobachtungen um ein Artefakt oder einem *off-target* Effekt handelt, wurde der Versuch durch eine siRNA-vermittelten transienten FHL2-Reprimierung und anschließender Reporteranalyse mit dem pAP-1-Promotorplasmid in MTSV1-7 wiederholt.

MTSV1-7-Zellen (freundliche Gabe von Dr. Jiri Bartek) stammen ursprünglich aus normalen epithelialen Brustzellen, die mittels des SV40 Large T-Antigen immortalisiert wurden. Obwohl es sich hierbei um eine aus normalem Gewebe stammenden Zelllinie handelt, exprimiert sie, wahrscheinlich durch die induzierte Zellteilung, hohe Mengen an FHL2.

Mit diesen Zellen wurde der Versuch aus den MDA-MB 231 wiederholt. Sie wurden ausgesät und nach 24 h mit 0,5 µg c-jun-Expressionsplasmid und FHL2-Expressionsplasmid in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Dabei konnten die ursprünglichen Beobachtungen bestätigt werden. Auch in MTSV1-7-Zellen induziert c-jun das AP-1-abhängige Reporterplasmid. Bei einer Ko-Transfektion von c-jun und FHL2 wird diese Aktivierung aber nochmals amplifiziert (Abbildung 9a).

Das gleiche Bild ergibt sich bei einer transienten Reduktion der endogenen FHL2-Expression mittels siRNA. Dazu wurden MTSV1-7 24 h nach Aussaat mit siRNA gegen FHL2 (siFHL2), mit einer nicht wirksamen Kontrolle (siSCR), sowie nach 48 h mit 0,5 µg des pAP-1-Reporterplasmid transfiziert. Dabei ist in den mit siSCR transfizierten Zellen abermals eine robuste Aktivierung des pAP-1-Reporters durch endogenes c-jun zu beobachten. In den durch siRNA FHL2-reduzierten Zellen kann c-jun den Promotor nur noch schwach aktivieren (Abbildung 9b).

Obwohl die Daten aus den MDA-MB 231 den Beobachtungen aus den MCF7-Zellen widersprechen, korrelieren sie mit den Beobachtungen von Morlon *et al.*. Hier konnte eine Aktivierung von c-jun durch FHL2 gezeigt werden⁵⁹. Vermutlich ist die FHL2-abhängige AP-1-Repression in MCF7 ein Artefakt und FHL2 ist, wie in MDA-MB 231 und MTSV1-7 zu sehen, tatsächlich ein Ko-Aktivator von c-jun. Wie allerdings der in den Reporteranalysen beobachtete repressive Effekt in den MCF7-Zellen zustande kommt, ist unklar.

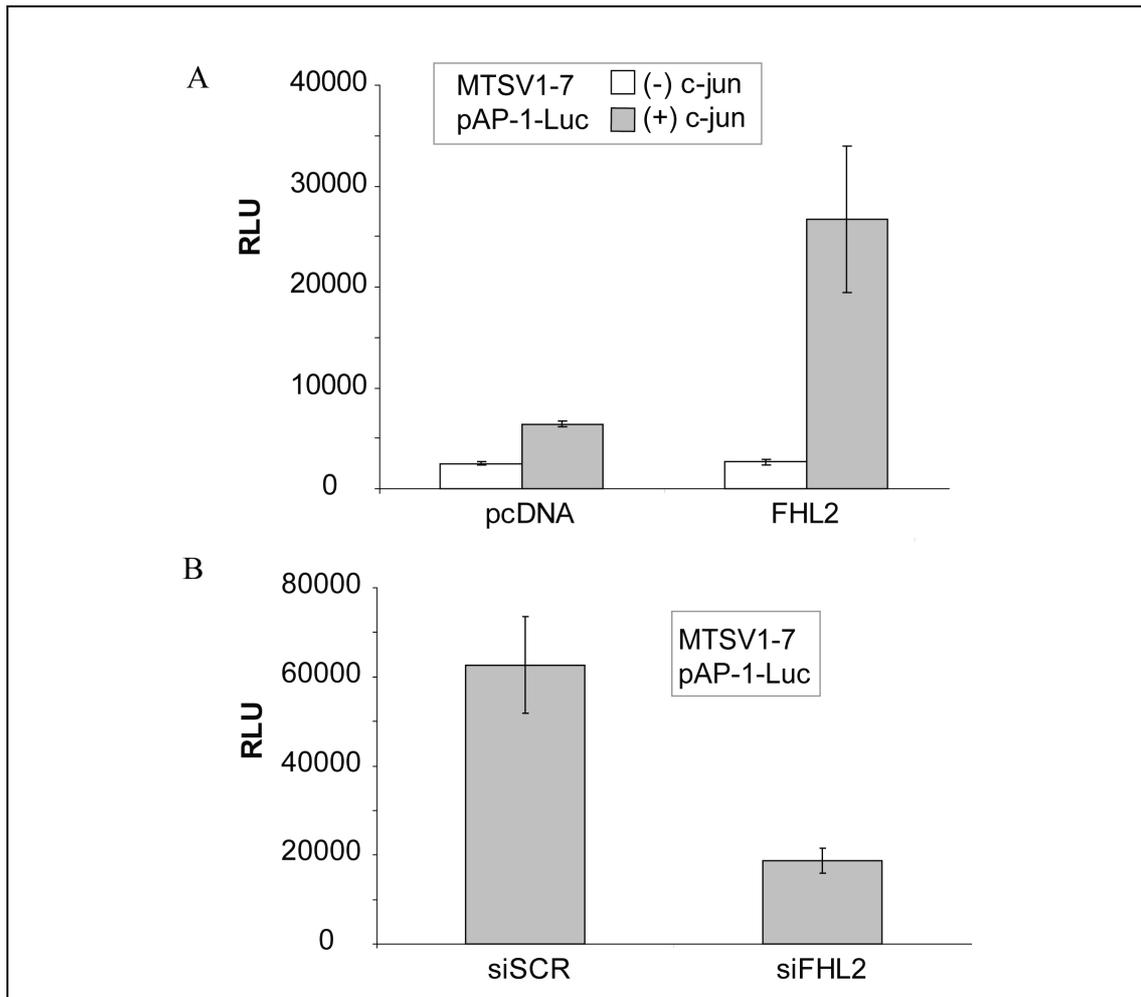


Abbildung 9: Effekt von FHL2 und c-jun auf einen AP-1 induzierbaren Promotor in MTSV1-7-Zellen. MTSV1-7-Zellen wurden mit 0,5 µg pAP-1-Reporterplasmid und verschiedenen Konstrukten transfiziert (A) Das pAP-1-Reporterplasmid wurde mit jeweils 0,5 µg FHL2- und 0,5 µg c-jun-Expressionsplasmid in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Dabei kann c-jun den AP-1-Promotor aktivieren. (B) Nach der Transfektion von siRNA gegen FHL2 (siFHL2) sowie eine Kontrolle (siSCR) wurde das pAP-1-Reporterplasmid transfiziert und der Effekt von endogenem FHL2 auf endogenes c-jun untersucht. Analog zu (A) trägt auch endogenes FHL2 signifikant zur c-jun-abhängige Aktivierung des AP-1-Promotors bei.

3.5 Die FHL2-abhängige AP-1-Regulierung

In vielen Karzinomarten ist c-jun in der Onkogenese involviert. Die bisherigen Daten zeigen, dass FHL2 zusammen mit c-jun die AP-1-Promotoraktivität moduliert. Daher war von Interesse, ob FHL2 einen Einfluss auf die Expression von c-jun-abhängigen Zielgenen ausübt.

Ein c-jun-Zielgen, das in über 50% aller Mammakarzinomen überexprimiert wird, ist das Zellzyklusprotein Cyclin D1⁸³. Cyclin D1 wird durch den AP-1-Transkriptionsfaktor über PKC- α und PKC- ϵ reguliert⁸⁴.

Um die FHL2-abhängige Cyclin D1-Expression zu bestimmen, wurde zwischen 0,05 µg und 1,0 µg FHL2 in FHL2-negative MCF7-WT-Zellen transfiziert und das Proteinexpressionsprofil von Cyclin D1 in Western-Blot Analysen untersucht.

In Abbildung 10a ist zu sehen, dass die Cyclin D1-Expression mit der Menge an transfizierten FHL2 korreliert. Bei 0,05 µg FHL2-Expressionsplasmid ist nur eine sehr geringe Menge an Cyclin D1 in der Zelle zu sehen (Spur 1), wogegen bei 1,0 µg eine starke Expression zu beobachten ist (Spur 5). Es war allerdings nicht auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten Korrelation zwischen der Cyclin D1- und FHL2-Expression um einen durch den Cyclin D1-Antikörper verursachte Kreuzreaktion mit anderen Cyclinen handelt oder das FHL2 die Expression weiterer Cycline moduliert. Daher wurde der Versuch mit Mengen zwischen 0 und 2,0 µg FHL2-Expressionsplasmid wiederholt und in Western-Blot Analysen das Expressionsprofil der Cyclin D1-verwandten Cycline D2 und E untersucht. Wie in Abbildung 10b zu sehen, hat die Expression von FHL2 keine Auswirkung auf die Cyclin D2- und Cyclin E-Expression. FHL2 reguliert somit spezifisch die Cyclin D1-Expression, nicht aber deren nahe Verwandte.

Cyclin D1 kann im Zellzyklus mehrere Aufgaben übernehmen, unter anderem die Regulation der Retinoblastom-Protein (RB-Protein)-Aktivität. Das RB-Protein wird durch Cyclin D1 im Zusammenspiel mit den CDKs 4 und 6 und durch Cyclin E mit CDK2 phosphoryliert. Es spielt nicht nur in der Brustkrebsentwicklung eine Rolle⁸⁵, sondern war das erste identifizierte Tumorsuppressorprotein⁸⁶.

Daher sollte in weiteren Versuchen ein Zusammenhang zwischen der FHL2-vermittelten Cyclin D1-Expression und der RB-Protein-Aktivität hergestellt werden. Dazu wurde eine Auswahl der Extrakte aus Abbildung 10b nochmals auf ihre RB-Protein-Expression untersucht (Abbildung 10c). Dabei ist in der FHL2-negativen Probe (Spur 1) eine RB Protein-Doppelbande zu sehen. Die untere Bande entspricht nicht phosphoryliertem RB Protein und die obere phosphoryliertem. Bei einer steigenden Konzentration von FHL2 (Spur 2-4) nimmt die Menge an phosphoryliertem RB Protein ebenfalls zu. Diese Beobachtung bestätigt die Daten aus Abbildung 10a. Durch die FHL2-abhängige Regulierung der Cyclin D1-Expression wird wahrscheinlich, im Zusammenspiel mit CDK4 und 6, der Phosphorylierungsstatus und letztendlich die Aktivität des RB Proteins Komplex

gesteuert. Dabei scheint die Regulation über den Cyclin E-CDK2-Komplex keine Rolle zu spielen.

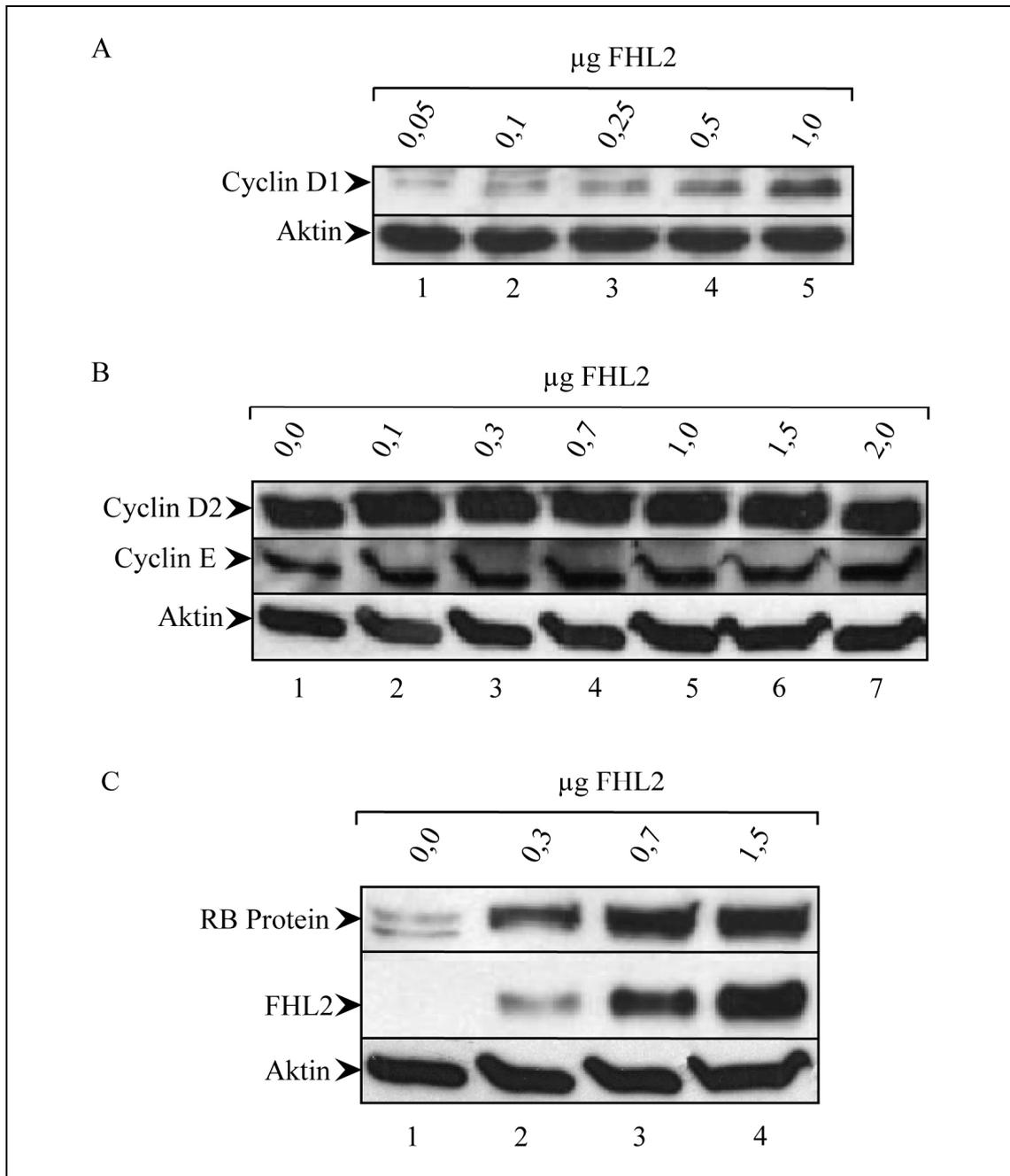


Abbildung 10: Effekt von FHL2 auf die Cyclin D1 Expression in MCF7. MCF7-WT-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen FHL2-Expressionsplasmid transfiziert und die Expression verschiedener Zielproteine untersucht. **(A)** Es wurden zwischen 0,05 und 1,0 µg FHL2 Expressionsplasmid in MCF7-Zellen transfiziert. Dabei zeigt sich, dass die Cyclin D1 Expression mit steigender FHL2-Konzentration zunimmt. **(B)** Die steigende FHL2-Expression hat keine Auswirkung auf die Cyclin D2 und Cyclin E Expression. **(C)** Bei einer Auswahl an Proteinextrakten aus **(B)** wurde das Expressionsprofil des RB-Proteins untersucht. In der oberen Bande zeigt sich, dass FHL2 die Phosphorylierung des RB Protein reguliert.

Diese Beobachtung konnte zwischenzeitlich von Labalette *et al.* bestätigt werden. In embryonalen Mäusefibroblasten (MEF) gibt es ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der FHL2-Expression, der Cyclin D1-Expression und dem Phosphorylierungsstatus des RB Proteins⁶⁹.

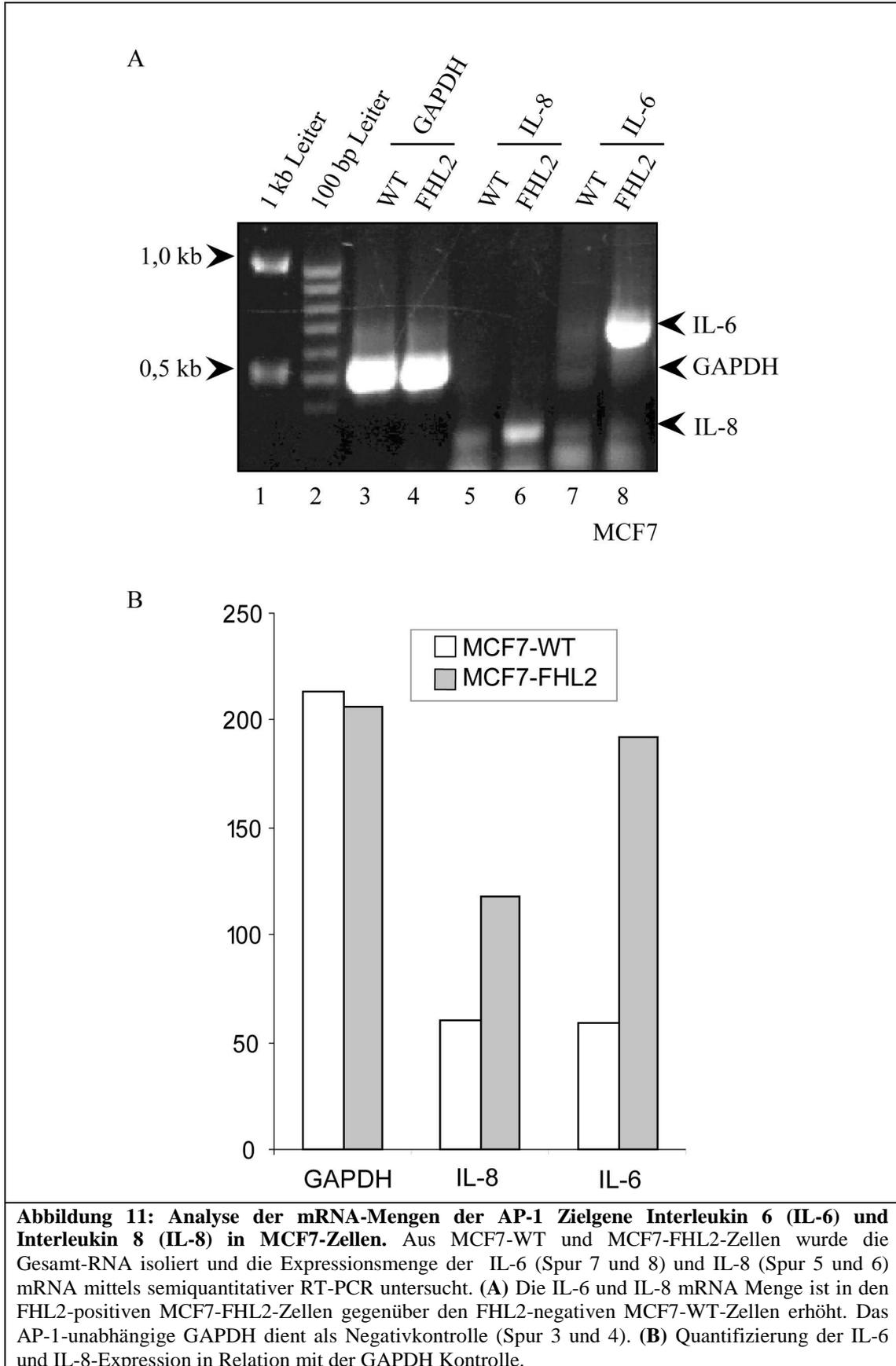
Die Induzierung der Cyclin D1-Expression ist ein weiteres Indiz für die FHL2-abhängige Induzierung der AP-1-abhängigen Transkription. Allerdings konnte bei Reporteranalysen in den MCF7-Zellen eine Repression der FHL2-vermittelten c-jun-Aktivität gezeigt werden. Ob FHL2 also doch endogene AP-1-abhängige Promotoren induzieren kann, sollten weitere Versuche zeigen.

Daher wurde der mRNA-Status der bekannten AP-1 abhängigen Proteine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) zwischen den FHL2-negativen MCF7-WT und den konstitutiv FHL2-exprimierenden MCF7-FHL2-Zellen verglichen. IL-8 spielt ebenfalls in der Onkogenese eine Rolle. Es ist bekannt, dass die IL-8-Expression mit einer erhöhten Invasivität und dem metastatischen Potential des Tumors in Zusammenhang steht und daher zur Brustkrebsentstehung beitragen kann^{87, 88}.

Dazu wurde die Gesamt-RNA beider Zelllinien isoliert und in einer semiquantitativen RT-PCR mit genspezifischen IL-6 und IL-8 Primern eingesetzt. Wie in Abbildung 11 zu sehen, führt die konstitutive Expression von FHL2 in den MCF-FHL2 Zellen zu einer Induzierung von IL-6 (Spur 7 und 8) und IL-8 (Spur 5 und 6), wogegen die GAPDH-Kontrolle davon unbeeinflusst bleibt (Spur 3 und 4). Die Quantifizierung in Relation zur GAPDH-Kontrolle zeigt in den MCF7-FHL2-Zellen eine 1,9-fache Aktivierung von IL-8 und eine 3,2-fache Aktivierung von IL-6 gegenüber der FHL2-negativen MCF7-WT auf (Abbildung 11b).

Diese Daten widersprechen abermals den Reporteranalysen aus den MCF7-Zellen. Allerdings korrelieren sie mit den Reporteranalysen aus MDA-MB 231 und MTSV1-7. Auch die Western-Blot Analysen der Cyclin D1 Expression und der nachfolgenden RB Protein-Phosphorylierungen deuten nicht auf FHL2 als einen Ko-Repressor der c-jun-abhängigen AP-1-Aktivität hin.

Aufgrund dieser Daten lässt sich sagen, dass es sich bei FHL2 um einen Ko-Aktivator von c-jun handelt, es aber einen weiteren, bisher unbekanntem Mechanismus gibt, durch den FHL2 zumindest in Reporteranalysen in MCF7-Zellen als Ko-Repressor fungiert.



3.6 Die Interaktion zwischen FHL2 und c-jun

Es konnte bisher gezeigt werden, dass FHL2 die c-jun-abhängige AP-1-Promotoraktivität reguliert. Zudem ist bekannt, dass c-jun und FHL2 in Affennierenzellen und Mausfibroblasten miteinander interagieren⁵⁹. Ob dies aber auch im Mammakarzinom der Fall ist und ob die beobachtete Regulation indirekt oder durch direkte Interaktion vermittelt wird, war nicht bekannt.

In Immunfluoreszenzanalysen sollte zunächst ermittelt werden, ob c-jun und FHL2 überhaupt in den gleichen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Daher wurden MCF7-Zellen auf Objektträger ausgesät und nach 24 h mit 0,5 µg eines FHL2-Expressionsplasmids sowie 0,5 µg eines c-jun Expressionsplasmids ko-transfiziert.

In anschließenden Immunfluoreszenzanalysen konnte die Lokalisation beider Proteine festgestellt werden. Wie in Abbildung 12 zu beobachten, ist FHL (rot) im Kern lokalisiert. Aber auch im Cytosol ist eine FHL2-Färbung zu erkennen. Das transfizierte c-jun (grün) ist hingegen ausschließlich im Kern zu finden, was die DAPI-Kernfärbung (blau) bestätigt. Ein Überlagern der Bilder bestätigt nochmals, dass FHL2 und c-jun im Kern lokalisiert sind.

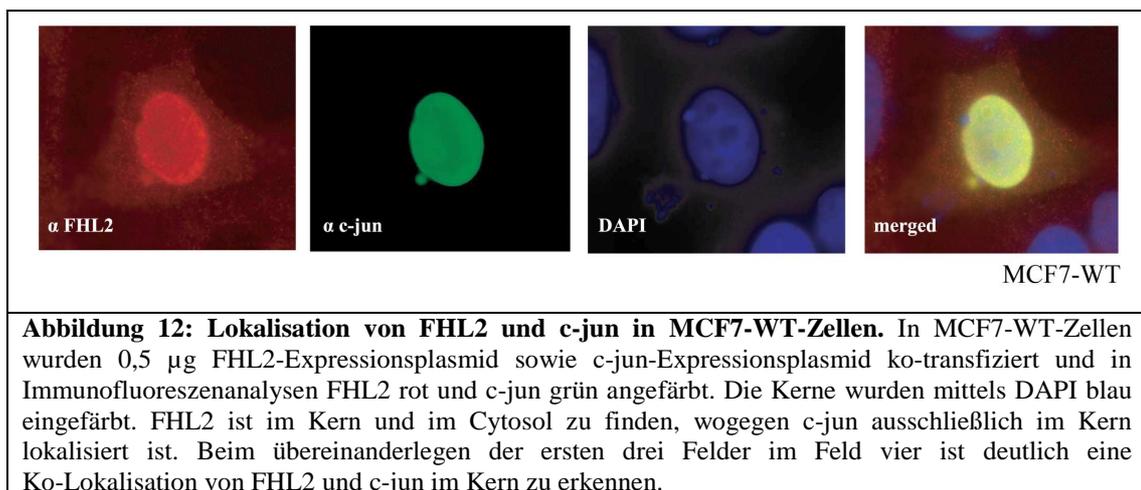


Abbildung 12: Lokalisation von FHL2 und c-jun in MCF7-WT-Zellen. In MCF7-WT-Zellen wurden 0,5 µg FHL2-Expressionsplasmid sowie c-jun-Expressionsplasmid ko-transfiziert und in Immunofluoreszenzanalysen FHL2 rot und c-jun grün angefärbt. Die Kerne wurden mittels DAPI blau eingefärbt. FHL2 ist im Kern und im Cytosol zu finden, wogegen c-jun ausschließlich im Kern lokalisiert ist. Beim übereinanderlegen der ersten drei Felder im Feld vier ist deutlich eine Ko-Lokalisation von FHL2 und c-jun im Kern zu erkennen.

Ob es sich dabei allerdings lediglich um eine Ko-Lokalisation oder eine direkte Interaktion zwischen FHL2 und c-jun handelt, war anfangs nicht bekannt. Um dies zu klären, wurden *In Vitro Pull-Down* Interaktionsstudien mit bakteriell exprimierten

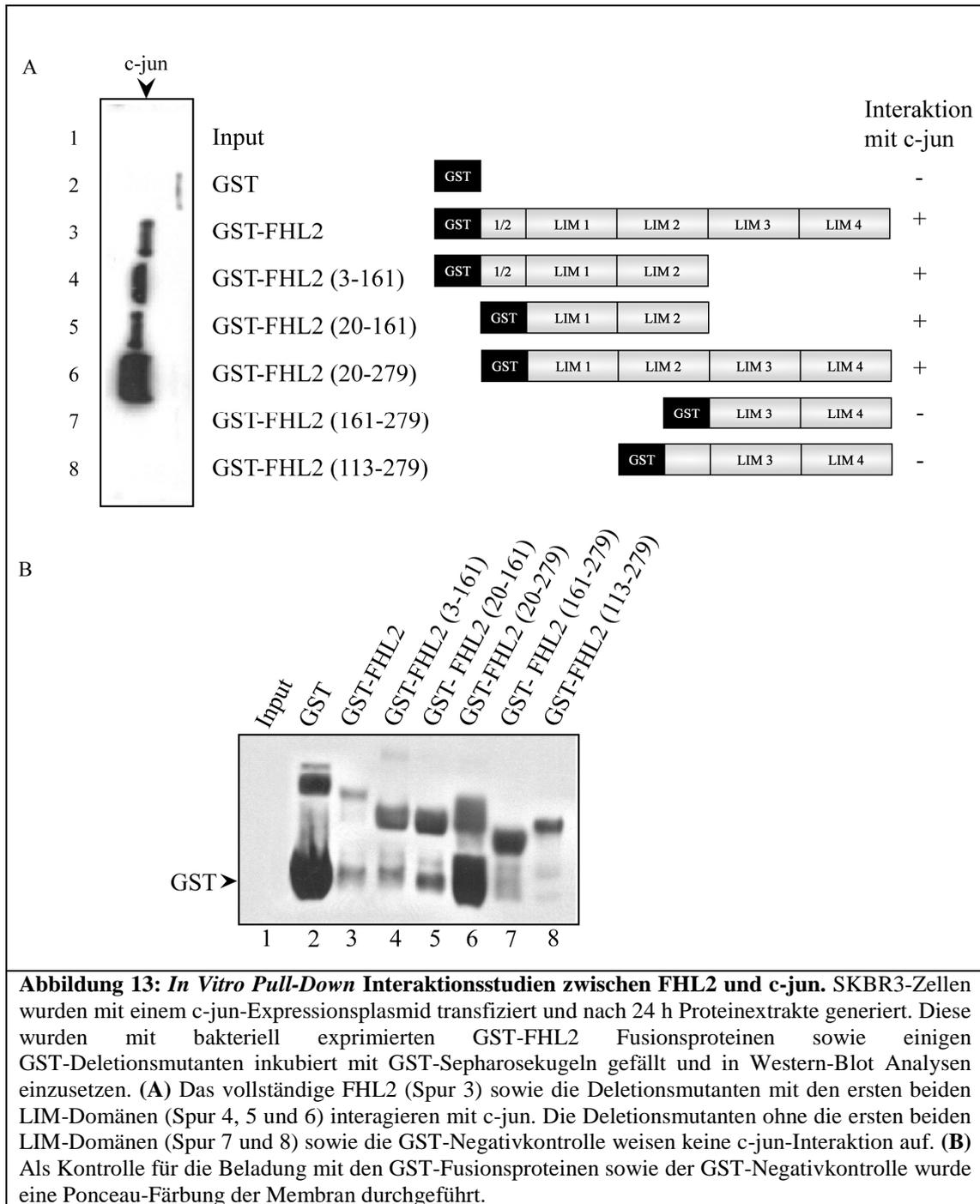
und GST-markiertem FHL2-Protein (GST-FHL2), sowie verschiedenen GST-FHL2 Deletionsmutanten durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde ein c-jun-Expressionsplasmid in SKBR3-Zellen (Abbildung 3c, Spur 8) transfiziert und daraus nach 24 h Proteinextrakt gewonnen. Die anschließende Fällung erfolgte mit bakteriell exprimiertem GST-FHL2-Protein und den entsprechenden FHL2-Deletionsmutanten. Als Kontrolle diente bakteriell exprimiertes GST.

Anschließende Western-Blot Analysen zeigen, dass das vollständige FHL2, nicht aber die GST-Negativkontrolle, c-jun präzipitiert (Abbildung 13, Spur 2 und 3). Durch die verschiedenen FHL2-Deletionsmutanten konnte die Interaktionsdomäne auf den N-Terminus beschränkt werden (Spur 4). Es zeigte sich auch, dass die erste halbe LIM-Domäne ebenfalls nicht für eine Interaktion benötigt wird (Spur 5 und 6). Die FHL2-Deletionsmutanten, die nur den C-Terminus besitzen, sind hingegen nicht in der Lage, c-jun zu präzipitieren (Spur 7 und 8). Die FHL2-c-jun Interaktionsdomäne muss daher auf einem Bereich in den ersten beiden LIM-Domänen, genauer zwischen Aminosäure 20 und 131, liegen.

Eine anschließende Ponceau-Färbung auf der PVDF-Membran stellte sicher, dass das beobachtete Interaktionsmuster nicht auf unterschiedlichen Mengen eingesetzten Fusionsproteins zurückzuführen ist (Abbildung 13b).

Die über die LIM-Domänen 1 und 2 vermittelte Interaktion von FHL2 mit c-jun korreliert abermals mit den Daten aus den Reportergenanalysen in MCF7-Zellen. Nur das komplette FHL2 sowie die Deletionsmutanten, die noch diese ersten beiden LIM-Domänen besitzen, können die c-jun-abhängige Aktivierung des pAP-1-Promotors modulieren (Abbildung 7c).



In anschließenden Ko-Imunopräzipitationsversuchen (Co-IP) sollte untersucht werden, ob FHL2 auch *in vivo* mit c-jun interagiert. Dazu wurden stabil FHL2-exprimierende MCF7-FHL2 ausgesät und nach 24 h mit einem c-jun-Expressionsplasmid transfiziert. Da c-jun ausschließlich im Kern exprimiert wird (Abbildung 12), wurden die Zellen in ihre cytosolischen und nukleären

Komponenten geteilt, aus diesen Proteinextrakte gewonnen und anschließend in der Immunpräzipitation (IP) eingesetzt.

Dabei wurden die Extrakte jeweils mit dem FHL2, dem c-jun und dem Wee1-Antikörper präzipitiert und in Western-Blot Analysen untersucht. Als Ladekontrolle kam ungefällter Proteinextrakt (Input) sowie als Negativkontrolle der Wee1-Antikörper zum Einsatz. Die präzipitierten Extrakte sowie der Input wurden in zwei Western-Blot Analysen eingesetzt und die Membranen jeweils mit FHL2 Antikörper (Abbildung 14a) und mit c-jun Antikörper (Abbildung 14b) inkubiert.

In Abbildung 14a ist zu sehen, dass sowohl im Cytosol, als auch im Kern FHL2 vorhanden ist und somit präzipitiert werden konnte (Spur 2 und 6). Bei der IP mit c-jun ist allerdings im Cytosol keine Interaktion mit FHL2, wohl aber im Kern (Spur 3 und 7), zu beobachten. Der Immunoblot mit dem c-jun Antikörper (Abbildung 14b) bestätigt die Daten aus Abbildung 14a. FHL2 interagiert nicht mit c-jun im Cytosol, wohl aber im Kern (Spur 2 und 6).

Die Daten aus der Immunfluoreszenz, dem *Pull-Down* und der Co-IP zeigen, dass FHL2 und c-jun im Kern ko-lokalisiert sind und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* direkt miteinander interagieren können. Diese Interaktion wird über die LIM-Domänen 1 und 2 vermittelt, während die LIM-Domänen 3 und 4 hierfür nicht benötigt werden.

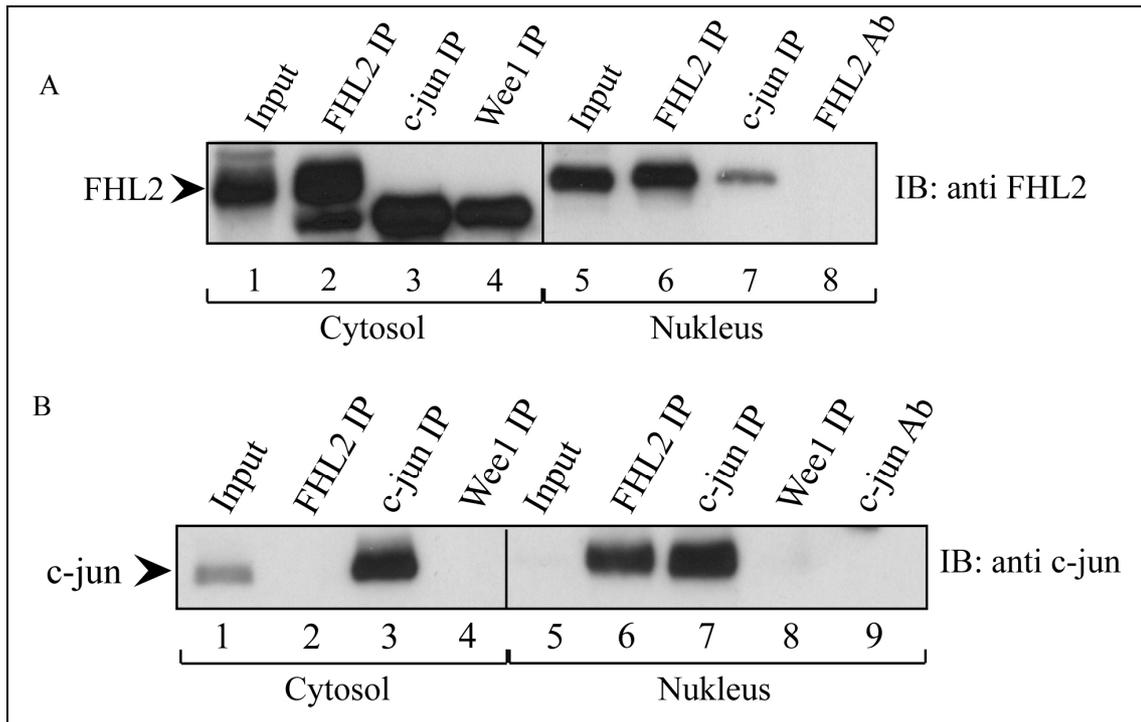


Abbildung 14: In vivo Co-IP Interaktionsstudien mit FHL2 und c-jun. MCF7-FHL2-Zellen wurden mit c-jun transfiziert und nach 24 h geerntet. Bei der Gewinnung der Proteinextrakte wurde die cytosolische und nukleäre Phase voneinander getrennt isoliert und in die Co-IP eingesetzt. Die Proteinextrakte wurden mit den angegebenen Antikörpern immunopräzipitiert. Als Kontrolle wurde ungefällter Proteinextrakt geladen. **(A)** FHL2 interagiert im Kern mit c-jun (Spur 7), nicht aber im Cytosol (Spur 3). Dabei dienten FHL2 als Positiv- und Wee1 als Negativkontrolle. **(B)** In der Immunoblotbehandlung mit einem c-jun Antikörper bestätigen sich die Beobachtungen aus (A). FHL2 interagiert im Kern mit c-jun (Spur 6), nicht aber im Cytosol (Spur 2). Dabei dienten c-jun als Positiv- und Wee1 als Negativkontrolle.

3.7 Die Rolle von FHL2 in der Zellzyklusregulation

Das Ausfallen der Zellzykluskontrolle ist eines der Kennzeichen der Onkogenese. Dabei kommt es in der Regel zu einer Störung der Kontrollpunktregulation. Diese kann zum Beispiel durch die Mutation verschiedener Transkriptionsfaktoren wie p53⁸⁹ verursacht werden. Aber auch die Deregulation von Zellzyklusregulatoren wie Cycline und Zellzyklusinhibitoren wie p21⁹⁰ spielen eine Rolle.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass FHL2 in verschiedenen Karzinomen, unter anderem im Mammakarzinom, überexprimiert ist⁴⁴. Des Weiteren kann FHL2 die Aktivität cyclinabhängiger Proteinen und verschiedener Mitglieder des MAPK-Signaltransduktionswegs modulieren.

Einen weiteren Hinweis auf eine Rolle von FHL2 im Zellzyklus ist die Modulation der Zellproliferation auf transkriptioneller Ebene. Dabei vermittelt FHL2 die Repression des Transkriptionsfaktors E4F1 im Kern, was die Inhibierung der

Zellzyklusprogression zur Folge hat⁶³. Welche Rolle FHL2 genau in der Zellzyklusprogression spielt, sollte im Folgenden näher untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Zellzyklusverteilung FHL2-negativer/reduzierter und FHL2-positiver Zelllinien miteinander verglichen. Zum Einsatz kamen dabei die beiden FHL2-negativen MCF7-WT und FHL2-reduzierte MDA-MB 231 shFHL2 sowie die beiden FHL2-positiven MCF7-FHL2 und MDA-MB 231 shSCR Zelllinien (Abbildung 15). Dazu wurden alle Zelllinien ausgesät, durch einen Doppelthymidinblock auf den G1/S-Übergang synchronisiert und anschließend durch Mediumwechsel aus der Arretierung entlassen. Danach wurden die Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Entlassung geerntet, fixiert und die DNA mit Propidiumiodid eingefärbt. Für jede Messung wurden im FACScan 5.000 Zellen berücksichtigt.

Obwohl in Western-Blot Analysen eine klare Regulation des Zellzyklusproteins Cyclin D1 sowie eine Modulation der RB Protein-Aktivität gezeigt werden konnte (Abbildung 10), spiegelt sich dies bei einem Vergleich der MCF7-WT und MCF7-FHL2 in der Zellzyklusverteilung nicht wider (Abbildung 15a). Die beobachteten Daten liegen fast alle in einem Toleranzbereich von ca. 5%. Trotzdem lassen sich aus den Beobachtungen Tendenzen ermitteln. Bei 0 h ist zu sehen, dass der G0/G1 Block mit 70,5% (WT) bzw. mit 65,5% (FHL2) erfolgreich war. Nach dem Entlassen ist zu sehen, dass die MCF7-WT-Zellen den Zellzyklus etwas schneller durchlaufen als die MCF7-FHL2-Zellen.

Nach 3 h haben 44% (WT) bzw. 47% (FHL2) die S-Phase erreicht. Nach 6 h sind bereits 34% der MCF7-WT-Zellen in der G2/M Phase angekommen, jedoch nur 30% der MCF7-FHL2-Zellen. Nach 8 h haben mit 40% die meisten MCF7-WT-Zellen die G2/M Phase erreicht. Danach sinkt ihr Anteil über 39,5% nach 12 h und 32% nach 14 h auf 25,5% nach 18 h ab. Da die Werte zwischen 8 h und 12 h relativ dicht aneinander liegen, ist das eigentliche Maximum wahrscheinlich zwischen diesen beiden Zeitpunkten. In MCF7-FHL2-Zellen ist das Maximum mit 47,5% der Zellen in der G2/M Phase erst nach 12 h erreicht und sinkt danach über 38,5% nach 14 h auf 29,5% nach 18 h ab. Die MCF7-FHL2-Zellen durchlaufen den Zellzyklus anscheinend langsamer als die MCF7-WT-Zellen. Die bereits bekannte

FHL2-vermittelte proliferationsinhibierende Funktion⁶³ konnte also auch in MCF7-Zellen nachvollzogen werden.

Um ein differenzierteres Bild über die Rolle von FHL2 im Zellzyklus zu erhalten, wurde ebenfalls die Zellzyklusverteilung von MDA-MB 231 shSCR und shFHL2-Zellen miteinander verglichen (Abbildung 15b). Allerdings war der Doppelthymidinblock weniger effizient als bei den MCF7-Zellen. Es befinden sich jeweils nur 55% (shSCR) bzw. 56,5% (shFHL2) der Zellen in der G0/G1 Phase. Nach Aufhebung des Blocks ist der Verlauf der Zellen bis 10 h stark vergleichbar. Hier hielten sich 45,5% (shSCR) bzw. 43,5% (shFHL2) der Zellen in der G2/M-Phase auf. Nach 12 h befanden sich noch 42% der shSCR-Zellen in der G2/M Phase. In den shFHL2 finden sich nur noch 33,5% der Zellen in der G2/M-Phase. 46% der shFHL2-Zellen, gegenüber 36% der shSCR-Zellen, sind bereits in die G0/G1-Phase eingetreten. Die shSCR-Zellen verlassen erst nach 14 h die G2/M-Phase und treten in die G0/G1-Phase ein. Aber während sich in den shSCR-Zellen noch 34% der Zellen in der G2/M-Phase befanden, waren es in den shFHL2-Zellen nur noch 19%. Diese Beobachtungen belegen, dass MDA-MB 231-Zellen in der Abwesenheit von FHL2 die Mitose schneller durchlaufen können.

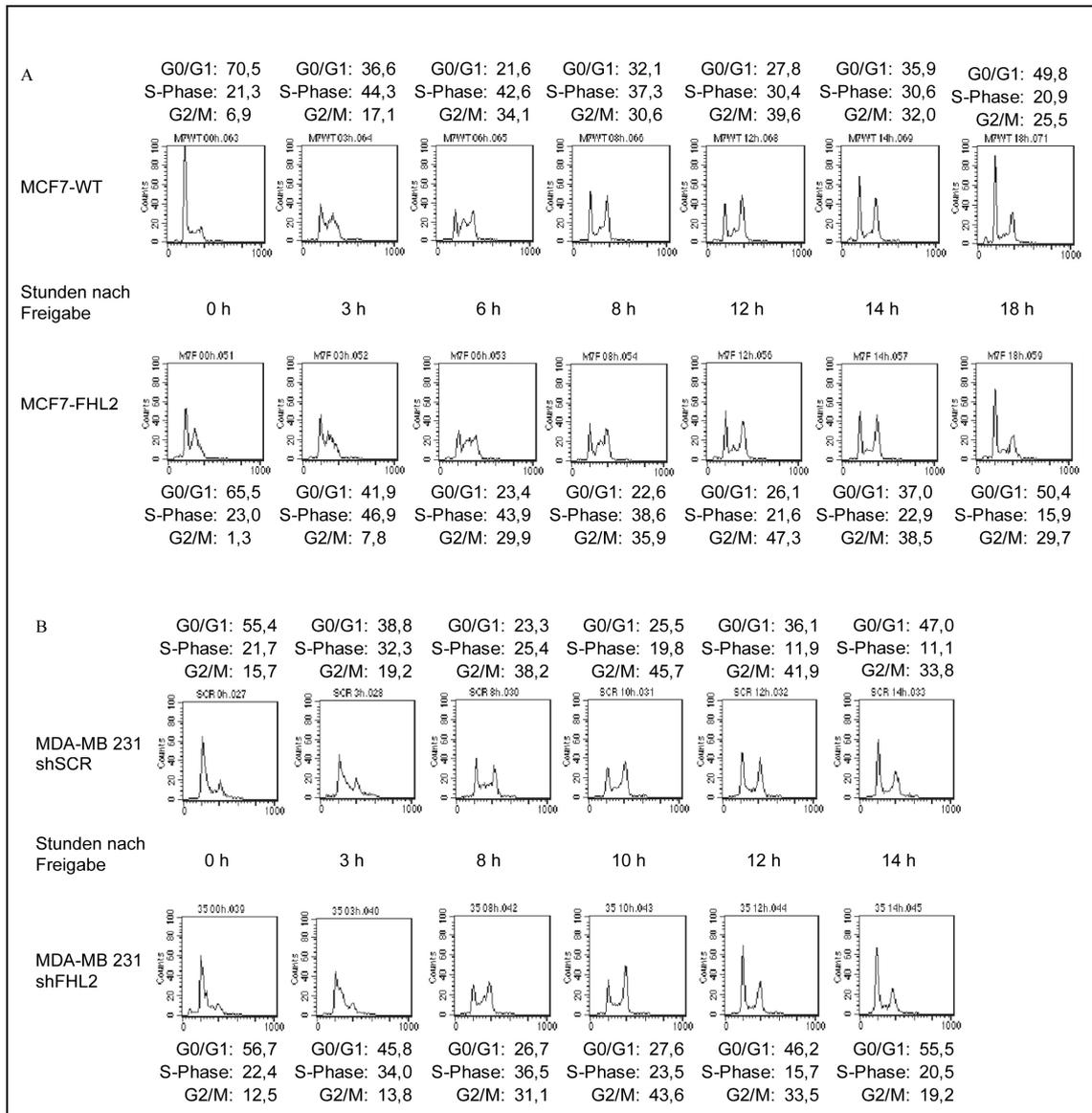


Abbildung 15: Zellzyklusprogression von MCF7-WT-, MCF7-FHL2-, MDA-MB 231 shSCR- und MDA-MB 231 shFHL2-Zellen. MCF7-WT-, MCF7-FHL2-, MDA-MB 231 shSCR- und shFHL2-Zellen wurden durch einen Doppelthymidinblock am G1/S-Übergang arretiert und an den angegebenen Zeitpunkten nach Entlassung geerntet. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. **(A)** Die FHL2-exprimierenden MCF7-FHL2-Zellen weisen, gegenüber den MCF7-WT-Zellen, ein leicht verzögertes Wachstum auf. **(B)** Die shFHL2-Zellen weisen einen, verglichen mit den shSCR-Zellen, beschleunigten G2/M Übergang auf.

Um die FHL2-abhängigen Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen zu verdeutlichen, wurde die MCF7-WT, MCF7-FHL2, MDA-MB 231 shSCR und MDA-MB 231 shFHL2-Zellen in einem MTT-Proliferationsassay eingesetzt (Abbildung 16). Dazu wurde eine identische Anzahl Zellen in 96-well Platten ausgesät, an entsprechenden Zeitpunkten mit MTT-Reagenz (ProMega) versetzt und für eine Stunde inkubiert. Mit einem Luminometer wurde die Farbveränderung des

zugegebenen Substrats, die mit der Menge an lebenden Zellen korreliert, bei 550 nm bestimmt.

Wie bereits aus der Zellzyklusmessung zu erwarten war, wachsen die konstitutiv FHL2 exprimierenden MCF7-FHL2-Zellen langsamer als die FHL2-negativen MCF-WT-Zellen (Abbildung 16a). Bei den MDA-MB 231 ergibt sich ein ähnliches Bild. Wenn in den Zellen FHL2 konstitutiv reprimiert wird (MDA-MB 231 shFHL2), beschleunigt sich das Wachstum gegenüber der FHL2-positiven Kontrollzelllinie (MDA-MB 231 shSCR).

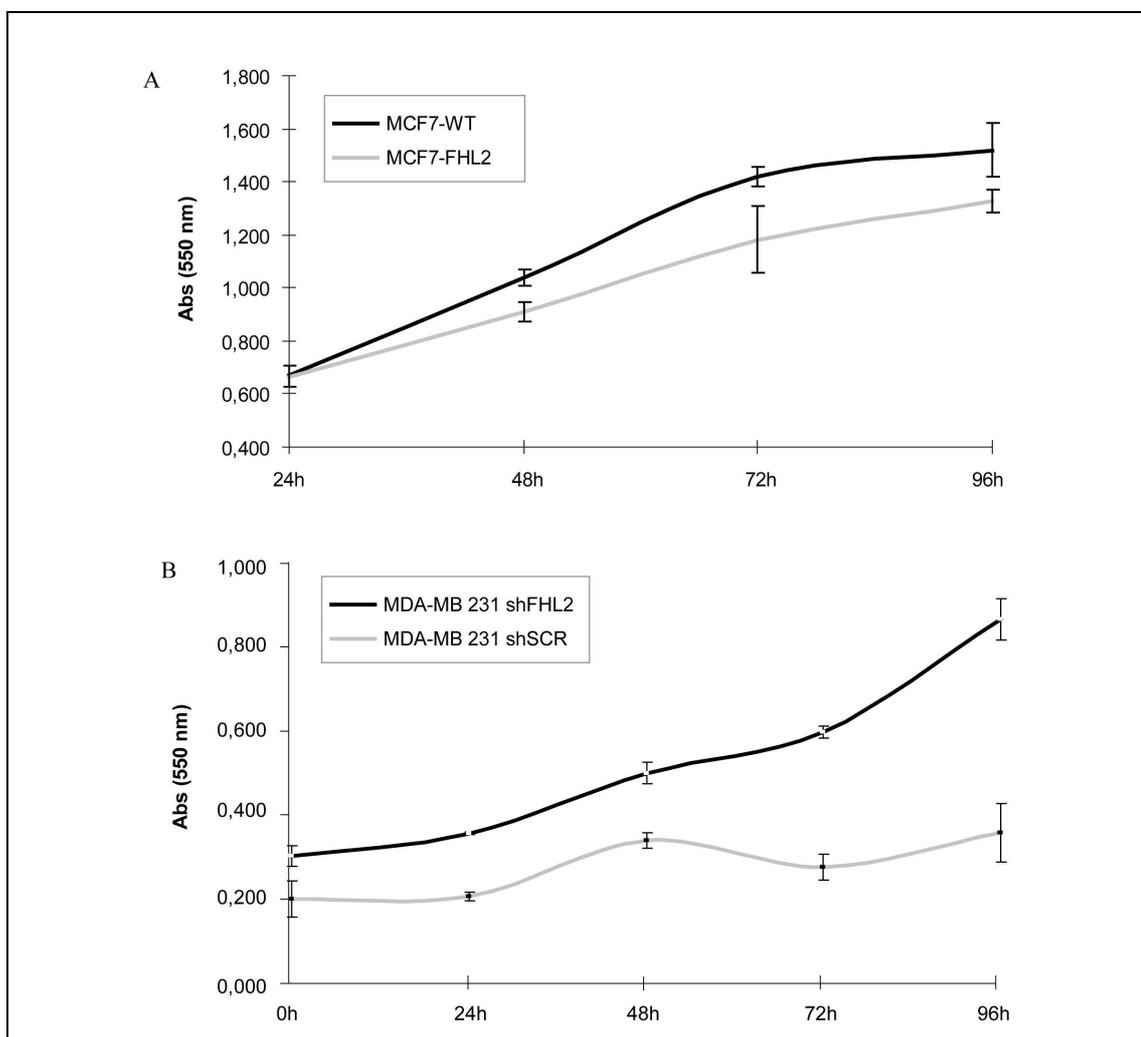


Abbildung 16: Proliferationsassay mit FHL2-exprimierenden und FHL2-reduzierten und FHL2-negativen Zelllinien. MCF7-WT, MCF7-FHL2, MDA-MB 231 shSCR und MDA-MB 231 shFHL2-Zellen wurden in 96-well Platten ausgesät, an den angegebenen Zeitpunkten für 1 h mit MTT-Substrat versetzt und die Absorption bei 550 nm im Luminometer gemessen. Die Absorption steht in Relation mit der Anzahl der Zellen im untersuchten well. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. **(A)** Die konstitutiv FHL2-exprimierenden MCF7-FHL2-Zellen wachsen langsamer als die FHL2-negativen MCF7-WT-Zellen. **(B)** Ein ähnliches Bild zeigt sich in den MDA-MB 231-Zellen. Die FHL2-reduzierten shFHL2 wachsen schneller als die FHL2-exprimierenden shSCR-Zellen. FHL2 scheint einen proliferationsinhibierenden Effekt auf die Zellen zu haben.

Die Zellzyklusmessung und der Proliferationsassay weisen beide auf einen proliferationssinhibitorischen Effekt durch die Modulation der Zellzyklusprogression hin. Während in den MCF7-FHL2-Zellen die Zellzyklusprogression allgemein verzögert stattfindet (Abbildung 15a), unterscheidet sich der Zellzyklusverlauf bis zur Mitose in den MDA-MB 231-Zellen nicht wesentlich. Erst nach 10 h ist ein FHL2-abhängiger Effekt im Übergang zur Mitose zu beobachten. Wenn FHL2 vorhanden ist, verbleiben die Zellen länger im G2/M-Kontrollpunkt, wogegen sie bei FHL2-Reduktion diesen schneller verlassen (Abbildung 15b). Die Daten aus den MDA-MB 231-Zellen weisen auf eine Rolle von FHL2 bei der G2/M-Kontrollpunktregulation hin.

Um dies genauer zu beleuchten, wurden MDA-MB 231 shSCR und shFHL2-Zellen ausgesät und genauso wie für die Zellzyklusmessung behandelt. Das anschließend gewonnene Proteinextrakt wurde in Western-Blot Analysen eingesetzt (Abbildung 17). Überraschenderweise stellte sich heraus, dass in den MDA-MB 231 shSCR-Zellen FHL2 anscheinend zellzyklusabhängig exprimiert wird (Abbildung 17a). Wie man erkennen kann, steigt die FHL2-Konzentration in der Zelle im Laufe des Zellzyklus an. In der Quantifizierung (Abbildung 17a, unten) wurde die FHL2-Expression relativ zur Tubulinexpression ermittelt. Hier zeigt sich nochmals, dass die FHL2-Expression (weiße Balken) im Laufe des Zellzyklus zuerst ansteigt, und zum Ende hin wieder abfällt.

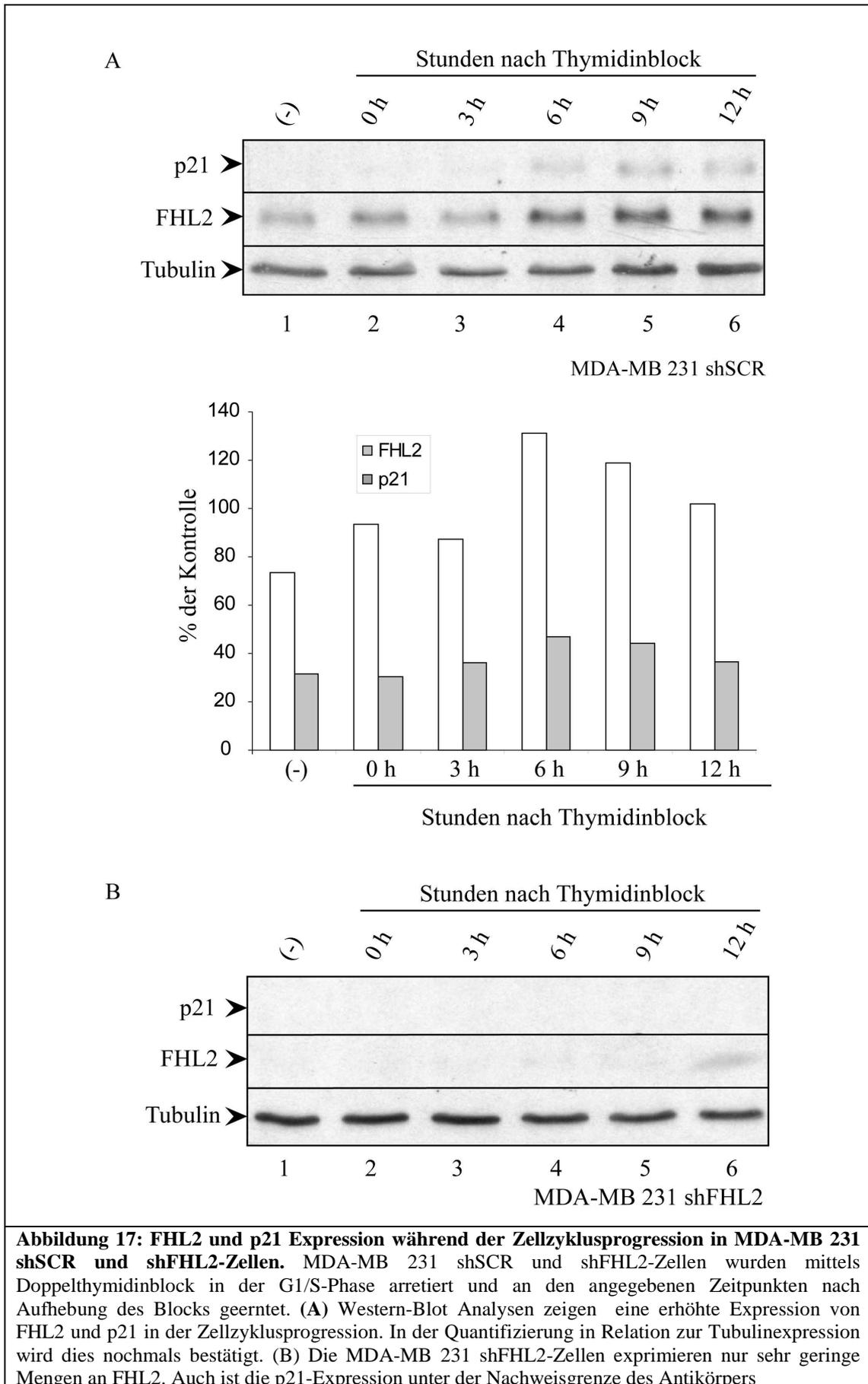
Es stellte sich nun die Frage, warum die FHL2-negative MDA-MB 231 shFHL2-Zelllinie die Mitose schneller durchläuft als die endogen FHL2-exprimierenden shSCR-Zellen.

Zellen brauchen einen aktivierten G2/M-Kontrollpunkt, um eine eventuell nötige DNA-Reparatur oder die Apoptose einzuleiten. Die MDA-MB 231 shFHL2-Zellen scheinen diesen Kontrollpunkt aber, im Vergleich zu den shSCR-Zellen, schneller zu passieren. Daher wurde im folgendem das Verhalten des Zellzyklusinhibitors p21, der in der Aktivierung des G1/S und G2/M-Kontrollpunkts eine wichtige Rolle spielt⁹¹, näher untersucht.

Dazu wurde die Membran mit den aufgetragenen MDA-MB 231 shSCR-Extrakten mit einem p21 Antikörper inkubiert. Dabei zeigt sich, dass p21, wie erwartet,

zellzyklusabhängig reguliert wird (Abbildung 17a, oberes Panel), was sich auch in der Quantifizierung widerspiegelt (Abbildung 17a, unteres Panel, graue Balken).

Um zu sehen, ob es einen Zusammenhang zwischen der p21- und FHL2-Expression gibt, wurden MDA-MB 231 shFHL2-Zellen ebenfalls einem Zellzyklusblock ausgesetzt und in Western-Blot Analysen untersucht (Abbildung 17b). Wie erwartet kann hier keine FHL2-Expression detektiert werden, überraschenderweise aber auch keine p21-Expression. Es scheint, als benötigen die MDA-MB 231-Zellen FHL2, um die p21-Expression zu induzieren. Wenn demnach kein FHL2 vorhanden ist, wird der Zellzyklusinhibitor p21 nicht exprimiert und die Zelle kann, wie in der Zellzyklusmessung zu sehen ist (Abbildung 15), den G2/M-Kontrollpunkt schneller durchlaufen und früher in die Mitose eintreten. Der beschleunigte G2/M-Übergang erklärt gleichzeitig die erhöhte Proliferationsrate der FHL2-reduzierten Zellen (Abbildung 16).



Die Expression von p21 wird bei DNA-Schädigung induziert. Dies führt zu einem G2-Arrest, wodurch die Zelle die Möglichkeit zur Reparatur bekommt⁹². Um zu klären, ob FHL2 für die Induktion der p21-Expression in MDA-MB 231-Zellen verantwortlich ist, wurden shSCR und shFHL2 mit 3,4 μ M Doxorubicin, einem Zytostatikum, das mit der DNA interkaliert und diese schädigt, inkubiert. Nach 16 h wurden Proteinextrakte aus den Zellen gewonnen und die p21-Expression mittels Western-Blot Analyse ermittelt. In Abbildung 18a ist zu sehen, dass p21 in den FHL2-positiven MDA-MB 231 shSCR-Zellen exprimiert wird (Spur 1), nicht aber in den FHL2-reduzierten shFHL2-Zellen (Spur 2). Diese Beobachtung bestätigt nochmals die Daten aus den Zellzyklus-Western-Blot Analysen (Abbildung 17). Ein ähnliches Bild zeigt sich in den Doxorubicin-behandelten Zellen. Wie zu erwarten exprimierten die shSCR-Zellen nach der Doxorubicin-induzierten DNA-Schädigung eine große Menge an p21 (Spur 3), in den shFHL2-Zellen ist hingegen keine p21-Expression zu erkennen. Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt auf eine Integration der shRNA in den p21-Lokus zurückzuführen ist, wurde die endogene FHL2-Expression in MTSV1-7-Zellen transient mit siRNA gegen FHL2 (siFHL2) reduziert und die p21-Expression überprüft (Abbildung 18b). Dabei bestätigten sich die Beobachtungen aus den MDA-MB 231-Zellen. Bei der Transfektion einer Kontroll-siRNA (siSCR) ist sowohl eine FHL2- als auch eine p21-Expression feststellbar (Spur 1), wogegen bei einer Reduktion der FHL2-Expression auch keine p21-Expression mehr zu sehen ist (Spur 2). FHL2 scheint somit essentiell für die p21-Expression in MDA-MB 231-Zellen zu sein.

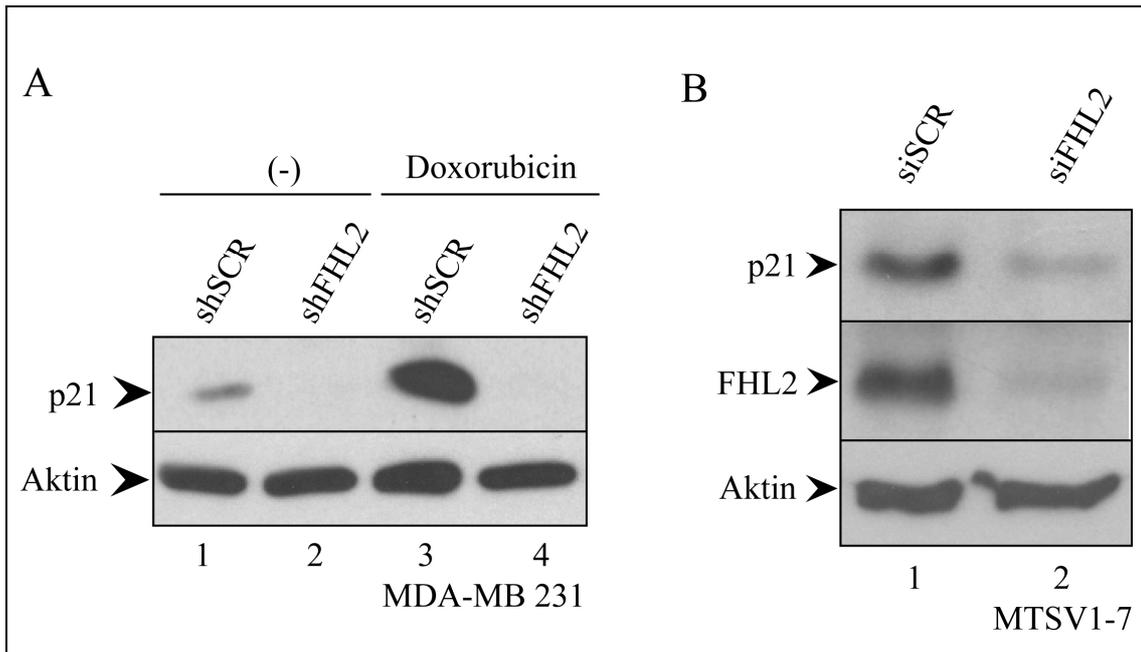


Abbildung 18: Expression von p21 in endogenen FHL2-exprimierenden und FHL2-reduzierten Zellen. (A) MDA-MB 231 shSCR und shFHL2-Zellen wurden für 16 h mit 3,4 μ M Doxorubicin behandelt und die p21-Expression untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. In den unbehandelten FHL2-reduzierten shFHL2-Zellen ist keine p21-Expression feststellbar (Spur 2), in den FHL2-positiven shSCR Zelllinie hingegen schon (Spur 1). Die Doxorubicinbehandlung führt in den shSCR-Zellen zu einer stark erhöhten p21-Expression, wogegen in den shFHL2-Zellen keine p21-Expression feststellbar ist. (B) Bei der siRNA-vermittelten transienten Reduktion des endogenen FHL2 in MTSV1-7 konnten die Daten aus (A) bestätigt werden. Die FHL2-reduzierten Zellen (Spur 2) zeigen eine geringere p21-Expression als die mit Kontroll-siRNA (siSCR) transfizierten Zellen (Spur 1).

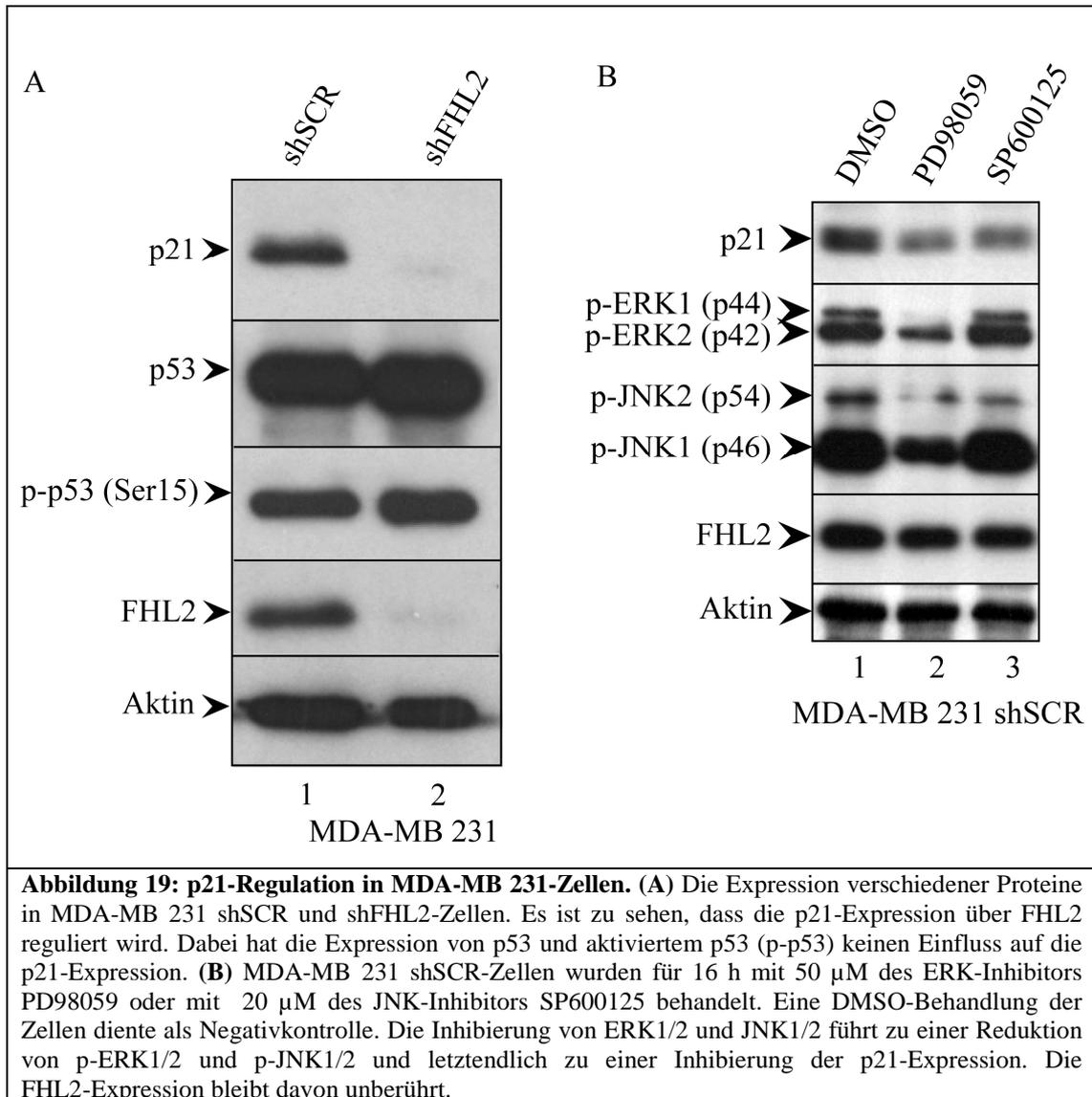
3.8 Die FHL2-abhängige p21-Regulation

Der klassische Regulator von p21 ist der Tumorsuppressor p53, welcher normalerweise als Antwort auf Strahlungs- oder Agenz-induzierte DNA-Schäden in der Zelle aktiviert wird^{93, 94}. Eine durch Mutation herbeigeführte Inaktivierung von p53 kann dazu führen, dass p21 ebenfalls nicht mehr exprimiert wird. Dies führt dazu, dass die Zelle, auch bei defekter DNA, nicht mehr am Kontrollpunkt anhalten kann. Allerdings sind inzwischen viele Signaltransduktionswege sowie viele alternative Transkriptionsfaktoren bekannt, die ebenfalls in der Lage sind, p21 p53-unabhängig zu regulieren⁹⁵.

Bisher konnte gezeigt werden, dass die p21-Expression in MDA-MB 231-Zellen von FHL2 abhängig ist, wahrscheinlich über die Modulation von c-jun im MAPK-Signaltransduktionsweg. Um die FHL2-abhängige p21-Regulation genauer zu untersuchen, wurden Proteinextrakte von FHL2-positiven MDA-MB 231 shSCR und FHL2-negativen shFHL2-Zellen generiert und in Western-Blot Analysen die

p53-Expression beleuchtet (Abbildung 19a). Wie bereits gezeigt werden konnte, wird in den shSCR-Kontrollzellen FHL2 exprimiert, nicht aber in den shFHL2-Zellen. Dies bestätigt sich nochmals im p21-Expressionsprofil, in shSCR-Zellen wird es exprimiert, in shFHL2-Zellen nicht. Beim klassischen p21-Regulator p53 ergibt sich hingegen ein anderes Bild. In den MDA-MB 231 shSCR und shFHL2-Zellen ist sowohl eine hohe p53-Expression als auch am Serin 15 phosphoryliertes und somit aktiviertes p53 (p-p53) zu finden. Allerdings hat dies keinen Einfluss auf die p21-Expression. Wahrscheinlich liegt dies daran, dass MDA-MB 231 kein aktives, sondern nur mutiertes und damit inaktives p53 besitzt⁹⁶. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die p21-Expression in MDA-MB 231 ausschließlich über FHL2 reguliert wird.

p53 scheint keine Rolle in der FHL2-abhängigen p21-Expression zu spielen, daher wurde die Rolle des MAPK-Signaltransduktionswegs genauer untersucht. Dazu wurden FHL2- und p21-positive MDA-MB 231 shSCR-Zellen für 16 h entweder mit 50 µM des ERK1/2-Inhibitors PD98059 oder mit 20 µM des JNK1/2-Inhibitors SP600125 inkubiert. Wie in Abbildung 19b zu sehen, zeigt die Western-Blot Analyse mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen aktiviertes ERK1/2 (p-p44/42) und JNK1/2 (p-JNK1/2) ein durch die Inhibitoren verminderte Phosphoproteinmenge an. Obwohl die Inhibitoren keinen Einfluss auf die FHL2-Expression haben, ist die p21-Expression vermindert (Spur 2 und 3). Durch die Inhibierung der aufwärts von c-jun liegenden Kinasen wird also die p21-Expression FHL2-unabhängig inhibiert. Dies bestätigt die bereits in Western-Blot Analysen und Zellzyklusmessungen gemachten Beobachtungen, dass FHL2 über die Modulation von c-jun die p21-Expression p53-unabhängig steuert.



Bisher konnte gezeigt werden, dass FHL2 die p21-Expression p53-unabhängig über die Modulation von Mitgliedern des MAPK-Signaltransduktionswegs reguliert. Des Weiteren induziert die Doxorubicin-abhängige DNA-Schädigung die p21-Expression in FHL2-positiven MDA-MB 231 shSCR, nicht aber in shFHL2-Zellen (Abbildung 18a).

Es stellte sich nun die Frage, wie die FHL2-abhängige p21-Expression gesteuert wird. Um dies näher zu beleuchten, wurden Reporteranalysen von FHL2 auf einem 2,5 kb (p21Luc 2,5 kb) und einem 5,0 kb (p21Luc 5,0 kb) großen p21-abhängigen Promotor durchgeführt.

Als erstes wurden MDA-MB 231 shSCR und shFHL2-Zellen mit 0,5 μ g p21Luc 5,0 kb Reporterplasmid transfiziert und anschließend für 16 h mit 3,4 μ M

Doxorubicin behandelt. In der anschließenden Messung ist zu sehen, dass die durch Doxorubicin verursachte DNA-Schädigung in den shSCR-Zellen zu einer Induzierung des p21-abhängigen Promotors führt (Abbildung 20a, links).

In den FHL2-reduzierten shFHL2-Zellen kann Doxorubicin den p21-Promotors jedoch nicht aktivieren (Abbildung 20a, rechts). Dies entspricht den bereits in Abbildung 18 beobachteten Western-Blot Daten und zeigt, dass die beobachtete FHL2-abhängige p21-Expression nicht auf eine Stabilisierung des Proteins zurückzuführen ist, sondern die Expressionsregulation bereits auf Transkriptionsebene stattfindet.

Es bestand die Möglichkeit, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein, durch die stabile Integration der shRNA verursachtes, Artefakt handelt. Daher wurden zur Kontrolle ein FHL2-Expressionsplasmid zusammen mit einem p21-Promotorplasmid in MDA-MB 231 shSCR-Zellen transfiziert. Wie in Abbildung 20b zu sehen, führt nicht nur eine stabile Reduktion von FHL2 zu einer verminderten Aktivität des p21-abhängigen Promotors. Dieser kann auch durch eine Überexpression von FHL2 aktiviert werden.

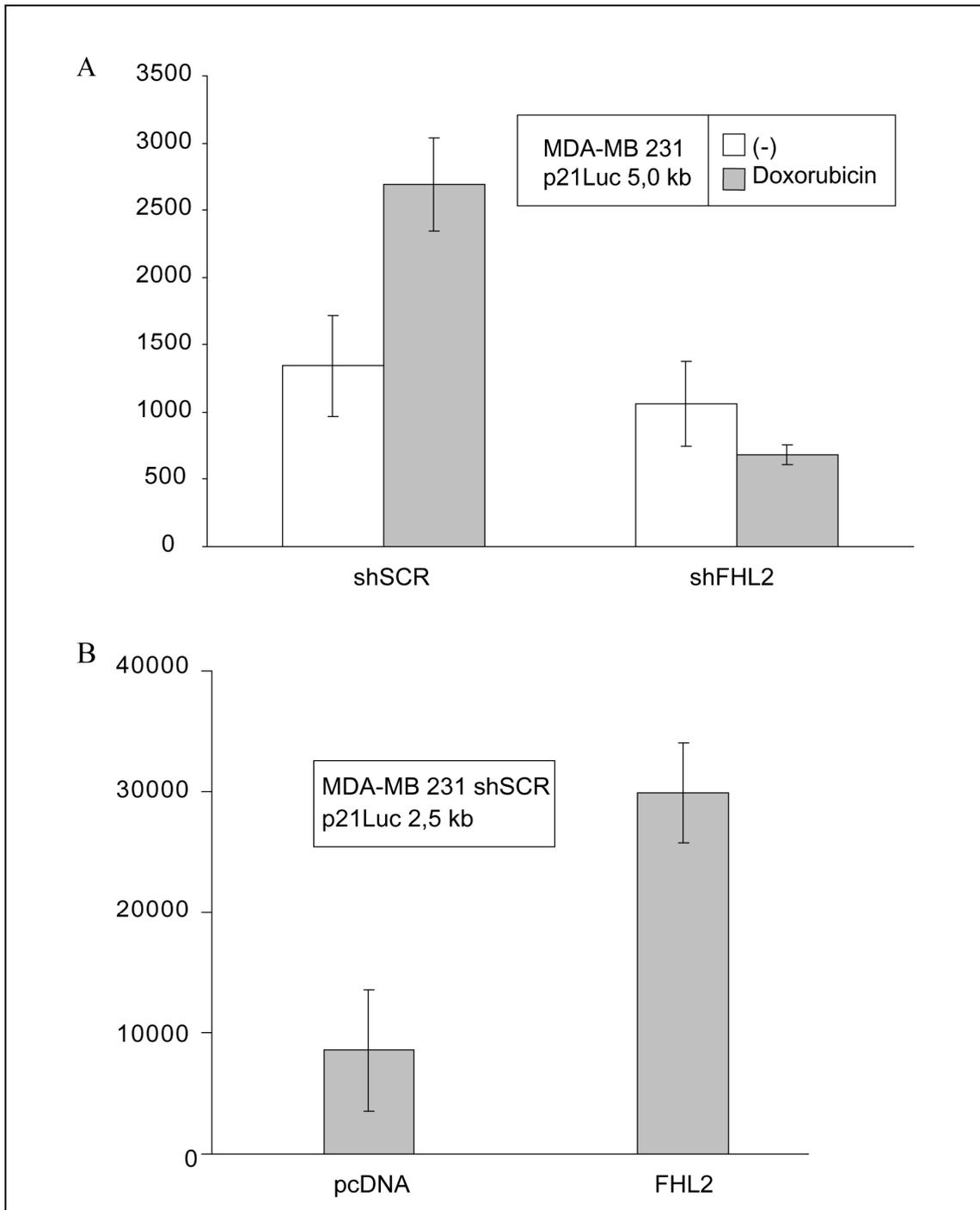


Abbildung 20: Doxorubicin-vermittelte Aktivierung des p21-Promotors in MDA-MB 231-Zellen. (A) MDA-MB 231 shSCR und shFHL2 werden mit einem 5 kb großen p21-Promotorfragment (p21Luc 5,0 kb) transfiziert und nach 24 h für 16 h mit 3,4 μ M Doxorubicin inkubiert. In den shSCR-Zellen wird der p21-abhängige Promotor durch Doxorubicin aktiviert. In shFHL2-Zellen ist hingegen keine Doxorubicin-abhängige Aktivierung des p21-Reporterplasmids zu beobachten. (B) MDA-MB 231 shSCR-Zellen werden mit einem 2,5 kb großen p21-Promotorfragment (p21Luc 2,5 kb) und einem FHL2-Expressionsplasmid transfiziert. Analog zu (A) führt auch eine transiente Überexpression von FHL2 zu einer erhöhten Aktivierung des p21-Reporterplasmids.

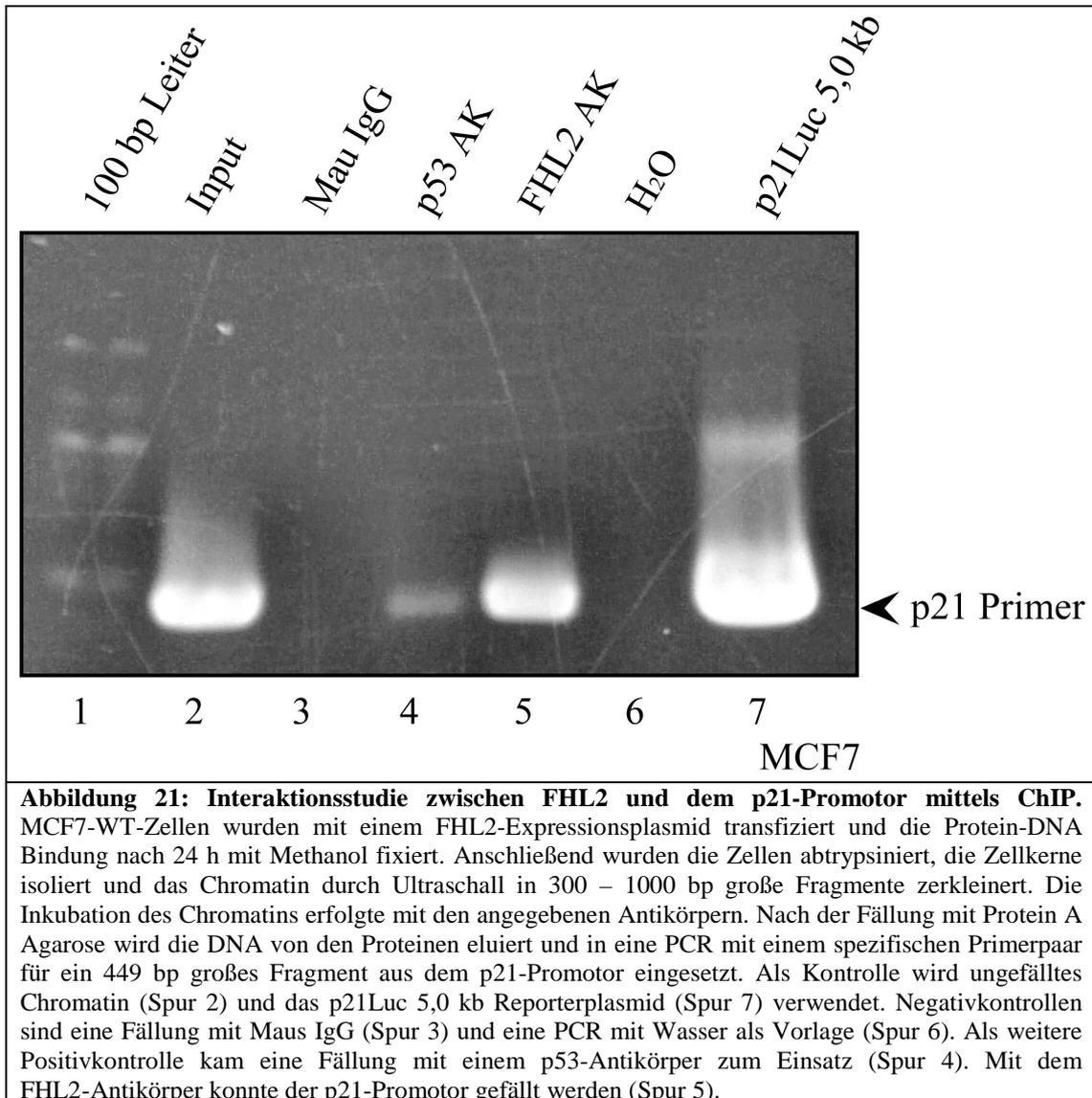
Da FHL2 nicht nur mit Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel c-jun⁵⁹, sondern auch mit anderen Mitgliedern des MAPK-Signaltransduktionswegs, wie zum Beispiel

ERK2⁶⁴, interagiert, stellte sich die Frage, wo genau FHL2 in die Modulation der p21-Expression eingreift. Um dies zu ermitteln, wurde eine Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP) mit FHL2 und dem endogenen p21-Promotor durchgeführt. Dazu wurden MCF7-WT-Zellen ausgesät und mit einem FHL2-Expressionsplasmid transfiziert. Nach der Fixierung der Protein-DNA Bindung wurden die Zellen geerntet, die Zellkerne isoliert und lysiert. Anschließend wurden die in Lösung vorliegenden Chromatin-Proteinkomplexe durch Ultraschall in 300 – 1000 bp große Fragmente zerteilt. Nach der Inkubation der verschiedenen Antikörper mit dem isolierten Protein-DNA Komplex wurden diese gefällt, die DNA eluiert und anschließend aufgereinigt.

Die Interaktion zwischen FHL2, verschiedenen Adapterproteinen und der DNA wurde durch die Fällung von FHL2 mittels eines entsprechenden Antikörpers aus dem Protein-DNA-Mix überprüft. Als Ladekontrolle diente ungefallter Gesamtextrakt, als Negativkontrolle die Fällung mit Maus IgG. Da p53 an den p21-Promotor bindet⁹⁷ und MCF7-Zellen funktionales Wildtyp-p53 besitzen, wurde ein p53-Antikörper als Positivkontrolle eingesetzt.

Die gefällte und aufgereinigte DNA sowie die Ladekontrolle wurde anschließend als Vorlage für eine PCR, mit einem spezifischen Primerpaar für den p21-Promotor, eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass die Kontroll-PCR sowohl mit dem p21-Promotor (p21Luc 5,0 kb, Spur 7), als auch mit dem isolierten Gesamt-Chromatin (Spur 2) erfolgreich war. Auch die Fällung mit dem p53-Antikörper war erfolgreich, p53 bindet direkt an die Promotorregion von p21 (Spur 4). In Spur 5 ist zu sehen, dass FHL2 ebenfalls mit der p21-Promotorregion interagiert. Dies zeigt, dass die Regulation der p21-Expression auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Da bisher aber nicht gezeigt werden konnte, dass FHL2 direkt mit der DNA interagiert, liegt die Vermutung nahe, dass FHL2 mit einem Transkriptionsfaktor, der an den p21-Promotor bindet, interagiert, und somit dessen Aktivität moduliert.



Ein Kandidat für den durch FHL2 modulierten Transkriptionsfaktor bei der p21-Expressionsregulation ist c-jun. Bisher konnte gezeigt werden, dass FHL2 mit c-jun interagiert und dessen Aktivität moduliert. Da c-jun ebenfalls ein Modulator der p21-Expression ist, wurde in weiteren Reporteranalysen der Einfluss von FHL2 und c-jun auf dem p21-abhängigen Promotor untersucht.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit den c-jun, FHL2 und MEKK1 Expressionsplasmiden in verschiedenen Kombinationen ko-transfiziert und deren Auswirkung auf das p21Luc 5,0 kb Reporterplasmid getestet (Abbildung 22).

Im Gegensatz zu MDA-MB 231-Zellen, hat FHL2 in HeLa-Zellen keinen sehr großen Einfluss auf die p21-Promotoraktivität. MEKK1 und c-jun hingegen aktivieren den p21-abhängigen Promotor, wobei die Aktivierung über c-jun stärker als die über

MEKK1 ausfällt. Wahrscheinlich gibt es im Signaltransduktionsweg in HeLa-Zellen zwischen MEKK1 und c-jun Faktoren, die letztendlich die Aktivierung von c-jun abschwächen.

Bei einer Ko-Transfektion von FHL2 und MEKK1 steigt die Promotoraktivität an. Dieser Effekt wird bei einer Ko-Transfektion von FHL2 und c-jun nochmals verstärkt, c-jun kann den p21-abhängigen Promotor also aktivieren. Diese Aktivierung wird durch FHL2 nochmals verstärkt. Dies korreliert mit den Beobachtungen auf dem AP-1-abhängigen Reporter in MDA-MB 231 (Abbildung 8 und Abbildung 9) FHL2 ist ein Aktivator des Transkriptionsfaktors c-jun, diesmal auf dem p21-abhängigen Reporter. Zusammen mit den Beobachtungen aus dem *Pull-Down Assay* (Abbildung 13), der Co-IP (Abbildung 14) und der ChIP (Abbildung 21) lässt sich sagen, dass die Regulation der p53-unabhängigen p21-Expression durch das Zusammenspiel von FHL2 und c-jun auf p21-Promotorebene stattfindet.

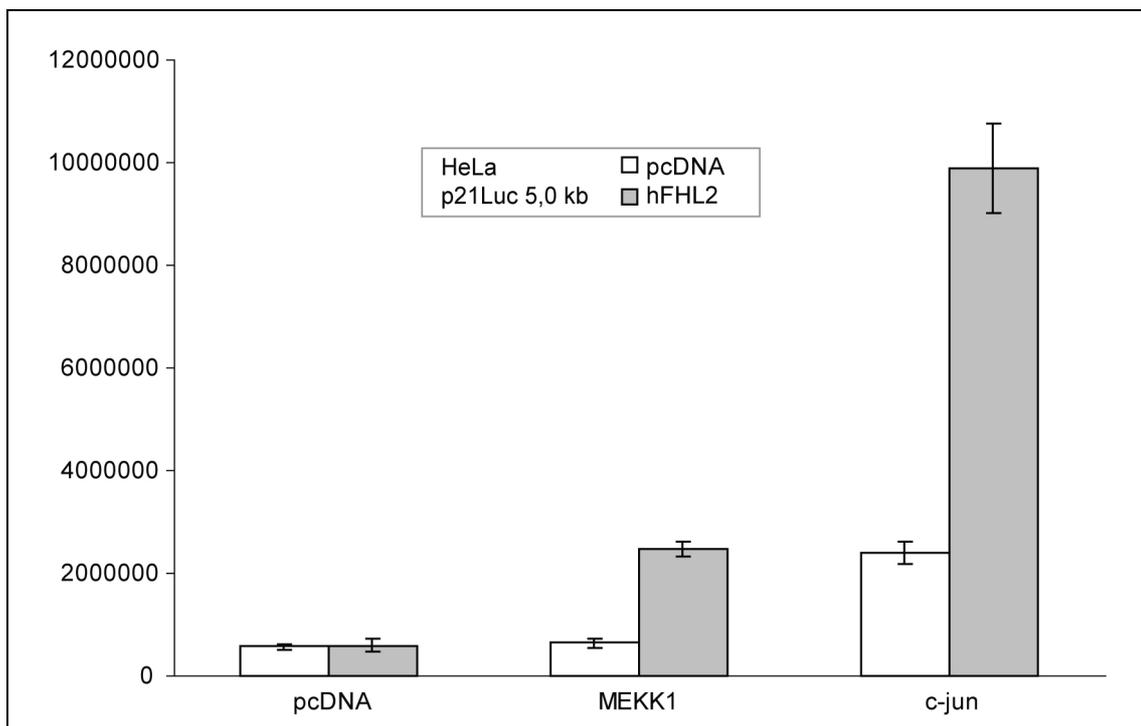


Abbildung 22: Aktivierung des p21-Promotors durch MAP-Kinasen. HeLa-Zellen wurden mit dem p21Luc 5,0 kb Reporterplasmid sowie mit einem FHL2 Expressionsplasmid, einem MEKK1 und c-jun Expressionsplasmid in verschiedenen Kombinationen transfiziert und in Reporteranalysen eingesetzt. Der p21-abhängige Promotor wird durch FHL2, zusammen mit der konstitutiv aktiven MEKK1, aktiviert. Eine ko-transfektion von FHL2 und c-jun, führt zu einer nochmals stärkeren Aktivierung des p21-abhängigen Promotors.

3.9 Effekt der FHL2-abhängigen p21-Regulation auf CDE/CHR-regulierte Proteine

Die Induktion von p21 inhibiert die Expression vieler in der Zellteilung involvierter Gene, unter anderem dass der *Polo-like kinase 1* (Plk1)⁹⁸. Die Expression von Plk1 ist, wie p21, zellzyklusspezifisch. Dabei werden in der G1- nur geringe Mengen, in der G2/M-Phase die höchste Menge exprimiert^{99, 100}. Plk1 reguliert die Formation von Centrosomen, die Aktivierung des *Anaphase-Promoting Complex* (APC), den Eingang in die Mitose und die Cytokinese¹⁰¹. Die Regulation der Plk1-Expression wird durch das inhibierende CDE/CHR-Element in der Promotorregion bestimmt¹⁰². Diese Sequenz findet sich in vielen Promotoren G2/M-spezifischer Gene wieder, z.B. auch in Survivin¹⁰³, CDC2, CDC25C¹⁰⁴, Cyclin A¹⁰⁵ und Cyclin B2¹⁰⁶. Ein möglicher Repressor für das CDE/CHR-Element ist CDF-1, der aber bisher nicht aufgereinigt und genauer charakterisiert werden konnte¹⁰⁷.

Da FHL2 die p21-Expression induziert, stellte sich die Frage, ob dies auch Auswirkungen auf nachgeschaltete Proteine im Zellzyklus hat. Daher wurde ein Reporterplasmid mit einem Plk1-Promotor und der CDE/CHR-Sequenz in Reporteranalysen zusammen mit verschiedenen Expressionsplasmiden in MDA-MB 231 shSCR-Zellen eingesetzt (Abbildung 23a). Als Kontrolle diente ein p53-Expressionsplasmid, da p53 bereits als Repressor der Plk1-Expression beschrieben wurde¹⁰⁸.

In Reporteranalysen zeigt sich, dass p53, ebenso wie p21, den Plk1-Promotor erwartungsgemäß inhibiert. Aber auch FHL2 weist eine starke Repression des Plk-Promotors auf. Die Vermutung liegt nahe, dass p21 die FHL2-abhängige Plk1-Repression vermittelt. Dabei spielt es keine Rolle, ob die p21-Expression über p53 oder FHL2 induziert wird.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob der FHL2-vermittelte inhibitorische Effekt auf die Plk1-Promotoraktivität über p21 induziert wird. Daher wurden FHL2-positive MDA-MB 231 shSCR und FHL2-negative shFHL2-Zellen in Western-Blot Analysen eingesetzt und das Expressionsprofil verschiedener Proteine bestimmt (Abbildung 23b). Wie bereits bekannt, ist die p21-Expression in den shFHL2-Zellen (Spur 2), verglichen mit den shSCR-Zellen (Spur 1), stark reduziert. Die Plk1-Expression hingegen ist, analog zu den Reporteranalysen, in den FHL2-reduzierten Zellen erhöht. Da die p21-abhängige Plk-Inhibition über das CDE/CHR-Element gesteuert

wird und p21 dadurch in der Lage ist, die Expression weiterer CDE/CHR-abhängiger Proteine zu inhibieren, wurde die Expression des CDE/CHR-abhängigen Proteins CDC25C genauer untersucht. Hier ergibt sich das gleiche Bild wie bei Plk1. Die CDC25C-Expression ist in den FHL2-reduzierten Zellen signifikant höher als in den FHL2-exprimierenden Zellen. Als Kontrolle wurde das Expressionsprofil von CDC25A untersucht, einem nahen Verwandten von CDC25C, der allerdings nicht über ein CDE/CHR-Element reguliert wird. Hier kann keine FHL2-abhängige Expressionsregulierung beobachtet werden.

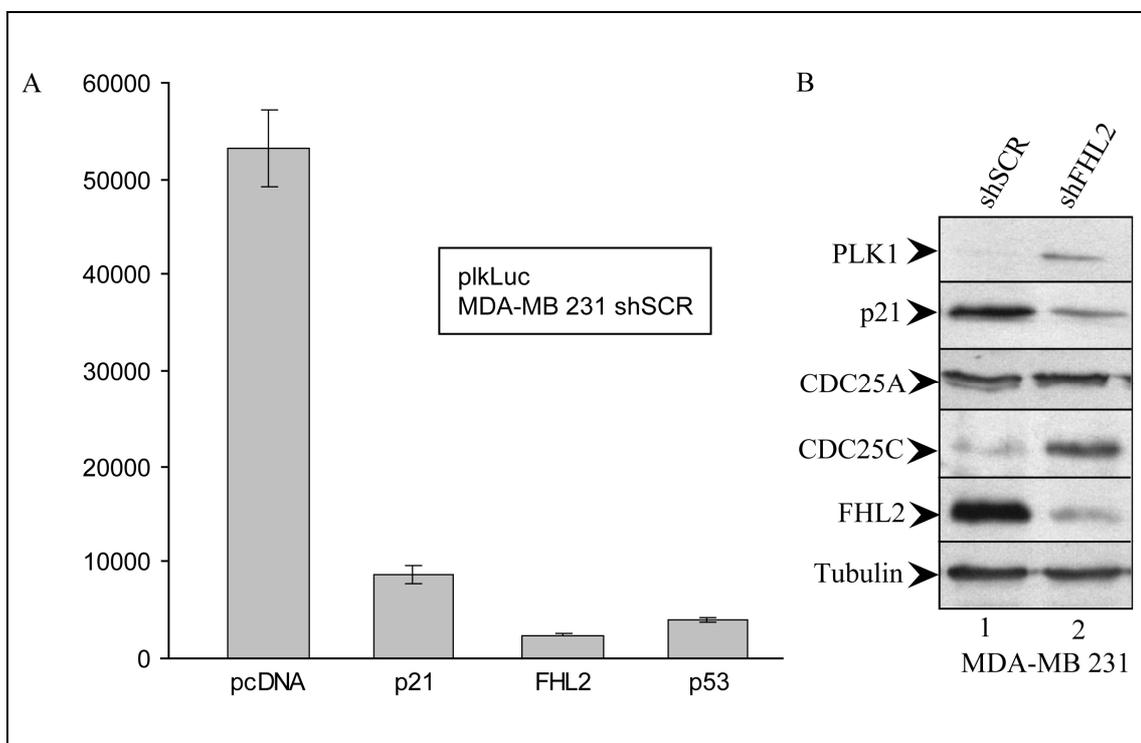


Abbildung 23: Plk1-Regulation durch p21, FHL2 und p53. (A) Ein Reporterplasmid mit einem Plk1-Promotor (plkLuc) wird mit den p21-, FHL2- und p53-Expressionsplasmiden in MDA-MB 231 shSCR-Zellen ko-transfiziert. In der Kontrolltransfektion mit einem Leerplasmid (pcDNA) ist eine Aktivierung des Reporterplasmids zu beobachten. Bei der Transfektion des Plk1-Inhibitors p53 lässt diese Aktivierung stark nach. Dies ist auch bei der Ko-Transfektion von p21- und FHL2 der Fall. (B) Expression verschiedener CDE/CHR-abhängiger Proteine in FHL2-positiven MDA-MB 231 shSCR und FHL2-negativen shFHL2-Zellen. Eine verminderte p21-Expression ist in den shFHL2-Zellen zu sehen (Spur 2), wogegen die CDE/CHR-abhängige Proteine Plk1 und CDC25C stärker exprimiert werden. Die Expression des CDE/CHR-unabhängige CDC25A ist unabhängig vom FHL2-Status der Zelle.

FHL2 steuert somit nicht nur die p53-unabhängige p21-Expression. Diese Regulierung wirkt sich auch inhibitorisch auf nachfolgende CDE/CHR-abhängige Zellzyklusregulatoren aus. Dies führt dazu, dass durch eine Reduktion der FHL2-Expression und der daraus resultierenden, verringerten p21-Expression, viele

weitere zellzyklusspezifische Regulatoren moduliert werden und der G2/M-Kontrollpunkt ausgehebelt wird. Dadurch schreitet die Zelle schneller in die Mitose (Abbildung 15b) und die Zellproliferationsrate wird beschleunigt (Abbildung 16).

3.10 Effekt der FHL2-Expression auf zellmatrixunabhängiges Wachstum

Die Induktion der p21-Expression in Krebszellen weist sowohl auf Tumorsuppression als auch auf das Überleben von Tumoren hin¹⁰⁹. Viele normale Zellen gehen bei Verlust des Zellkontaktes in Apoptose, daher ist ein typisches Charakteristikum eines Tumors die Fähigkeit, zellmatrixunabhängig zu wachsen. Dabei korreliert die Zellmatrixunabhängigkeit mit der Invasivität und der Tumorentwicklung der Zelle¹¹⁰. Zudem ist bekannt, dass MAPK-vermittelte p21-Modulation beim zellmatrixunabhängigen Wachstum von Krebszellen eine Rolle spielt¹¹¹. Da FHL2 über den MAPK-Signaltransduktionsweg zu einer Induzierung der p21-Expression beiträgt, stellte sich die Frage, wie sich dies auf die Fähigkeit der Zellen zum zellmatrixunabhängigen Wachstum auswirkt.

Um dies zu untersuchen, wurden die Zelllinien MCF7-WT, MCF7-FHL2, MDA-MB 231 shSCR und shFHL2 in einem *Colony-Forming Assay* eingesetzt. Dabei werden Zellen in Agarose ausgesät, wodurch sie den Kontakt zur Zellmatrix verlieren.

Hierfür wurden die verschiedenen Zelllinien in Agarose für 14 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Anzahl der Kolonien mit mehr als zehn Zellen bestimmt und jeweils die FHL2-reduzierte (MCF7-WT und MDA-MB 231 shFHL2) sowie FHL2-positive (MCF7-FHL2 und MDA-MB 231 shSCR) Zelllinie miteinander verglichen.

Wie in Abbildung 24a (linkes Panel) zu sehen, können FHL2-positive shSCR-Kontrollzellen zellmatrixunabhängig Kolonien in Softagar bilden. Wenn allerdings die FHL2-Menge reduziert wird, verlieren die Zellen diese Fähigkeit (Abbildung 24a, rechtes Panel). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei den MCF7-Zellen. Zwar sind diese grundsätzlich in der Lage, Kolonien in Softagar zu bilden¹¹². Allerdings werden durch die Überexpression von FHL2 mehr und größere Kolonien gebildet (MCF7-FHL2, Abbildung 24b, linkes Panel). Dies spiegelt sich auch in der Auswertung der Kolonienanzahl mit mehr als zehn Zellen nach 14 Tagen wider

(Abbildung 24c). In den FHL2-reduzierten shFHL2-Zellen fand sich nur eine größere Kolonie, in den FHL2-exprimierenden shSCR-Zellen hingegen 37. In den MCF7-WT fanden sich schon 16, in den MCF7-FHL2-Zellen allerdings 87 Kolonien.

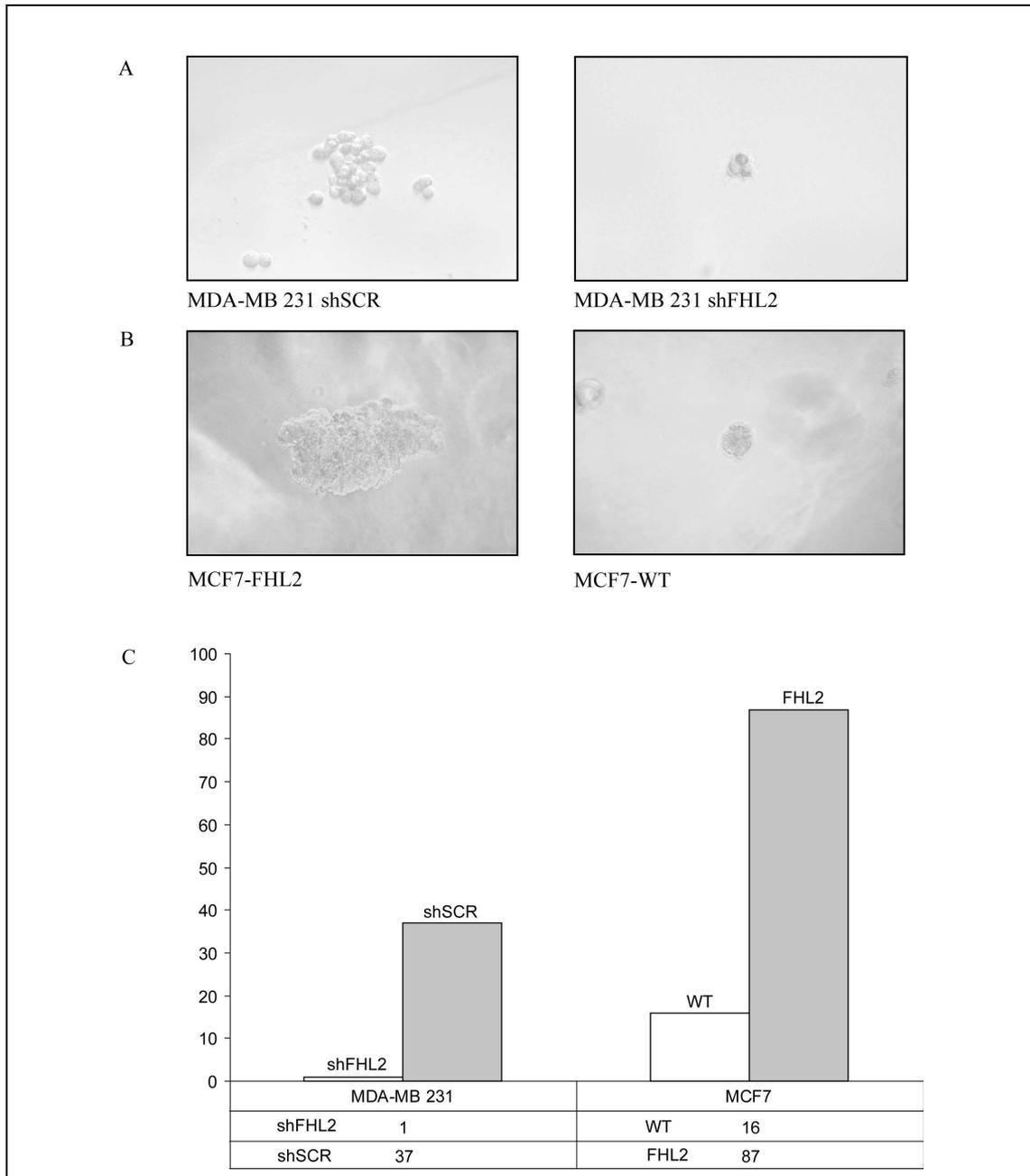


Abbildung 24: Zellmatrixunabhängiges Wachstum in FHL2-exprimierender und FHL2-reduzierter Zellen. MCF7-WT und MCF7-FHL2-Zellen bzw. MDA-MB 231 shSCR und shFHL2-Zellen wurden in 0,3% *low-melting* Agarose über einer Schicht 1,6%iger Agarose ausgesät und für 14 Tage bei 37 °C inkubiert. **(A)** Die FHL2-exprimierenden MDA-MB 231 shSCR-Zellen können zellmatrixunabhängig wachsen (linkes Panel), wogegen die FHL2-reduzierten shFHL2-Zellen diese Fähigkeit verloren haben (rechtes Panel). **(B)** Die stabil FHL2-exprimierenden MCF7-FHL2-Zellen können große, zellmatrixunabhängige Kolonien bilden, wogegen die MCF7-WT-Zellen dazu nicht in der Lage sind. **(C)** Zusammenfassung der Kolonienanzahl mit mehr als 10 Zellen nach 14 Tagen.

Die FHL2-Expression trägt also durch die Förderung des zellmatrixunabhängigen Wachstums einen Teil zur onkogenischen Transformation von Brustkrebszellen bei, wahrscheinlich über die Regulation der c-jun-abhängigen p21-Expression im MAPK-Signaltransduktionsweg.

4. Diskussion

Der FHL2-Expressionsstatus in vielen Tumoren unterscheidet sich von dem im Normalgewebe⁴⁴. So ist es im Ovarialkarzinom zum Beispiel überexprimiert⁵⁴, wogegen im Rhabdomyosarkom keine FHL2-Expression feststellbar ist⁴⁷. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass FHL2 in viele krebsrelevanten Signaltransduktionswegen, wie zum Beispiel dem Integrin-^{67, 113}, WNT-^{43, 52} oder MAPK-Signaltransduktionsweg^{59, 64} involviert ist. Zudem interagiert es direkt mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und moduliert dadurch deren Aktivität (Tabelle 3)^{44, 45}.

Ein prominenter Interaktionspartner ist c-jun, ein Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors. In Affenierenzellen konnte gezeigt werden, dass FHL2 nicht nur mit c-jun interagiert, sondern auch dessen Aktivität in Reporteranalysen induziert^{59, 64}. AP-1 wird im Mammakarzinom unter anderem über den MAPK-Signaltransduktionsweg¹¹⁴ oder den Brustkrebsmarker Her2/neu moduliert. Eine Hemmung von Her2/neu führt dabei zu einer reduzierten AP-1-Aktivität¹¹⁵. Dies hat die Inhibition vieler relevanter Zellzyklusproteine zur Folge, wie zum Beispiel die Aktivität der CDKs¹¹⁶ und der Expression von Cyclin D1, p53 und p21⁷².

Obwohl FHL2 einen Einfluss auf viele in der Brustkrebsentwicklung wichtige Faktoren ausüben kann, war bisher wenig über dessen Rolle im Mammakarzinom bekannt.

4.1 FHL2 wird im Brustkrebs exprimiert

Zu Beginn dieser Arbeit war nichts über den FHL2-Status im Mammakarzinom bekannt. Erste Hinweise, dass FHL2 tatsächlich einen Einfluss auf die Entwicklung des Mammakarzinoms ausübt, lieferten Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid System. Dort konnte es über die C-terminale Domäne mit dem Brustkrebsmarker BRCA1 interagiert⁵⁷.

Um erstmals den FHL2-Status im Brustgewebe zu bestimmen, wurden 57 Tumore, vier DCIS und acht Normalgewebe in Western-Blot Analysen (Abbildung 3a, b) und immunhistologischen Färbungen (Abbildung 4) untersucht. Im Mammakarzinom ist dabei eine sehr starke Expression von FHL2 zu beobachten, wogegen es im normalen Brustgewebe nicht detektiert werden konnte. Diese Daten korrelieren mit vielen

bereits bekannten FHL2-Expressionsmustern in anderen Tumorarten, wie dem Ovarial-⁵⁴, Kolon-^{51,52} oder Bronchialkarzinom⁵³ (Tabelle 2).

Interessanterweise unterscheidet sich das FHL2-Expressionsmuster in allen bisher untersuchten gesunden und entarteten Geweben. Zwar ist in den meisten entarteten Geweben FHL2 zu finden und in den gesunden Geweben nicht, allerdings gibt es einige Ausnahmen, wie zum Beispiel im Prostatakarzinom^{55, 117} oder im Rhabdomyosarkom^{43, 47}. Warum sich der FHL2-Status zwischen gesundem und entartetem Gewebe Organabhängig unterscheidet ist unklar. Eventuell spielt die Sensitivität der entsprechenden Gewebe auf Androgen eine Rolle. Androgen induziert die Expression von FHL2 in der Prostata¹¹⁷ und ist dort gleichzeitig ein Ko-Aktivator des Androgenrezeptors⁴². Zudem spielen Androgene auch bei der Muskelentwicklung eine entscheidende Rolle¹¹⁸, zumal das Rhabdomyosarkom hauptsächlich bei Kindern, die weniger Androgen bilden, auftritt¹¹⁹. Ob aber tatsächlich Androgen oder ein anderer Faktor den FHL2-Status in gesundem und entartetem Gewebe beeinflusst, ist im Moment nicht bekannt und muss noch im Detail untersucht werden.

Zwischenzeitlich konnte Gabriel *et. al* in immunhistologischen Untersuchungen ebenfalls zeigen, dass FHL2 im Mammakarzinom exprimiert wird. Dabei geht die Menge an FHL2 mit einer schlechten Überlebensprognose einher. Eine Behandlung mit dem Anti-(β)17-Östrogen Tamoxifen konnte jedoch teilweise, die durch eine hohe FHL2-Expression vermittelte, negative Prognose revidieren⁵⁰. Dabei ist bemerkenswert, dass FHL2 ebenfalls mit dem Östrogenrezeptor interagieren kann⁶⁵. Welche Auswirkungen diese Interaktion hat, ist bisher aber noch nicht weiter untersucht worden.

Der FHL2-Status in den DCIS untermauert nochmals zusätzlich die Rolle von FHL2 im Mammakarzinom. In diesen gutartigen, prämaligen Tumoren konnte zwar eine FHL2-Expression festgestellt werden, diese war aber bedeutend geringer als in den invasiven Tumoren.

Die Entartung der Zelle vom normalen Gewebe bis hin zum Mammakarzinom wird also von einer Induzierung der FHL2-Expression begleitet. Dabei korreliert diese mit der Aggressivität und der Mortalität des Mammakarzinoms.

4.2 Das FHL2-Expressionsprofil verschiedener Brustkrebszelllinien

Für die Untersuchung von FHL2 in verschiedenen Signaltransduktionswegen im Mammakarzinom ist primäres Gewebe nicht geeignet. Daher wurde zunächst der FHL2-Status in verschiedenen Brustkrebszelllinien ermittelt. Obwohl in fast allen untersuchten Mammakarzinomen eine hohe FHL2-Expression festgestellt werden konnte, war das FHL2-Expressionsprofil in den Zellkulturlinien sehr divers. In einigen wurde FHL2 exprimiert, in anderen wiederum nicht (Abbildung 3c).

Wieso das FHL2-Expressionsprofil in den Zellkulturlinien so stark von dem im primären Gewebe abweicht, ist schwer zu erklären. Da im entarteten Primärgewebe in der Regel FHL2 exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass auch im Originalgewebe FHL2 exprimiert wurde. Aufgrund der Transformation und Immortalisierung der Zellen auf dem Weg vom Primärgewebe zu Zellkulturgewebe kann es zu vielen Veränderungen kommen. Dabei kann auch eine Änderungen im Proteinprofil auftreten¹²⁰.

Aufgrund dieser Daten besteht die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen auf dem Weg vom Primärgewebe zur Zellkulturzelllinie ihre Fähigkeit zur FHL2-Expression verloren haben. Das sich das Protein-Expressionsprofil von Zellkulturzellen im Laufe der Zeit ändert, konnte bereits gezeigt werden. Dadurch können sich namentlich gleichen Zelllinien in verschiedenen Laboren unterscheiden¹²¹.

Warum sich der FHL2-Status in den verschiedenen Zelllinien so signifikant von dem im untersuchten primären Gewebe unterscheidet, kann daher in jeder Zelllinie individuell unterschiedliche Ursachen haben. Eine Hypothese ist, dass durch das vielfache passagieren der Zellkulturzellen schnell proliferierende Zellen ausselektiert werden. Da die Expression von FHL2 zu einem verlangsamten Zellwachstum führt, ist vorstellbar, dass die schnelleren FHL2-reduzierte oder FHL2-negative Zellen die langsamen FHL2-positiven Zellen im Laufe der Zeit verdrängen.

Die Verfügbarkeit sowohl FHL2-negativer als auch FHL2-positiver Mammakarzinomzelllinien hat es ermöglicht, die Rolle von FHL2 in der Onkogenese näher zu beleuchten. Für weitere Versuche wurden zwei verschiedene Zelllinien ausgewählt. Zum einen die FHL2-negative Brustkrebszelllinie MCF7 (Abbildung 3c, Spur 1), zum anderen die hochinvasiven, FHL2-exprimierenden MDA-MB 231 (Abbildung 3c, Spur 10).

Zur Untersuchung FHL2-abhängige Unterschiede in beiden Zelllinien, wurde aus den MCF7-Zellen durch die Integration eines FHL2-Expressionsplasmids eine konstitutiv FHL2-exprimierende Zelllinie mit der Bezeichnung MCF7-FHL2 generiert. Aus den FHL2-positiven MDA-MB 231-Zellen wurde durch die Integration eines gegen FHL2 gerichteten shRNA-Plasmids eine FHL2-reduzierte Zelllinie mit der Bezeichnung MDA-MB 231 shFHL2 erzeugt. Als Kontrolle dienten jeweils der MCF7-Wildtyp (MCF-WT) sowie eine stabile Integration einer nicht funktionellen shRNA in MDA-MB 231 (MDA-MB 231 shSCR) (Tabelle 4).

Mit Hilfe dieser vier Zelllinien konnte die Funktion von FHL2 im Mammakarzinom genauer beleuchtet werden.

4.3 Die Lokalisation von FHL2 in der Krebszelle

FHL2 kann sowohl in der Zellmembran, im Cytosol und im Nukleus lokalisiert sein⁴⁴. In der Zellmembran interagiert es mit Integrinen und moduliert dadurch Integrin-abhängige Signaltransduktionswege^{67, 81, 113}. Durch diese Interaktion spielt FHL2 zudem bei der Kontraktion und Beweglichkeit von Myofibroblasten eine wichtige Rolle. In *Knock-out* Mäuse (FHL2^{-/-}) führt der Verlust von FHL2 zu einer Verzögerung der Wundheilung. Dieser Effekt kann aber durch die Expression exogenem FHL2 aufgehoben werden¹²².

Im Cytosol ist FHL2 in verschiedene Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel dem WNT-^{43, 52} und MAPK-Signaltransduktionsweg⁶⁴, involviert. Von dort kann FHL2, z.B. durch die Aktivierung der RhoA GTPase und über Sphingosine-1-Phosphat (S1P), in den Nukleus transportiert werden und RhoA-abhängige Signale weiterleiten^{42, 123}. Im Nukleus kann FHL2 die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren modulieren und dadurch die Expression verschiedener krebsrelevanter Proteine steuern^{44, 45, 59}.

Aufgrund der Lokalisation kann FHL2 in jedem Zellkompartiment mit anderen Partnern interagieren und dabei, selbst im gleichen Signaltransduktionsweg, sowohl inhibitorisch, als auch aktivierend wirken. Im MAPK-Signaltransduktionsweg kann FHL2 zum Beispiel im Cytosol mit ERK2 interagieren. Dadurch kann dieses nicht mehr in den Kern einwandern und wird in seiner Funktion als aktivierende Kinase von c-jun inhibiert⁶⁴. Im Kern hingegen interagiert FHL2 mit dem MAPK-Protein c-jun und induziert dessen Aktivität⁵⁹.

Im WNT-Signaltransduktionsweg agiert FHL2 sogar als gewebeabhängiger Ko-Aktivator und Ko-Repressor des gleichen Zielproteins, dem β -Catenin. In Muskelzellen reprimiert FHL2 die β -Catenin-abhängige Transkription, wogegen es in Leberzellen aktivierend wirkt^{43, 52}.

Es stellte sich daher die Frage, wo FHL2 im Mammakarzinom lokalisiert ist und auf welche Weise es die Onkogenese eingreifen kann.

Schon in den immunhistologischen Färbungen von primärem Gewebe gab es erste Hinweise auf die Lokalisation von FHL2. Dort ist es sowohl im Cytosol, als auch im Nukleus zu erkennen (Abbildung 4d). In Immunfluoreszfärbungen der endogen FHL2-exprimierenden MDA-MB 231 konnte dies nochmals bestätigt werden. Dort ist FHL2, neben dem Nukleus und dem Cytosol, auch in der Membran lokalisiert (Abbildung 5b). Aber auch in den konstitutiv FHL2 exprimierenden MCF7-FHL2-Zellen konnte sowohl in Western-Blot Analysen (Abbildung 6a) als auch in Immunfluoreszenzanalysen (Abbildung 6b) FHL2 in allen Kompartimenten nachgewiesen werden. FHL2 kann somit potentiell in der Membran, im Cytosol und im Nukleus über die Modulation verschiedener Signaltransduktionswegen zur Onkogenese beitragen.

4.4 FHL2 moduliert die c-jun-abhängige Transkription

Einer der Hauptursachen der Onkogenese stellt die Störung der Kontrollpunktregulation im Zellzyklus und die damit verbundene unkontrollierte Zellteilung dar. Für die normale Proliferationskontrolle spielen Steroidhormone, Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren und letztendlich die CDKs, Cycline und Zellzyklusinhibitoren wie p21 und Tumorsuppressoren wie p53 eine Rolle¹²⁴. Viele dieser Mitspieler können mit FHL2 interagieren, zum Beispiel der Steroidhormon-Rezeptor *Estrogen Receptor alpha* (ER- α)⁶⁵ oder p53⁵⁸. Einige dieser Mitspieler werden zudem vom AP-1 Transkriptionsfaktor reguliert. Dazu gehören unter anderem Cyclin D1, p53 und p21, die zudem eine Rolle bei der Aggressivität und Invasivität von Karzinomen spielen⁷². Im Brustkrebs konnte der gleiche Zusammenhang mit der FHL2-Expression gezeigt werden⁵⁰. Daher rückte der Interaktionspartner c-jun, der einen Teil des AP-1 Transkriptionsfaktors bildet, in den Mittelpunkt⁵⁹.

Neben zellzyklusspezifischen Proteinen⁷² reguliert AP-1 viele Zielgene, die für die Invasivität des Mammakarzinoms verantwortlich sind^{125, 126}. Wie FHL2 die AP-1-abhängige Expression reguliert, konnte durch verschiedene Reporteranalysen auf einem AP-1-abhängigen Promotor ermittelt werden. Allerdings ergab sich dabei zunächst ein sehr unklares Bild darüber, welche Rolle FHL2 bei der Interaktion mit c-jun einnimmt.

In den ersten Versuchen agierte FHL2 in MCF7-Zellen als konzentrationsabhängiger Ko-Repressor von c-jun auf einem idealisierten, AP-1-abhängigen Promotor (Abbildung 7a). Dabei spielte es keine Rolle, ob c-jun, oder der konstitutiv aktive c-jun-Aktivator MEKK1 mit FHL2 ko-transfiziert wurde. FHL2 konnte sowohl das transient transfizierte, als auch das endogene, durch MEKK1 aktivierte c-jun reprimieren (Abbildung 7b). Dieser FHL2-vermittelte repressive Effekt konnte zudem auf dem endogenen AP-1-IL2-Promotor beobachtet werden. Es war sogar möglich, die Domäne von FHL2 die für diesen Effekt verantwortlich ist, zu identifizieren. Die Repression wurde nur über die am N-terminus befindlichen LIM-Domänen 1 und 2, nicht aber über die Domänen 3 und 4 vermittelt (Abbildung 7c).

Das verschiedene LIM-Domänen für die Interaktion mit anderen Proteinen relevant sind konnte bereits gezeigt werden. Bei der Interaktion von FHL2 mit BRCA1 (LIM-Domänen 2-4)⁵⁷ und dem DNA-bindenden nukleären NP220 (LIM-Domänen 3-4)¹²⁷ ist zum Beispiel ausschließlich der C-Terminus ausschlaggebend, wogegen bei der Interaktion mit FOXO1 (LIM-Domänen 1/2-2)⁶⁶ und CDC47 (LIM-Domänen 1/2-3)⁶², ebenso wie bei c-jun, der N-Terminus ausschlaggebend ist. Bei β -Catenin ist sogar das komplette Protein für eine Interaktion nötig⁴³. Durch die Interaktion über verschiedene LIM-Domänen kann FHL2 somit spezifisch als Adapterproteine mit verschiedenen Partnern agieren.

Im Gegensatz zu den MCF7-Zellen konnte in den MDA-MB 231-Zellen jedoch keine Repression der c-jun-abhängigen Reporteraktivität beobachtet werden. Hier agiert FHL2 als Ko-Aktivator von c-jun. Dabei wurde für die Reporteranalyse die FHL2-reduzierte shFHL2 und die endogen FHL2-exprimierende shSCR Zelllinien verwendet und jeweils mit c-jun und dem AP-1-abhängigen Reporterplasmid transfiziert (Abbildung 8a). In den shSCR-Zellen wird der AP-1-abhängigen Reporter durch c-jun robust induziert, diese Aktivierung geht in den shFHL2-Zellen jedoch komplett verloren. Auch bei einer Ko-Transfektion des Reporterplasmids mit dem

c-jun-Aktivator MEKK1 ergibt sich ein ähnliches Bild. In den FHL2-reduzierten Zellen fällt die Aktivierung des AP-1-abhängigen Reporters, verglichen mit den FHL2-exprimierenden Zellen, deutlich schwächer aus (Abbildung 8 b).

Selbst in einer weiteren Zelllinie, den MTSV1-7, zeigt sich das gleiche Bild. Eine siRNA-vermittelte transiente Reduktion der FHL2-Menge führt zu einer verminderten Aktivität des AP-1-abhängigen Reporters (Abbildung 9a), wogegen eine Ko-Transfektion von FHL2 und c-jun zu einer robusten Induktion führt (Abbildung 9b).

Das Verhalten von FHL2 auf die c-jun-abhängige Regulation schien sich also zu widersprechen. Es agierte sowohl als Ko-Aktivator als auch als Ko-Repressor von c-jun auf dem AP-1 Promotor, abhängig davon, ob es in den MCF7- oder den MDA-MB 231- bzw. den MTSV1-7-Zellen exprimiert wurde. Allerdings ist bekannt, dass FHL2 mit dem gleichen Interaktionspartner sowohl als Ko-Aktivator als auch als Ko-Repressor agieren kann. In Muskelzellen reprimiert FHL2 β -Catenin im WNT-Signaltransduktionsweg⁴³, wogegen es in Leberzellen als Aktivator fungiert⁵². Allerdings konnte diese duale Funktion von FHL2 in zwei völlig verschiedenen Geweben gezeigt werden. Da aber die Reporteranalysen alle in Brustzelllinien durchgeführt wurden, stellte sich zu diesem Zeitpunkt die Frage, wieso FHL2 hier sowohl als Ko-Aktivator als auch als Ko-Repressor auftritt. Erst die Untersuchung der FHL2- und c-jun-abhängigen Expression konnten eine Antwort auf diese Frage geben.

4.5 FHL2 induziert die Expression von Cyclin D1, IL-6 und IL-8

Die Expression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 ist unter anderem von c-jun⁷², aber auch von anderen Mitgliedern des MAPK-Signaltransduktionswegs, wie zum Beispiel ERK1/2^{128, 129}, abhängig. Zudem wird Cyclin D1 in 50% aller Mammakarzinome überexprimiert. Es dient daher auch als ein prominenter prognostischer Marker⁸³.

In der G1-Phase regelt der Cyclin E/CDK2-Komplex¹³⁰ sowie Cyclin D1 zusammen mit den CDKs 4 und 6¹³¹ die zellzyklusinhibitorische Funktion des RB-Proteins. Dieses blockiert im unphosphorylierten Zustand die Transkription S-Phase-relevanter Gene. Cyclin D1/CDK4/6 und Cyclin E/CDK2 phosphorylieren das RB-Protein an

den Serinen 780, 795 und 807/811 und heben dadurch den G1/S Zellzyklusblock auf¹³².

In den Reporteranalysen konnte festgestellt werden, dass FHL2 die AP-1-abhängige Promotoraktivität moduliert. Ob sich dies auf die Expression verschiedener AP-1-abhängiger Proteine, insbesondere auf den Zellzyklusregulator Cyclin D1, hat, war daher von besonderem Interesse.

Daher wurden MCF7, analog zu den Reporteranalysen, mit einer steigenden Konzentration an c-jun-Expressionsplasmid transfiziert und die Auswirkungen auf die Cyclin D1-Expression untersucht. Dabei zeigen Western-Blot Analysen, dass die Cyclin D1-Expression mit der Menge an transfizierten FHL2 korreliert (Abbildung 10a). Die Expression des nahen Verwandten Cyclin D2 und Cyclin E ist davon aber nicht betroffen (Abbildung 10b).

Die Daten aus den Reporteranalysen in MCF7 ließen jedoch vermuten, dass die Cyclin D1-Expression aufgrund der Inhibition der c-jun-abhängigen AP-1-Aktivität mit steigender FHL2-Konzentration abnimmt. Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus des RB-Proteins zeigt jedoch, dass FHL2 tatsächlich die Cyclin D1-Expression induziert. Mit steigender FHL2-Konzentration nimmt die Menge an phosphoryliertem RB-Protein zu (Abbildung 10c).

Aufgrund der gegenläufigen Daten der Reporteranalyse und der Western-Blot Analyse war nicht auszuschließen, dass die beobachtete Cyclin D1-Expression zwar von FHL2 abhängt, diese aber nicht über c-jun gesteuert wird. Daher wurde in einer semi-quantitativen PCR die Expression der mRNA von IL-6 und IL-8 untersucht. Beide Proteine werden nicht nur über einen AP-1-abhängigen Promotor gesteuert. Sie spielen auch bei der Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle^{87, 88}. Dazu wurde die mRNA aus den MCF7-WT und den MCF7-FHL2 isoliert und als Vorlage für die PCR eingesetzt. Aber auch hier zeigt sich, dass FHL2 die Expression der IL-6 und IL-8 mRNA induziert (Abbildung 11).

Vieles deutet also darauf hin, dass die beobachtete FHL2-abhängige Repression des AP-1-abhängigen Reporters in den MCF7 artifiziell ist. Die Cyclin D1-Expressionsdaten sowie die Daten aus der semiquantitativen PCR mit IL-6 und IL-8 weisen FHL2 als einen Ko-Aktivator von AP-1 in MCF7 auf. Dies wird zudem durch die Reporteranalysen in MDA-MB 231 und MTSV1-7 unterstützt.

Wie der FHL2-vermittelte repressive Effekt in AP-1-abhängigen Reporteranalysen in MCF7 zustande kommt, ist weiterhin unklar. Eventuell wird dieser durch ein anderes FHL2-Zielprotein, der Kinase ERK2, vermittelt. FHL2 interagiert mit ERK2 im Cytosol, verhindert dadurch dessen Einwanderung in den Kern und letztendlich die Phosphorylierung von c-jun⁶⁴. Durch einen bisher nicht bekannten Mechanismus könnte die FHL2-ERK2 vermittelte Repression auf dem Reporterplasmid in Konkurrenz FHL2-c-jun vermittelte Aktivierung auf den Reporterplasmiden stehen. Allerdings scheint dies keine Auswirkung auf die Regulation endogener AP-1-abhängiger Promotoren zu haben. Warum dieser Effekt aber nur in MCF7, nicht aber in den anderen Zelllinien auftritt, bleibt weiterhin unklar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Cyclin D1-Expression mitsamt der nachgeschalteten RB-Protein-Phosphorylierung, als auch die IL-6 und IL-8 mRNA Menge, sowie die Reporteranalysen in MDA-MB 231- und MTSV1-7-Zellen, FHL2 als einen Aktivator von c-jun im Mammakarzinom ausweisen.

4.6 FHL2 interagiert mit c-jun im Nukleus

Wie in Immunfluoreszenzfärbung zu sehen, ko-lokalisieren c-jun und FHL2 im Nukleus (Abbildung 12). Aus den Reporteranalysen ist zudem ersichtlich, dass FHL2 die c-jun-abhängige Aktivität des AP-1-Promotors induziert und die Expression verschiedener Zielgene reguliert. Zwar konnten andere Studien eine Interaktion zwischens c-jun und FHL2 zeigen⁵⁹, ob diese Interaktion aber ausschlaggebend für die in Brustzellen beobachtete Aktivierung ist, konnte zunächst nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden. Schließlich war es denkbar, dass FHL2 hier mit einem bisher unbekanntem Interaktionspartner c-jun indirekt, z.B. über Phosphorylierungskaskaden, aktiviert.

Ob die FHL2-abhängige Aktivierung der AP-1-Aktivität durch eine direkte Interaktion zwischen FHL2 und c-jun vermittelt wird oder ob es sich um einen indirekten Effekt handelt, vergleichbar mit der Interaktion von FHL2 und ERK2, konnte allerdings durch verschiedene Interaktionsstudien geklärt werden.

In-vitro Pull-Down Versuche gaben einen ersten Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen FHL2 und c-jun. Durch die Verwendung von Deletionsmutanten konnte die

Interaktionsdomäne zudem auf die ersten beiden LIM-Domänen, genauer gesagt auf die Aminosäuren 20 bis 113, eingeschränkt werden (Abbildung 13). Die gleichen Domänen waren in den Reporteranalysen für die Modulation der c-jun-Aktivität verantwortlich (Abbildung 7c). In *In-vivo* Co-IPs konnten die Beobachtungen aus den *Pull-Down* Versuchen nochmals bestätigen. Sowohl bei einer Fällung mit c-jun, als auch mit FHL2 konnte der jeweilige Interaktionspartner nachgewiesen werden (Abbildung 14). Es ist bezeichnend, dass die FHL2-c-jun-Interaktion ausschließlich im Kern stattfindet und nicht im Cytosol. Dies war aufgrund der Lokalisation der beiden Proteine jedoch zu erwarten.

Diese Interaktionsstudien, zusammen mit den Reporteranalysen sowie den Expressionsanalysen, zeigen FHL2 als direkten Interaktionspartner von c-jun. Diese Interaktion führt nicht nur zu einer Induzierung der IL-6- und IL-8-Transkription, sondern auch zu einer Expression von Cyclin D1 und der darauf folgenden Phosphorylierung des RB-Proteins.

4.7 FHL2 ist in die Zellzyklusregulation involviert

Die bisherigen Daten zeigen, dass FHL2 über c-jun die Cyclin D1-Expression induziert. Dies führt zu einer Phosphorylierung des RB-Proteins, was auf eine Aufhebung der G1/S-Kontrollpunktblockade hinweist. Es lag daher nahe, dass FHL2 eine Rolle in der Zellzyklusregulation spielt. Ein weiteres Indiz, neben der Induktion der Cyclin D1-Expression, war die bereits nachgewiesene Interaktion von FHL2 mit CDC47, einem weiteren Zellzyklusregulator⁶².

In weiteren Versuchen sollte daher die Auswirkung eines veränderten FHL2-Status auf die Zellzyklusregulation untersucht werden. Die FHL2-vermittelte Cyclin D1-Induktion ließ ein Aufheben der G1/S-Blockade und damit einen beschleunigten Zellzyklusdurchlauf erwarten. Ob dies der Fall ist, wurde durch einen Vergleich der Zellzyklusverteilung der Zelllinien MCF7-WT und MCF7-FHL2 sowie MDA-MB 231 shSCR und shFHL2 im Durchflusszytometer ermittelt.

Überraschenderweise unterscheidet sich die Zellzyklusverteilung von MCF7-WT und MCF7-FHL2 nur marginal. Trotzdem ist eine Tendenz zu erkennen. Die MCF7-WT-Zellen erreichen den G2/M-Kontrollpunkt nach 8 bis 10 h, wogegen dies bei MCF7-FHL2-Zellen erst nach 12 h der Fall ist. Insgesamt betrachtet durchschreiten die MCF7-FHL2-Zellen von Beginn an den Zellzyklus langsamer als

die MCF7-Zellen (Abbildung 15a). Trotz FHL2-induzierter Cyclin D1-Expression proliferieren die FHL2-exprimierenden Zellen langsamer.

Ein ähnliches Bild ergibt sich in den MDA-MB 231. Auch hier durchschreiten die FHL2-positiven shSCR-Zellen den Zellzyklus langsamer als die FHL2-reduzierten shFHL2-Zellen. Allerdings gibt es einen signifikanten Unterschied. Die shSCR- und die shFHL2-Zellen durchlaufen bis zehn Stunden nach Aufhebung des Zellzyklusblocks den Zellzyklus nahezu parallel und nicht, wie in den MCF7, verzögert. Erst nach 12 Stunden ist ein erster Unterschied sichtbar. Hier befinden sich bei den MDA-MB 231 shSCR noch signifikant mehr Zellen in der G2/M-Phase als in den shFHL2 (41,9% shSCR zu 33,5% shFHL2). Die shFHL2-Zellen schreiten also deutlich schneller durch die Mitose als die shSCR-Zellen (Abbildung 15b).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expression von FHL2 nicht, wie erwartet, zu einem beschleunigten G1/S-Übergang führt, sondern zu einem verlangsamten Durchgang durch die Mitose. Dies spiegelt sich auch im Proliferationsassay mit den vier Zelllinien wieder. Wenn FHL2 in der Zelle exprimiert wird, führt dies zu einem verzögerten Wachstum (Abbildung 16).

Aufgrund der vorherigen Daten war aber anzunehmen, dass durch die FHL2-vermittelte Induktion von Cyclin D1 der G1/S-Kontrollpunkt schneller durchschritten¹³³, und die Zellproliferation beschleunigt wird. Die Zellzyklusmessung und der Proliferationsassay weisen jedoch eindeutig auf einen FHL2-vermittelten inhibitorischen Effekt der Zellzyklusprogression hin. Wieso eine reduzierte FHL2-Expression zu einem beschleunigten G2/M-Übergang und somit zu einer schnelleren Zellproliferation führt, sollte nachfolgend untersucht werden.

4.8 FHL2 reguliert p21 unabhängig von p53

Der in den MDA-MB 231 beobachtete, beschleunigte G2/M-Übergang weist darauf hin, dass FHL2 in die Regulation dieses Kontrollpunkts involviert sein könnte. Ein wichtiger Regulator des G1/S- und G2/M-Übergangs ist der Zellzyklusinhibitor p21⁹¹. p21 blockiert den G1/S-Übergang durch die Inhibition von Cyclin D1 und Cyclin E¹⁶ und den G2/M-Übergang durch die Inhibition von CDC2 und Cyclin B1¹³⁴.

Daher wurden in Western-Blot Analysen synchronisierte MDA-MB 231 shSCR sowie shFHL2 auf ihr FHL2- und p21-Expressionsprofil untersucht. In den

FHL2-exprimierenden shSCR-Zellen wird p21, wie erwartet, zellzyklusspezifisch exprimiert mit einem Höhepunkt in der G2/M-Phase. Interessanterweise wird aber FHL2 ebenfalls zum G2/M-Kontrollpunkt hin induziert (Abbildung 17a). In den shFHL2-Zellen hingegen führt eine Reduktion von FHL2 zu einer Aufhebung der p21-Expression (Abbildung 17b).

Diese Daten zeigen zum ersten Mal eine zellzyklusspezifische Expression von FHL2, mit einem Maximum beim G2/M-Übergang. Interessanterweise ist die FHL2-Expression beim G1/S-Übergang nicht erhöht. FHL2 ist zwar grundsätzlich in der Lage die Cyclin D1-Expression zu induzieren. Da es aber beim G1/S-Kontrollpunkt nicht verstärkt exprimiert wird, könnte dies erklären, warum kein beschleunigter G1/S-Übergang beobachtet werden konnte.

Darüber hinaus gibt es einen Zusammenhang zwischen der FHL2- und p21-Expression, da, in den FHL2-negativen shFHL2, die p21-Expression stark reduziert ist.

Dieser Zusammenhang zwischen der FHL2- und p21-Expression konnte durch die Induzierung von DNA-Schäden mittels Doxorubicin in shSCR und shFHL2 genauer beleuchtet werden. In shSCR-Zellen wird p21 klar induziert, wogegen in den shFHL2 auch nach der Doxorubicin-Behandlung kein p21 detektierbar war (Abbildung 18a). Das gleiche Bild ergab sich bei der transienten Reduktion des FHL2-Gehalts in MTSV1-7-Zellen. Auch hier konnte keine p21-Expression festgestellt werden (Abbildung 18b).

Der klassische Induktor der p21-Expression ist p53. Daher war der p53-Status in den MDA-MB 231 shSCR und shFHL2 ebenfalls von Interesse. In Western-Blot Analysen konnte in beiden Zelllinien sowohl ein hoher p53-Proteingehalt, als auch eine identische Menge aktiviertes p53 (phospho-p53) nachgewiesen werden. Trotzdem gab es Unterschiede im p21-Expressionsprofil. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür liegt demnach bei der Funktion von p53. Wie in vielen Karzinomen ist p53 in den MDA-MB 231 inaktiv⁹⁶. Dadurch hat es die Fähigkeit zur Modulation der p21-Expression verloren. (Abbildung 19a).

Die Induktion von FHL2 zur G2/M-Phase in den MDA-MB 231 führt zu einer Induktion von p21 und somit zum Kontrollpunktarrest, wogegen die FHL2-reduzierten Zellen diesen einfach übergehen. Dies kann auch das grundsätzlich verzögerte Wachstum in den FHL2-postiven MCF7-FHL2 und

MDA-MB 231 shSCR-Zellen erklären. In den shFHL2 führt der Verlust von p21 zu einem beschleunigten G2/M-Übergang, wodurch die Zellen letztendlich schneller proliferieren. In den MCF7-FHL2 wird FHL2 hingegen nicht zellzyklusspezifisch, sondern konstitutiv exprimiert. Zudem besitzt MCF7-Zellen aktives p53. Dadurch wird die FHL2-abhängige p21-Expression wahrscheinlich überlagert. Allerdings ist denkbar, dass die Überexpression von FHL2 trotzdem zu einer erhöhten p21-Expression und zu einer langsameren Proliferation der Zellen führt⁶⁰. Dieser Effekt ist immer noch so stark, dass die durch FHL2 erhöhte Cyclin D1-Expression keine direkten Auswirkungen auf die Proliferationsrate hat.

Reporteranalysen mit einem p21-abhängigen Promotor konnten nochmals die Western-Blot Analysen bestätigen. Bei einer durch Doxorubicin-vermittelten DNA-Schädigung wird die p21-Expression nur in Anwesenheit von FHL2 induziert. In den FHL2-negativen MDA-MB 231 shFHL2 kann das p21-abhängige Reporterplasmid dagegen nicht induziert werden (Abbildung 20).

4.9 p21 wird über FHL2 und den MAPK-Signaltransduktionsweg reguliert

Die Expression von p21 kann über mehrere Wege gesteuert werden^{29, 72, 95}. Es stellte sich daher die Frage, wie FHL2 die p21-Expression induziert.

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass FHL2 sowohl die c-jun-abhängige Transkription, als auch die p21-Expression induzieren kann. Hinzu kommt, dass p21 bereits als c-jun-Zielgen beschrieben wurde⁷². Einen Zusammenhang zwischen der FHL2-vermittelten c-jun-Aktivierung und der der p21-Induktion herzustellen lag daher nahe. Ob FHL2 aber tatsächlich über c-jun die p21-Expression induziert, sollte im Folgenden geklärt werden.

Zunächst wurde FHL2 zusammen mit dem c-jun-Aktivator MEKK1, sowie c-jun selbst zusammen mit einem p21-abhängigen Promotor in Reporteranalysen eingesetzt. Dabei konnte der p21-abhängigen Promotor durch c-jun aktiviert werden. Bei einer Ko-Transfektion mit FHL2 wird diese Aktivierung aber nochmals verstärkt. Ähnlich sieht es bei einer Ko-Transfektion mit FHL2 und MEKK1 aus, auch hier wird die MEKK1-abhängige Aktivierung durch FHL2 nochmals verstärkt (Abbildung 22).

Ob die FHL2-vermittelte Aktivierung der c-jun-abhängigen p21-Expression indirekt oder auf Promotorebene erfolgt, konnte in nachfolgenden Interaktionsstudien mit der

p21-Promotorregion geklärt werden. Chromatin-Immunopräzipitationsversuche haben gezeigt, dass FHL2 direkt auf dem p21-Promotor assoziiert ist. Da FHL2 trotz seiner LIM-Domänen nicht direkt mit der DNA interagieren kann, wird die beobachtete Interaktion wahrscheinlich indirekt über c-jun vermittelt. Dabei könnte der c-jun-Transkriptionsfaktor direkt auf der AP-1-Sequenz des p21-Promotors binden und so als Adapterprotein zwischen der DNA und FHL2 dienen (Abbildung 21).

4.10 FHL2 reprimiert über p21 CDE/CHR-abhängige Proteine

Die p21-vermittelte Inhibierung des Zellzyklus wirkt sich auf viele nachgeschaltete Zellzyklusregulatoren aus. Einer dieser Regulatoren, dessen Expression durch p53 und dem nachgeschalteten p21 inhibiert wird, ist Plk1¹⁰⁸. Plk1 reguliert, unter anderem über cdc2 und Cyclin B1, den G2/M-Übergang und spielt daher eine wichtige Rolle in der Zellzyklusprogression^{135, 136}.

Die bisherigen Daten zeigen, dass FHL2 zusammen mit c-jun die p21-Expression induziert. Daher wurde als nächstes untersucht, ob sich diese Induktion auf nachgeschaltete Proteine, wie zum Beispiel Plk1, auswirkt.

In Reporteranalysen mit einem Plk1-Reporterplasmid (plkLuc) konnte, wie erwartet, eine durch p53 und p21 induzierte Repression der Plk1-Promotoraktivität beobachtet werden. Aber auch eine Überexpression von FHL2 zeigt den gleichen Effekt. Die FHL2-vermittelte Expression von p21 führt demnach ebenfalls zur Regulation p21-abhängiger Proteine, wie zum Beispiel die Repression von Plk1 (Abbildung 23a).

Dies spiegelt sich ebenfalls in den Western-Blot Analysen wieder. In den FHL2-positiven MDA-MB 231 shSCR wird die p21-Expression durch FHL2 induziert. Dies hat die Repression der Plk1-Expression zur Folge. Analog dazu werden in den MDA-MB 231 shFHL2 nur reduzierte Mengen an FHL2 und dementsprechend wenig p21 exprimiert. Das Fehlen von p21 hebt die Repression auf, es wird mehr Plk1 exprimiert.

Weitere Studien zeigen zudem, dass auch andere zellzyklusregulatorische Proteine durch die p21-Induktion betroffen sind. Auch die Expression von CDC25C wurde reprimiert, interessanterweise aber nicht die von CDC25A. Dies ist wahrscheinlich auf das CDE/CHR-Repressorelement zurückzuführen, das sowohl Plk1 als auch

CDC25C besitzen, welches aber CDC25A fehlt (Abbildung 23b). FHL2 kann daher über die Induzierung von p21 die Expression weiterer Zellzyklusregulatoren, deren Expression CDE/CHR-abhängig ist, inhibieren.

4.11 FHL2 fördert zellmatrixunabhängiges Wachstum

Ein wichtiges Merkmal in der Tumorentwicklung ist die Fähigkeit der Zellen, zellmatrixunabhängig zu wachsen¹¹⁰. Bei dem Verlust von Zellkontakten gehen normale Zellen in die Apoptose, nicht so entartete Zellen. Die Zellmatrixunabhängigkeit korreliert gleichzeitig mit der Invasivität und der Tumorentwicklung der Zelle¹¹⁰.

Sowohl der MAPK-Signaltransduktionsweg als auch p21 leisten einen essentiellen Beitrag zum zellmatrixunabhängigen Wachstum¹¹¹. Aufgrund der Fähigkeit von FHL2 sowohl den MAPK-Signaltransduktionsweg als auch die p21-Expression zu modulieren, lag ein Vergleich FHL2-positiver und FHL2-reduzierter Zellen bezüglich des zellmatrixunabhängigen Wachstums nahe.

Im Vergleich der MCF7-WT- und MCF7-FHL2- sowie der MDA-MB 231 shSCR- und shFHL2-Zellen im *Colony-Forming Assay* ergab sich ein interessantes Bild. Die hochinvasiven MDA-MB 231 shSCR können ohne Probleme Kolonien im Softagar bilden, also zellmatrixunabhängig wachsen. Wird der FHL2-Gehalt jedoch wie in den shFHL2 reduziert, verlieren die Zellen diese Fähigkeit (Abbildung 24a).

Das gleiche ist in den MCF7 zu beobachten. Zwar können diese grundsätzlich Kolonien im Softagar bilden¹¹², die Überexpression von FHL2 führt allerdings zu einem starken ansteigen der Kolonienanzahl (Abbildung 24b).

Die FHL2-vermittelte Fähigkeit der Zellen zellmatrixunabhängig zu wachsen, korreliert mit den FHL2-Expressionsprofilen im Mammakarzinom sowie den Beobachtungen von Gabriel *et al.* in immunhistologischen Schnitten⁵⁰. Die Menge an exprimierten FHL2 geht mit einer gestiegenen Aggressivität des Tumors und einer schlechten Überlebensprognose einher. Bemerkenswert ist, dass durch eine Reduktion der FHL2-Expression die Zellen die Fähigkeit des zellmatrixunabhängigen Wachstums verlieren.

Diese Daten zeigen, wie feinreguliert die p53-unabhängige p21-Expression ist. Über den MAPK-Signaltransduktionswegs wird die c-jun-abhängige Expression und damit die Menge an p21 reguliert. Trotzdem bleibt FHL2 letztendlich für eine

p21-Expression notwendig und bildet im Zusammenspiel mit c-jun das letzte, regulative Element (Abbildung 25)

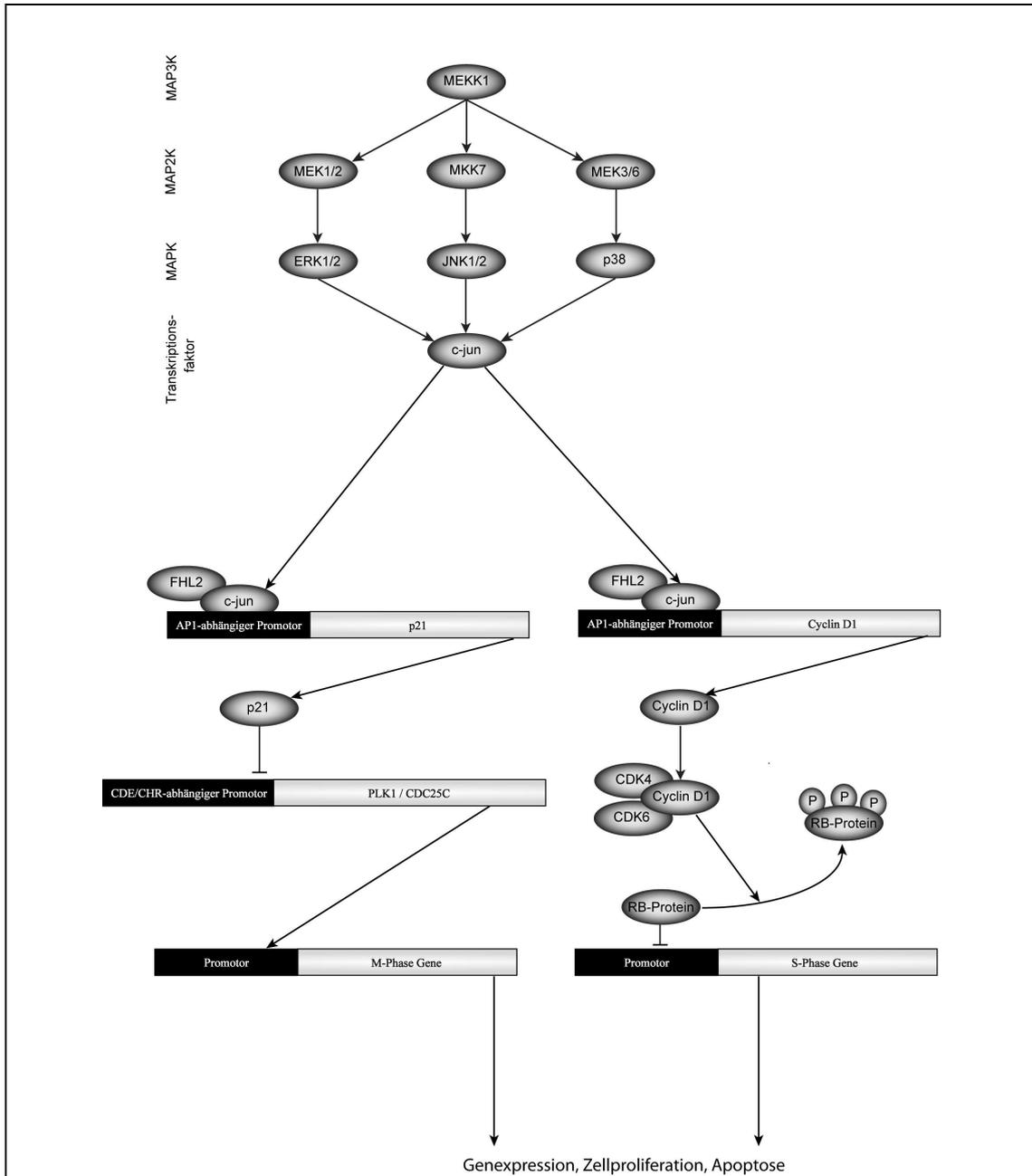


Abbildung 25: Schematische Übersicht über die FHL2-vermittelte Regulation AP-1-abhängiger Zielproteine. Im oberen Teil ist der MAPK-Signaltransduktionsweg abgebildet, reduziert auf die untersuchten Aktivatoren der c-jun-induzierten Cyclin D1- und p21-Expression. Im unteren Teil auf der rechten Seite ist die FHL2- und c-jun-abhängige Regulation der Cyclin D1-Expression sowie der nachgeschalteten RB-Protein-Phosphorylierung dargestellt. Auf der linken Seite ist die Regulierung der p21-Expression über FHL2 und c-jun sowie der Einfluss auf den CDE/CHR-abhängigen Promotor zu sehen.

5. Zusammenfassung

Die Onkogenese geht mit einer Deregulation des Zellzyklus einher. Dabei spielt unter anderem die Regulation verschiedener krebsrelevanter Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle.

Ein Interaktionspartner und Regulator vieler dieser Faktoren ist das LIM-only Protein FHL2. Es ist bereits bekannt, dass sich der FHL2-Status zwischen normalen und entarteten Zellen in allen bisher untersuchten Geweben unterscheidet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass dies auch im Brustgewebe der Fall ist. FHL2 wird in fast allen aggressiven Mammakarzinomen überexprimiert, nicht aber im Normalgewebe und nur schwach in nicht-invasiven „DCIS“. Dies weist darauf hin, dass die FHL2-Menge mit der Aggressivität des Tumors korreliert.

Weiterhin konnte hier zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass FHL2 in die Zellzyklusregulation involviert ist. Am G1/S-Übergang kann FHL2 die Cyclin D1-Expression induzieren, was letztendlich zu einer Phosphorylierung des RB-Proteins und zum Eintreten der Zelle in die S-Phase führt. Wichtiger aber ist die hier gezeigte FHL2-abhängige Induktion von p21^{CIP/WAF}, ein Zellzyklusinhibitor, der unter anderem auch in der G2/M-Kontrollpunktregulation involviert ist und normalerweise über p53 reguliert wird.

Diese Induktion resultiert dort in einem verlangsamten Kontrollpunktübergang, wogegen eine Reduktion des FHL2-Gehalts einen beschleunigten G2/M-Übergang zur Folge hat. Zusätzlich zeigten Expressionsanalysen mit synchronisierten Brustkrebszellextrakten dass FHL2 zellzyklusabhängig exprimiert wird, mit einem Maximum am G2/M-Kontrollpunkt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die p21-Expression in den hier verwendeten Brustkrebszelllinien p53-unabhängig ist und ausschließlich von FHL2 abhängt. Hierbei wird die FHL2-abhängige p21 Expression wahrscheinlich über die Aktivierung des c-jun-Transkriptionsfaktors im MAPK-Signaltransduktionsweg induziert. In vivo und in vitro Interaktionsstudien haben eine Interaktion von FHL2 mit c-jun gezeigt, wobei die Interaktion über die ersten beiden LIM-Domänen vermittelt wird. Der FHL2-c-jun-Komplex bindet an die AP-1-Sequenz innerhalb des p21-Promotors und induziert dadurch p21. Dies führt zu einer Inhibition

verschiedener CDE/CHR-regulierter Proteine wie CDC25C oder Plk1 und zu einer verzögerten Zellzyklusprogression.

In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die FHL2-Expression nicht nur zu einer verlangsamten Proliferation führt, sondern auch zur Fähigkeit der Zelle zum zellmatrixunabhängigen Wachstum beisteuert.

Es scheint auf den ersten Blick widersprüchlich, dass FHL2 für einen intakten G2/M-Kontrollpunkt und eine geringere Proliferationsrate sorgt, gleichzeitig aber zur Tumorentwicklung beiträgt. Es ist allerdings bekannt, dass Tumore ihr Wachstum verlangsamen bevor sie metastasieren. Auch führt ein erhöhter p21-Gehalt im Cytosol zu einer Inhibition der Apoptose, einer weiteren Eigenschaft von Tumoren.

FHL2 ist daher ein signifikanter Faktor in der Onkogenese des Mammakarzinoms und aufgrund der differentiellen Expression in vielen Tumoren ein interessantes Ziel für Krebstherapien.

6. Literatur

1. Loeb, D.M., Thornton, K. & Shokek, O. Pediatric soft tissue sarcomas. *Surg Clin North Am* **88**, 615-27, vii (2008).
2. Jemal, A. et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* **55**, 10-30 (2005).
3. Shannon, C. & Smith, I.E. Breast cancer in adolescents and young women. *Eur J Cancer* **39**, 2632-42 (2003).
4. WHO. Fact sheet No. 297: Cancer. (July 2008).
5. ACS. Detailed Guide: Breast Cancer in Men. *American Cancer Society* (09/27/2007).
6. Rabaglio, M., Aebi, S. & Castiglione-Gertsch, M. Controversies of adjuvant endocrine treatment for breast cancer and recommendations of the 2007 St Gallen conference. *Lancet Oncol* **8**, 940-9 (2007).
7. Gretarsdottir, S. et al. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. *Cancer Res* **58**, 859-62 (1998).
8. Somasundaram, K. et al. BRCA1 signals ARF-dependent stabilization and coactivation of p53. *Oncogene* **18**, 6605-14 (1999).
9. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-99 (2004).
10. Olayioye, M.A. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* **3**, 385-9 (2001).
11. Ross, J.S. et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* **8**, 307-25 (2003).
12. Buchholz, T.A. et al. Tumor suppressor genes and breast cancer. *Radiat Oncol Investig* **7**, 55-65 (1999).
13. Nicoletto, M.O. et al. BRCA-1 and BRCA-2 mutations as prognostic factors in clinical practice and genetic counselling. *Cancer Treat Rev* **27**, 295-304 (2001).
14. Nurse, P. The incredible life and times of biological cells. *Science* **289**, 1711-6 (2000).
15. Nurse, P., Masui, Y. & Hartwell, L. Understanding the cell cycle. *Nat Med* **4**, 1103-6 (1998).
16. Lloyd, A.C. et al. Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev* **11**, 663-77 (1997).
17. Levine, A.J., Hu, W. & Feng, Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* **13**, 1027-36 (2006).
18. Reed, J.C. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* **13**, 1378-86 (2006).
19. Vousden, K.H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604 (2002).
20. Lassus, P. et al. Anti-apoptotic activity of p53 maps to the COOH-terminal domain and is retained in a highly oncogenic natural mutant. *Oncogene* **18**, 4699-709 (1999).
21. Blagosklonny, M.V., Robey, R., Bates, S. & Fojo, T. Pretreatment with DNA-damaging agents permits selective killing of checkpoint-deficient cells by microtubule-active drugs. *J Clin Invest* **105**, 533-9 (2000).

22. Suarez, C.R., Bertolone, S.J., Raj, A.B. & Coventry, S. Second malignant neoplasms in childhood acute lymphoblastic leukemia: primitive neuroectodermal tumor of the chest wall with germline p53 mutation as a second malignant neoplasm. *Am J Hematol* **76**, 52-6 (2004).
23. Masters, S.C. et al. Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochem Soc Trans* **30**, 360-5 (2002).
24. Wu, W.S. et al. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell* **123**, 641-53 (2005).
25. Gartel, A.L. & Tyner, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639-49 (2002).
26. Janicke, R.U., Sohn, D., Essmann, F. & Schulze-Osthoff, K. The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle* **6**, 407-13 (2007).
27. Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W. & Dutta, A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* **374**, 386-8 (1995).
28. Wendt, J. et al. Induction of p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* **25**, 972-80 (2006).
29. Gartel, A.L. & Tyner, A.L. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* **246**, 280-9 (1999).
30. Matthews, J.M. & Sunde, M. Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life* **54**, 351-5 (2002).
31. Shawlot, W. & Behringer, R.R. Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* **374**, 425-30 (1995).
32. Arber, S. et al. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805-9 (1998).
33. Yang, N. et al. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-12 (1998).
34. Bernard, O., Ganiatsas, S., Kannourakis, G. & Dringen, R. Kiz-1, a protein with LIM zinc finger and kinase domains, is expressed mainly in neurons. *Cell Growth Differ* **5**, 1159-71 (1994).
35. Mizuno, K. et al. Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* **9**, 1605-12 (1994).
36. Okano, I. et al. Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. *J Biol Chem* **270**, 31321-30 (1995).
37. Stanyon, C.A. & Bernard, O. LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 389-94 (1999).
38. Dawid, I.B., Breen, J.J. & Toyama, R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* **14**, 156-62 (1998).
39. Jurata, L.W. & Gill, G.N. Structure and function of LIM domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 75-113 (1998).
40. Rabbitts, T.H. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* **12**, 2651-7 (1998).

-
41. Fimia, G.M., De Cesare, D. & Sassone-Corsi, P. A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol* **20**, 8613-22 (2000).
 42. Muller, J.M. et al. FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J* **19**, 359-69 (2000).
 43. Martin, B. et al. The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol* **159**, 113-22 (2002).
 44. Kleiber, K., Strebhardt, K. & Martin, B.T. The biological relevance of FHL2 in tumour cells and its role as a putative cancer target. *Anticancer Res* **27**, 55-61 (2007).
 45. Johannessen, M., Moller, S., Hansen, T., Moens, U. & Van Ghelue, M. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci* **63**, 268-84 (2006).
 46. Loughna, P.T., Mason, P., Bayol, S. & Brownson, C. The LIM-domain protein FHL1 (SLIM 1) exhibits functional regulation in skeletal muscle. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**, 136-40 (2000).
 47. Genini, M. et al. Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma. *DNA Cell Biol* **16**, 433-42 (1997).
 48. Morgan, M.J. & Madgwick, A.J. The fourth member of the FHL family of LIM proteins is expressed exclusively in the testis. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 251-5 (1999).
 49. Morgan, M.J. & Whawell, S.A. The structure of the human LIM protein ACT gene and its expression in tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **273**, 776-83 (2000).
 50. Gabriel, B. et al. Expression of the transcriptional coregulator FHL2 in human breast cancer: a clinicopathologic study. *J Soc Gynecol Investig* **13**, 69-75 (2006).
 51. Wang, J. et al. Suppression of FHL2 expression induces cell differentiation and inhibits gastric and colon carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 1066-76 (2007).
 52. Wei, Y. et al. Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of beta-catenin. *J Biol Chem* **278**, 5188-94 (2003).
 53. Tanahashi, H. & Tabira, T. Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. *Hum Mol Genet* **9**, 2281-9 (2000).
 54. Gabriel, B. et al. Focal adhesion kinase interacts with the transcriptional coactivator FHL2 and both are overexpressed in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res* **24**, 921-7 (2004).
 55. Kinoshita, M., Nakagawa, T., Shimizu, A. & Katsuoka, Y. Differently regulated androgen receptor transcriptional complex in prostate cancer compared with normal prostate. *Int J Urol* **12**, 390-7 (2005).
 56. Chen, D. et al. SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res* **63**, 6626-34 (2003).
 57. Yan, J. et al. BRCA1 interacts with FHL2 and enhances FHL2 transactivation function. *FEBS Lett* **553**, 183-9 (2003).
 58. Lee, S.W., Kim, E.J. & Um, S.J. FHL2 mediates p53-induced transcriptional activation through a direct association with HIPK2. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 1056-62 (2006).

-
59. Morlon, A. & Sassone-Corsi, P. The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3977-82 (2003).
 60. Martin, B.T. et al. FHL2 regulates cell cycle-dependent and doxorubicin-induced p21Cip1/Waf1 expression in breast cancer cells. *Cell Cycle* **6**, 1779-88 (2007).
 61. Labalette, C., Renard, C.A., Neuveut, C., Buendia, M.A. & Wei, Y. Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin. *Mol Cell Biol* **24**, 10689-702 (2004).
 62. Chan, K.K. et al. Protein-protein interaction of FHL2, a LIM domain protein preferentially expressed in human heart, with hCDC47. *J Cell Biochem* **76**, 499-508 (2000).
 63. Paul, C. et al. The LIM-only protein FHL2 is a negative regulator of E4F1. *Oncogene* **25**, 5475-84 (2006).
 64. Purcell, N.H. et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* **24**, 1081-95 (2004).
 65. Kobayashi, S. et al. FHL2, UBC9, and PIAS1 are novel estrogen receptor alpha-interacting proteins. *Endocr Res* **30**, 617-21 (2004).
 66. Yang, Y., Hou, H., Haller, E.M., Nicosia, S.V. & Bai, W. Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *EMBO J* **24**, 1021-32 (2005).
 67. Wixler, V. et al. The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem* **275**, 33669-78 (2000).
 68. Whitebread, L.A. & Dalton, S. Cdc54 belongs to the Cdc46/Mcm3 family of proteins which are essential for initiation of eukaryotic DNA replication. *Gene* **155**, 113-7 (1995).
 69. Labalette, C. et al. The LIM-only protein FHL2 regulates cyclin D1 expression and cell proliferation. *J Biol Chem* (2008).
 70. MacCorkle, R.A. & Tan, T.H. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys* **43**, 451-61 (2005).
 71. Cakir, Y. & Ballinger, S.W. Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: the role of MAPK. *Antioxid Redox Signal* **7**, 726-40 (2005).
 72. Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-400 (2001).
 73. Terada, Y. et al. Regulation of cyclin D1 expression and cell cycle progression by mitogen-activated protein kinase cascade. *Kidney Int* **56**, 1258-61 (1999).
 74. Fan, Y., Borowsky, A.D. & Weiss, R.H. An antisense oligodeoxynucleotide to p21(Waf1/Cip1) causes apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **2**, 773-82 (2003).
 75. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80 (1983).
 76. Sharp, P.A., Sugden, B. & Sambrook, J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055-63 (1973).

-
77. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
 78. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
 79. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4 (1979).
 80. Shah, S., Pishvaian, M.J., Easwaran, V., Brown, P.H. & Byers, S.W. The role of cadherin, beta-catenin, and AP-1 in retinoid-regulated carcinoma cell differentiation and proliferation. *J Biol Chem* **277**, 25313-22 (2002).
 81. Park, J. et al. Deficiency in the LIM-only protein FHL2 impairs assembly of extracellular matrix proteins. *FASEB J* (2008).
 82. Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E. & Woodgett, J.R. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670-4 (1991).
 83. Lin, S.Y. et al. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4262-6 (2000).
 84. Soh, J.W. & Weinstein, I.B. Roles of specific isoforms of protein kinase C in the transcriptional control of cyclin D1 and related genes. *J Biol Chem* **278**, 34709-16 (2003).
 85. Radisavljevic, Z. Inactivated tumor suppressor Rb by nitric oxide promotes mitosis in human breast cancer cells. *J Cell Biochem* **92**, 1-5 (2004).
 86. Knudson, A.G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-3 (1971).
 87. Freund, A. et al. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene* **22**, 256-65 (2003).
 88. De Larco, J.E. et al. A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am J Pathol* **158**, 639-46 (2001).
 89. Strano, S. et al. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene* **26**, 2212-9 (2007).
 90. Caldon, C.E., Daly, R.J., Sutherland, R.L. & Musgrove, E.A. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem* **97**, 261-74 (2006).
 91. Samuel, T., Weber, H.O. & Funk, J.O. Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* **1**, 162-8 (2002).
 92. Fotedar, R., Bendjennat, M. & Fotedar, A. Role of p21WAF1 in the cellular response to UV. *Cell Cycle* **3**, 134-7 (2004).
 93. el-Deiry, W.S. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-25 (1993).
 94. el-Deiry, W.S. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**, 1169-74 (1994).
 95. Gartel, A.L. & Radhakrishnan, S.K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* **65**, 3980-5 (2005).
 96. Hui, L., Zheng, Y., Yan, Y., Bargonetti, J. & Foster, D.A. Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* **25**, 7305-10 (2006).
-

-
97. Saramaki, A., Banwell, C.M., Campbell, M.J. & Carlberg, C. Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic Acids Res* **34**, 543-54 (2006).
 98. Zhu, H., Chang, B.D., Uchiumi, T. & Roninson, I.B. Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SI1). *Cell Cycle* **1**, 59-66 (2002).
 99. Hamanaka, R. et al. Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J Biol Chem* **270**, 21086-91 (1995).
 100. Lee, K.S., Yuan, Y.L., Kuriyama, R. & Erikson, R.L. Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol Cell Biol* **15**, 7143-51 (1995).
 101. Nigg, E.A. Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 776-83 (1998).
 102. Uchiumi, T., Longo, D.L. & Ferris, D.K. Cell cycle regulation of the human polo-like kinase (PLK) promoter. *J Biol Chem* **272**, 9166-74 (1997).
 103. Otaki, M. et al. Cell cycle-dependent regulation of TIAP/m-survivin expression. *Biochim Biophys Acta* **1493**, 188-94 (2000).
 104. Zwicker, J. et al. Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J* **14**, 4514-22 (1995).
 105. Fung, T.K. & Poon, R.Y. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 335-42 (2005).
 106. Lange-zu Dohna, C., Brandeis, M., Berr, F., Mossner, J. & Engeland, K. A CDE/CHR tandem element regulates cell cycle-dependent repression of cyclin B2 transcription. *FEBS Lett* **484**, 77-81 (2000).
 107. Liu, N. et al. CDF-1, a novel E2F-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters. *Nucleic Acids Res* **25**, 4915-20 (1997).
 108. Sun, Y. p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer. *Mol Carcinog* **45**, 409-15 (2006).
 109. Yu, D. et al. Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell* **2**, 581-91 (1998).
 110. Carney, D.N., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small-cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* **40**, 1820-3 (1980).
 111. Howe, A.K. & Juliano, R.L. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* **2**, 593-600 (2000).
 112. Manni, A., Wright, C. & Buck, H. Growth factor involvement in the multihormonal regulation of MCF-7 breast cancer cell growth in soft agar. *Breast Cancer Res Treat* **20**, 43-52 (1991).
 113. Samson, T. et al. The LIM-only proteins FHL2 and FHL3 interact with alpha- and beta-subunits of the muscle alpha7beta1 integrin receptor. *J Biol Chem* **279**, 28641-52 (2004).
 114. Raman, M., Chen, W. & Cobb, M.H. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**, 3100-12 (2007).

115. Mendoza-Gamboa, E., Siwak, D.R. & Tari, A.M. The HER2/Grb2/Akt pathway regulates the DNA binding activity of AP-1 in breast cancer cells. *Oncol Rep* **12**, 903-8 (2004).
116. Liu, Y. et al. AP-1 blockade in breast cancer cells causes cell cycle arrest by suppressing G1 cyclin expression and reducing cyclin-dependent kinase activity. *Oncogene* **23**, 8238-46 (2004).
117. Heemers, H.V., Regan, K.M., Dehm, S.M. & Tindall, D.J. Androgen induction of the androgen receptor coactivator four and a half LIM domain protein-2: evidence for a role for serum response factor in prostate cancer. *Cancer Res* **67**, 10592-9 (2007).
118. Notelovitz, M. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril* **77 Suppl 4**, S34-41 (2002).
119. Pappo, A.S. Rhabdomyosarcoma and other soft tissue sarcomas in children. *Curr Opin Oncol* **8**, 311-6 (1996).
120. Gudjonsson, T., Villadsen, R., Ronnov-Jessen, L. & Petersen, O.W. Immortalization protocols used in cell culture models of human breast morphogenesis. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2523-34 (2004).
121. Osborne, C.K., Hobbs, K. & Trent, J.M. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat* **9**, 111-21 (1987).
122. Wixler, V. et al. Deficiency in the LIM-only protein Fhl2 impairs skin wound healing. *J Cell Biol* **177**, 163-72 (2007).
123. Muller, J.M. et al. The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J* **21**, 736-48 (2002).
124. Butt, A.J. et al. Cell cycle machinery: links with genesis and treatment of breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **630**, 189-205 (2008).
125. Milde-Langosch, K. et al. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* **86**, 139-52 (2004).
126. Sliva, D. Signaling pathways responsible for cancer cell invasion as targets for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 327-36 (2004).
127. Ng, E.K. et al. Interaction of the heart-specific LIM domain protein, FHL2, with DNA-binding nuclear protein, hNP220. *J Cell Biochem* **84**, 556-66 (2002).
128. Li, S., Gerrard, E.R., Jr. & Balkovetz, D.F. Evidence for ERK1/2 phosphorylation controlling contact inhibition of proliferation in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C432-9 (2004).
129. Ito, C. et al. Role of cyclins in cAMP inhibition of glomerular mesangial cell proliferation. *Clin Sci (Lond)* **107**, 81-7 (2004).
130. Qu, Z., Weiss, J.N. & MacLellan, W.R. Regulation of the mammalian cell cycle: a model of the G1-to-S transition. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C349-64 (2003).
131. Barbieri, F. et al. Expression of cyclin D1 correlates with malignancy in human ovarian tumours. *Br J Cancer* **75**, 1263-8 (1997).
132. Chau, B.N. & Wang, J.Y. Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer* **3**, 130-8 (2003).
133. Tashiro, E., Tsuchiya, A. & Imoto, M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* **98**, 629-35 (2007).

134. Taylor, W.R. & Stark, G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**, 1803-15 (2001).
135. Martin, B.T. & Strebhardt, K. Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control. *Cell Cycle* **5**, 2881-5 (2006).
136. Yuan, J. et al. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* **21**, 8282-92 (2002).
137. Blagosklonny, M.V. Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle* **1**, 391-3 (2002).
138. Suzuki, A. et al. Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death Differ* **7**, 721-8 (2000).

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
μ	Mikro
abs	absolut
Ac	Acetat
ACT	Activator of CREM in Testis
add	auf
Amp	Amicillin
Antisense	Gegenstromrichtung
APC	Anaphase Promoting Complex
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
AT	Ataxia teleangiectatica
b	Base(n)
bidest.	doppelt destiliert
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset
BRCA2	Breast Cancer Type 2 susceptibility protein
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
ca.	circa
CDK	Cyclin-dependent Kinase
d. h.	das heißt
DCIS	Ductal Carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescent Solution
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth-factor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase

et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FHL	Four and a Half LIM-Domain
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
H	Histidin
Her2/neu	Human Epidermal growth factor Receptor 2
JNK	c-jun-terminal Kinase
kb	Kilobasen
konz.	konzentriert
LIM	Lin11, Isl-1 & Mec-3
M	Molarität
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
min	Minute
MKK	Mitogen-activated Kinase Kinase
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
N	normal
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p.a.	pro Analysis
p21	P21Cip/WAF
PBS	„Phosphate buffered saline“
PBST	„Phosphate buffered saline and Tween“
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
pH	potentia hydrogenii
RB	„Running Buffer“
RB-Protein	Retinoblastom-Protein

RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	small-haripin RNA
siRNA	small interference RNA
SSC	„standard saline citrate“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametzyletzyamin
TGF	Transforming growth-factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett(-Strahlung)
v/v	„volume/ volume“
Vol.	Volumen
W	Tryptophan
w/v	„weight/ volume“
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8. Danksagung

Ich möchte als erstes meinen Eltern danken, denen ich diese Arbeit widme. Mein Vater hat mich stets in meinem Beschluss gestärkt, das aus meinem Leben zu machen, was ich für richtig halte. Auch konnte ich immer auf die Unterstützung meiner Mutter zählen, wenn ich diese brauchte. Nicht zuletzt verdanke ich es diesen beiden, dass ich diese Arbeit schreiben konnte.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen.

Zudem möchte sehr herzlich Dr. rer. nat. Bernd Martin für seine fachliche und vor allem freundschaftliche Unterstützung danken. Seine Hilfe, sein Rat und seine Geduld haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Monika Raab danke ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei den Proteininteraktionsstudien. Ohne sie wären diese Daten und die entsprechenden Abbildungen nicht möglich gewesen.

Selbstverständlich geht mein Dank auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, allem voran Brigitte Zimmer, aber auch an Anne Greiner, Nina-Naomi Kreis, Andrea Krämer, Sven Kappel, Lisa Kurunci-Csacsco, Yves Matthes, und Juping Yuan. Ich konnte jeden einzelnen von ihnen, falls nötig, um Hilfe bitten und habe sie auch immer erhalten.

Des Weiteren möchte ich Shih-Han Hsiao danke, die stets der Meinung war, dass das, was ich mache, ja viel zu einfach sei und ich daher mein Studium wohl ohne Probleme schaffen sollte.

Auch möchte ich Peter Brauer, Nico Frühwacht, Nina-Naomi Kreis und nicht zuletzt meinem Bruder Jens Kleiber danken, die nicht nur stets für mich da waren, sondern auch diese Arbeit Korrektur gelesen haben, was einigen von ihnen sicherlich Kopfschmerzen bereitet hat.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Daniel Garitz, Nicolai Rödiger und Matthias Klein für die notwendige private Ablenkung danken, die ich benötigt habe, um mich auf mein Studium zu konzentrieren.

Die Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main erfolgte durch Prof. Dr. phil. nat. Jürgen Bereiter-Hahn, Institut für Biophysikalische Chemie, Max-von-Laue-Str. 9 in 60438 Frankfurt am Main.

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Molekularbiologisches Labor, Theodor-Stern-Kai 7 in 60590 Frankfurt angefertigt.

Die Versuchsbetreuung erfolgte durch Dr. rer. nat. Bernd Martin, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Molekularbiologisches Labor, Theodor-Stern-Kai 7 in 60590 Frankfurt.

9. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Hanau, der 16. November, 2008

Kai Kleiber

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„Untersuchung zur Funktion des LIM-only Proteins FHL2 im
Mammakarzinom“**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Hanau, der 16. November, 2008

Kai Kleiber

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Kai Kleiber
Anschrift	Am Steinacker 5 63454 Hanau Deutschland
Geburtsdatum	16. November 1977
Telefon	+(49) – 69 – 257 15 257
Mobil	+(49) – 176 – 631 97 907
Email	kai.kleiber@gmx.de

Ausbildung

Grundschule	1984 – 1988	Wilhelm Geibel Schule Hanau
Gymnasium	1988 – 1994	Otto Hahn Schule Hanau
	1994 – 1997	Karl Rehbein Schule Hanau
Studium		
<i>Grundstudium</i>	1998 – 2000	Johann Wolfgang Goethe-Universität
<i>Hauptstudium</i>	2000 – 2004	Johann Wolfgang Goethe Universität
Promotion	seit 12.2004	Universitätsklinikum Frankfurt Abteilung für molekulare Gynäkologie

Publikationen

Kleiber K, Strebhardt K, Martin BT.
The biological relevance of FHL2 in tumour cells and its role as a putative cancer target.
Anticancer Res. 2007 Jan-Feb;27(1A):55-61. Review.

Kleiber K, Martin BT, Wixler V, Raab M, Zimmer B, Kaufmann M, Strebhardt K.
FHL2 regulates cell cycle-dependent and doxorubicin-induced p21Cip1/Waf1 expression in breast cancer cells.
Cell Cycle. 2007 May;6(14):1779-88.

Nebentätigkeiten

Zivildienst	07.1997 – 07.1998	Petro Jung Schule Hanau (Abteilung für körperbehinderte Kinder)
Dozent	01.2005 – 12.2007	Staatliche Schule für technische Assistenten in der Medizin des Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
