Duale Regulation von Cofilin durch Proteinkinase D (PKD) vermittelte Phosphorylierung der Phosphatase SSH1L und der LIM-Kinase 2

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Philipp Peterburs

aus Gütersloh

Hauptberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier

Mitberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2011

Institut für Zellbiologie und Immunologie

Universität Stuttgart

2011

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Stuttgart, 15.10.2010

Philipp Peterburs

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
ADF	Actin depolymerizing factor
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3-Komplex	Actin-Related Proteins ARP2 and ARP3 - complex
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BMP	bone marrow protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20
Cdc42	cell division control (protein) 42
CDK	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	Diacylglycerol
DNA	deoxyribonucleic acid
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLC1	deleted in liver cancer 1
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant negativ
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	enhanced chemiliuniscence
ECM	extra cellulare matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	forward
FOXO	forkhead box O
Gab2	Grb2-associated binder
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GPCR	G-Protein coupled receptor
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hemagglutinin
HDAC	Histondeacetylasen
IHC	immunohistochemistry
IGF	insulin growth factor
IgG	Immunglobulin G
IKK-Komplex	IκBα-Kinase-Komplex

IL-8	Interleukin 8
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KD	Kinase death
kDa	Kilodalton
Kidins220	kinase D-interacting substrate of 220 kDa
LB	lysogeny broth
LIMK	LIM domain kinase
MAPKAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase
MEF	myocyte enhancer factor
MEK	Methylethylketon
MMP	Matrixmetalloproteasen
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mRNA	messanger Ribonukleinsäure
NaF	Natriumfluorid
NBT	Nitro blue tetrazolium
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	nukläre Lokalisationssequenz
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
PAK	p21-activating kinase
Par1	protease-activated receptor 1
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline tween
pCofilin	phosphoryliertes Cofilin
PCR	polymerase chain reaction
PD	pulldown
PdBU	Phorbol 12,13-dibutyrat
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
pH	potentia hydrogenium
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie Domäne
PI-3K	Phosphatidylinositol III-Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLCy	Phospholipase Cy
POD	Peroxidase
PtdIns(4)K IIIβ	Phosphatidylinositol-4-kinase IIIβ
PtdIns(4,5)P_2	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Raf	rapidly growing fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
rev	reverse
Rho	Ras homologue
RIN1	Ras and Rab interactor 1
RNAi	RNA-Interferenz
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	reactive oxgen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-transkriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
Shc	Src homology domain-containing protein
siRNA	small interfering RNA
Src	Sarcoma
SSH1L	slingshot-1-like
Tab.	Tabelle
Taq	*Thermus aquaticus*
TBS	Tris buffered saline
TCL	Total cell lysate
TEMED	Tetramethylethylendiamin)
TESK	Testikulare Proteinkinase
TGF	transforming growth factor
TGN	*trans*-Golginetzwerk
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tyr	Tyrosin
VEGF	vascular endothelial growth factor
WASp	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE2	WASP family protein member 2
WB	Western Blot
WH2-Domäne	WASp Homologie Domäne
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **III**
Inhaltsverzeichnis **VI**
Zusammenfassung **IX**
Abstract **X**

1. Einleitung **1**
1.1. Bedeutung der Zellmigration für die Tumorentstehung und Metastasierung **1**
1.2. Die Rolle des Aktinzytoskeletts in der Zellmigration **2**
1.2.1 Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten 2
1.2.2 Zelluläre Aktinstrukturen 4
1.3. Die Rolle von Cofilin in der Zellmigration **5**
1.4. LIM-Kinasen **7**
1.5. Die Cofilinphosphatase SSH (slingshot) **9**
1.6. Proteinkinase D **11**
1.7. Zielsetzung **14**

2. Materialien **15**
2.1. Reagenzienliste **15**
2.2. Enzyme **16**
2.3. Puffer und Lösungen **16**
2.4. Antikörper **18**
2.4.1. Primäre Antikörper 18
2.4.2. Sekundäre Antikörper 19
2.5. Vektoren, Konstrukte und Oligonukleotide **19**
2.5.1. Vektoren und Plasmide 19
2.5.2. Verwendete siRNAs 20
2.5.3. Verwendete Oligonukleotide 20
2.6. Bakterienkultur **21**
2.6.1. Bakterienstämme 21
2.6.2. Komponenten und Lösungen 21
2.7. Zellkultur **21**
2.7.1. Zelllinien 21
2.7.2. Komponenten und Lösungen 21

2.8. Verbrauchsmaterialien und Geräte **22**
2.8.1. Laborware 22
2.8.2. Reagenziensysteme 22
2.8.3. Geräte 22

3. Methoden **23**
3.1. Molekularbiologische Methoden **23**
3.1.1. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) 23
3.1.2. Reverse Transkriptase - PCR (RT-PCR) 24
3.1.3. Einfügen von Punktmutationen in SSH1L und LIMK2 Konstrukte mittels der Quick Change PCR 25
3.1.4. Durchführung von DNA- Mini- und Midipräparationen 26
3.2. Zellbiologische Methoden **26**
3.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen 26
3.2.2. Transfektionsmethoden zur transienten Proteinexpression eukaryotischer Zelllinien 26
3.2.3. Transfektion von Zellen mit siRNA 27
3.2.4. Analyse der Zellmigration mit Hilfe von Transwell-Filtereinsätzen 28
3.3. Proteinbiochemische Methoden **28**
3.3.1. SDS-PAGE und Western Blot Analyse 28
3.3.2. Durchführung von 14-3-3 Pulldown-Assays 29
3.3.3. Herstellung von GST-14-3-3ß-Beads 29
3.3.4. Durchführung von Immunpräzipitationen 30
3.3.5. *in vitro* Substratphosphorylierung 30
3.3.6. Reinigung von FLAG-SSH1L 30
3.3.7. Reinigung von Antikörpern über Epoxy-aktivierte Sepharose 6B 31
3.3.8. Bestimmung IgG-reicher Fraktionen mittels ELISA 31
3.4. Mikroskopische Verfahren **32**
3.4.1. Immunfluoreszenz 32
3.4.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie 32
3.4.3. Bestimmung der von einer einzelner Zellen eingenommenen Fläche 33

4. Ergebnisse **34**
4.1. Identifikation eines geeigneten Zellsystems **34**
4.2. PKD reguliert die Zellmigration durch Phosphorylierung der Cofilinphosphatase Slingshot 1 like (SSH1L) **37**

4.3. PKD reguliert die Cofilin-Kinase LIMK2 durch Phosphorylierung an Serin 289 **45**

4.4. Generierung und Reinigung eines phospho-Serin 289 spezifischen Antikörpers **51**

4.4.1. Reinigung und Funktionalitätstest des phosphospezifischen LIM-Kinase Serin 289 Antikörpers aus Kaninchenserum 51

4.4.2. Funktionsanalyse der Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289 53

5. Diskussion **57**

5.1. Negative Regulation der gerichteten Zellmigration durch PKD **57**

5.2. PKD als regulierende Kinase der Cofilinphosphatase SSH1L **59**

5.3. Funktion der PKD vermittelten Phosphorylierung der LIMK2 **61**

5.4. Funktion von LIMK2 im Zellzyklus und der Mitose **64**

5.5. Ausblick **65**

6. Literaturverzeichnis **66**

Zusammenfassung

Das Verständnis von Metastasierung bei Krebserkrankungen ist eine der größten Herausforderungen für die Entwicklung neuer Medikamente. Dies erfordert die Erforschung der Signalwege, die die Organisation des Aktinzytoskeletts sowie Tumorzellmigration und -invasion steuern. In dieser Arbeit konnte die Rolle von Proteinkinase D (PKD) in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und der Zellmigration entschlüsselt werden. Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass PKD die Zellmigration negativ reguliert - höchstwahrscheinlich durch die Kontrolle der Aktinpolymerisations-Maschinerie. Die Substrate von PKD in diesem Prozess waren bisher jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte die Cofilinphosphatase Slingshot 1 Like (SSH1L) als Substrat von PKD identifiziert werden. Cofilin induziert die Aktinpolymerisation durch das Schneiden von F-Aktin Filamenten. Auf diesem Wege werden neue, freie sogenannte stumpfe Enden (*"barbed ends"*) generiert. Weiterhin steigert Cofilin die Aktindepolymerisation, wodurch der Pool an Aktin-Monomeren erhöht wird. Aus diesen Gründen kann Cofilin als Schlüssel-Regulator in der Zellmigration bezeichnet werden. Die Aktivität von Cofilin ist von seiner Phosphorylierung abhängig: Eine Phosphorylierung durch die LIM-Kinasen 1 und 2 hemmt die Fähigkeit von Cofilin an Aktin zu binden und führt damit zu dessen Inaktivierung. Entsprechend führt eine Dephosphorylierung des Proteins durch SSH- und Chronophinphosphatasen zur Aktivierung. PKD phosphoryliert die Serine 937 und 978 in SSH1L *in vitro* und in intakten Zellen und induziert dadurch die Bindung von 14-3-3 Proteinen, die die zelluläre Lokalisation von SSH1L regulieren. Auf diesem Weg wird die lokale Aktivität von Cofilin kontrolliert. Ein Verlust der PKD-Expression führt daher zu einer verringerten Phosphorylierung von Cofilin, einer ausgebreiteten Zellmorphologie und einer gesteigerten gerichteten Zellmigration in Abhängigkeit von SSH1L.

Darüber hinaus konnte für PKD eine Funktion bei der Regulation von LIMK2 gezeigt werden. PKD phosphoryliert LIMK2 *in vitro* und in intakten Zellen an Serin 289, was ebenfalls eine Bindung an 14-3-3 Proteinen zur Folge hat. Die Überexpression einer phosphorylierungsdefizienten LIMK2 S289A Variante führt im Vergleich zum wildtypischen Protein zu einem schwächeren Anstieg von phosphoryliertem Cofilin. In Migrationsstudien führte eine Überexpression von LIMK2 zu einer reduzierten Zellmigration während die Überexpression von LIMK2 S289A zu einer gesteigerten Zellmigration im Vergleich zu den Kontrollzellen führte. Diese Ergebnisse lassen auf eine aktivierende Wirkung der Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289 schließen. In dieser Arbeit wurde damit eine duale Funktion von PKD in der Cofilin-abhängigen Zellmigration aufgedeckt: PKD kontrolliert Cofilin-Aktivität über eine negative beziehungsweise positive Regulation von SSH1L und LIMK2.

Summary

The understanding of metastasis is one of the main challenges in cancer therapy. Therefore the research on signal transduction pathways, which mediate remodelling of the actin cytoskeleton during cell migration and invasion, is needed. In this work it was possible to identify the role of protein kinase D (PKD) in actin remodelling and cell migration. It is evident from previous studies that PKD negatively regulates cell migration, most likely by regulation of the actin polymerization machinery. However, downstream targets still had to be discovered. During these studies, PKD could be identified as a direct upstream kinase of the cofilin phosphatase slingshot 1 like (SSH1L). Cofilin nucleates actin polymerization by severing actin filaments to generate free barbed ends and also increases the rate of actin depolymerization, thus maintaining a pool of actin monomers. It is therefore evident, that cofilin is a key regulator of actin dynamics. Cofilin activity depends on its phosphorylation state: phosphorylation by the LIM kinase (LIMK) family at serine 3 turns off the actin–binding activity of cofilin and thus leads to inactivation. Accordingly, dephosphorylation by the SSH as well as chronophin phosphatases results in reactivation of the actin binding activity of cofilin. PKD-mediated phosphorylation of serines 937 and 978 regulates SSH1L subcellular localization by binding of 14-3-3 proteins and thus impacts on the control of local cofilin activation and actin remodeling during cell migration. In line with this, the loss of PKD decreases cofilin phosphorylation, induces a more spread cell morphology and stimulates chemotactic migration of breast cancer cells in a SSHL1-dependent fashion. Furthermore, it could be demonstrated that the cofilin kinase LIMK2 is a novel PKD substrate *in vitro* and *in vivo*. PKD-mediated phosphorylation of serine 289 mediates binding of 14-3-3 proteins to LIMK2. Expression of a phosphorylation deficient LIMK2 S289A mutant increased cell migration and reduced the level of phosphorylated cofilin compared to the wild type LIMK2 protein. Thus, PKD-mediated phosphorylation of serine 289 most likely has a positive impact on LIMK2 activity. Finally, to further characterize the phosphorylation of serine 289 in LIMK2 a phospho-specific antibody was generated. Taken together, these results identify PKD as a central regulator of the cofilin signaling network and thus directed cell migration by negative and positive regulation of SSH1L and LIMK2, respectively.

1. Einleitung

Krebserkrankungen zählen in Deutschland zu den zweithäufigsten Todesursachen. Die Zahl der Krebspatienten wird im Jahr 2010 auf 1,45 Mio. allein in Deutschland geschätzt. Die Bildung von Metastasen ist dabei die häufigste Todesursache bei Krebserkrankungen jeglicher Art. Um die Ursachen und Prozesse der Metastasenbildung genauer zu verstehen, sind Kenntnisse über die Signalwege, die die Tumorzellmigration regulieren, notwendig.

1.1 Bedeutung der Zellmigration für die Tumorentstehung und Metastasierung

Der Ausbildung von Metastasen liegt eine Wanderung von Tumorzellen aus einem primären Tumor in ein entferntes Organ zu Grunde (Chambers *et al.,* 2002). Dieser Prozess ist eine Hauptursache für den Tod vieler Krebspatienten. Jedoch sind die für die Regulation verantwortlichen Prozesse häufig noch ungeklärt. Verantwortlich für die Ausbildung von Metastasen sind Prozesse der Zellmigration und -invasion (Friedl *et al.,* 2003). Invasive Tumorzellen benötigen die Expression sämtlicher für die Migration und somit der Steuerung des Aktinzytoskeletts relevanten Gene (Wang *et al.,* 2004). Deshalb können Signalwege und Moleküle, die an der Migration der Zellen beteiligt sind, sinnvolle Ziele für Medikamente zur Verhinderung der Metastasenbildung sein.

Bei der Invasion nehmen Tumorzellen chemische Signale aus der Umgebung auf und wandeln diese in einen migrierenden / invasiven Phänotyp um. Dabei lösen sich die Zellen aus dem Verbund, bauen die umgebende „extrazelluläre Matrix“ (ECM) ab und wandern anschließend in Blutgefäße ein, in denen sie chemischen Stimuli folgend, ihre Migration zu anderen Organen fortsetzen (Wang *et al.,* 2005). Die Migration einer einzelnen Zelle erfordert die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, was eine Folge der epithelialen zu mesenchymalen Transition (EMT) ist (Thiery *et al.,* 2002). Sind einzelne Tumorzellen im umgebenden Stroma angelangt, sind sie auf Grund ihrer invasiven Fähigkeit in der Lage die Wände von Blutgefäßen zu durchdringen und können somit in die Blutbahn (Intravasation) und durch den Blutstrom in andere Organe gelangen. Hier treten sie erneut durch die Wände der Kapillare und bilden im umgebenden Gewebe einen neuen Tumor (Extravasation). Während des Prozesses der Migration und Invasion unterliegt das Aktinzytoskelett einer ständigen Umordnung. Diese Prozesse werden über chemische Stimuli gesteuert, welche von der Tumorzelle über membranständige Rezeptoren aufgenommen und in das Innere der Zelle weitergeleitet werden. Die Signaltransduktion wird durch kleine GTPasen (z.B. Rho, Rac, Cdc42 gesteuert, die aktinbindende Proteine wie WASp, Formine oder den Arp2/3-Komplex aktivieren (Wang *et al.,* 2007). Im Folgenden soll neben der molekularen Steuerung der Zellmigration ebenso die Beteiligung der Proteinkinase D (PKD) in diesem Zusammenhang genauer erläutert werden.

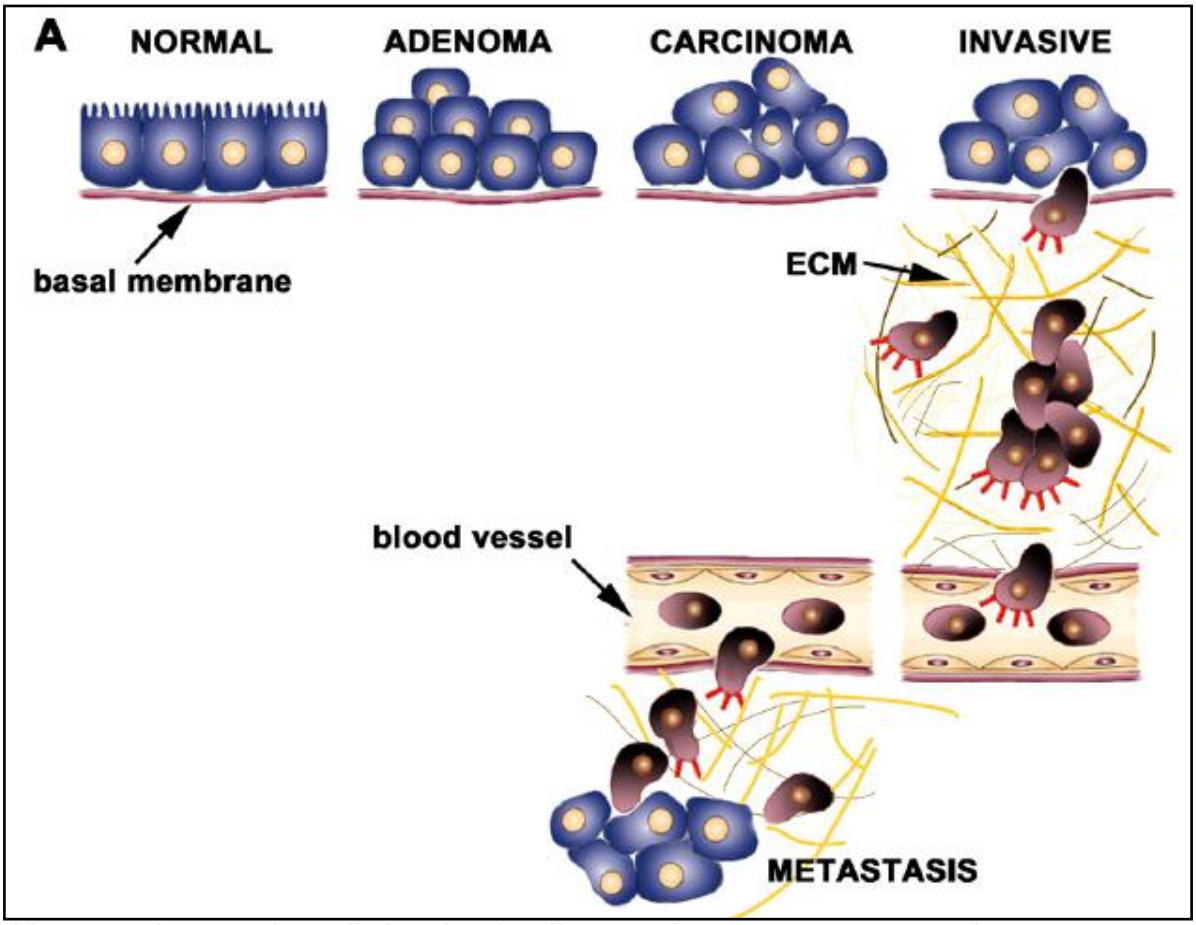

Abb. 1.1 Bedeutung der Zellmigration für die Entstehung von Tumoren und Metastasen. Das Aktinzytoskelett und seine regulatorischen Proteine spielen eine fundamentale Rolle im Prozess der Krebsentstehung. Hierbei sind im Besonderen morphologische Veränderungen, der Abbau der Basallamina und der „extrazellulären Matrix“ (ECM), die Migration einzelner oder geclusterter Zellen sowie der Prozess der Intravasation/Extravasation zu nennen (Vignievic und Montagnac, 2008)

1.2 Die Rolle des Aktinzytoskeletts in der Zellmigration

Die Mobilität von Zellen wird durch das Aktinzytoskelett gesteuert. Dabei handelt es sich um einen dynamischen Auf- und Abbau von langen Aktinfilamenten (F-Aktin) aus globulären Untereinheiten (G-Aktin) (Pollard & Borisy, 2003). Die Regulation erfolgt u.a. über chemische Stimuli, die zu einer Umorganisation des Aktinzytoskeletts führen können (Condeelis *et al.,* 2001).

1.2.1 Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten

Der Hauptbestandteil des Aktinzytoskeletts - das Aktin - besteht aus ca. 43 kDa großen Untereinheiten (G-Aktin), die sich bei der Aktinpolymerisation zu langen Aktinfilamenten (F-Aktin) zusammenlagern. Die Geschwindigkeit mit welcher ein Aktinmonomer an ein Filament bindet wird mit k_{on} bezeichnet, die Geschwindigkeit mit der es vom Filament dissoziiert mit k_{off} (Lee & Dominguez, 2010). Aktinfilamente hydrolysieren ATP, das an die globulären Aktinmonomere gebunden ist. Die Filamente bestehen somit aus ADP- und ATP-haltigen Untereinheiten (Pollard *et al.,* 2000). ATP-haltige Untereinheiten werden bevorzugt

am wachsenden Ende des Filaments (*„barbed end“* + *Ende*) eingebaut (Pollard & Cooper, 2009). Der Aufbau eines Aktinfilament ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Die Dissoziationskonstante K_D von zwei Aktinfilamenten ist sehr hoch, so dass eine *de novo* Entstehung von neuen Aktinfilamenten sogenannte „Aktin-Nukleatoren“ benötigt. Beispiele hierfür sind Formine oder WASp (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein). Das Formin mDia (Goode *et al.,* 2007; Schönichen und Geyer*,* 2010) komplexiert zwei Aktin-Monomere, schützt diese vor Dissoziation und stabilisiert somit das entstehende Filament. Die so genannten *„barbed ends“* haben eine höhere Affinität für G-Aktin und wachsen dementsprechend schneller. WASp-Proteine komplexieren ebenfalls monomeres Aktin durch dessen Bindung mittels einer WH2-Domäne (WASp Homologie Domäne) (Paunola *et al.,* 2002). Die Aktivierung von WASp erfolgt durch GTPasen wie Rac oder Cdc42 über eine GTPase-Bindungsdomäne (Rohatgi *et al.,* 2000).

Die – Enden oder *pointed ends* eines Aktinfilaments bestehen aus ADP-geladenen Untereinheiten und depolymerisieren langsamer. Das Schneiden der Filamente durch den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin führt zu einer erhöhten Anzahl an *barbed* und *pointed ends.* Dies führt zu einem schnellen Anstieg der Aktinpolymerisation und zur Ausbildung neuer Filamente soweit Aktinmonomere vorhanden sind. Die Vernetzungen der Filamente werden durch den Arp2/3-Komplex, der aus sieben Proteinen gebildet wird, vermittelt. Arp2/3 kann durch WASp aktiviert werden und bindet an vorhandene Aktinfilamente. Auf diese Weise bildet er die Basis für die Entstehung eines Tochterfilaments als Zweig des Mutterfilaments (Pollard*,* 2002). Aktivierte Apr2/3-Komplexe binden bevorzugt an Filamente, die gerade neu aus mit ATP beladenem G-Aktin entstanden sind. Hierdurch wird auf die Zellmembran ein Druck induziert, der die Zelle z.B. in Richtung eines chemischen Stimulus vorwärts schiebt.

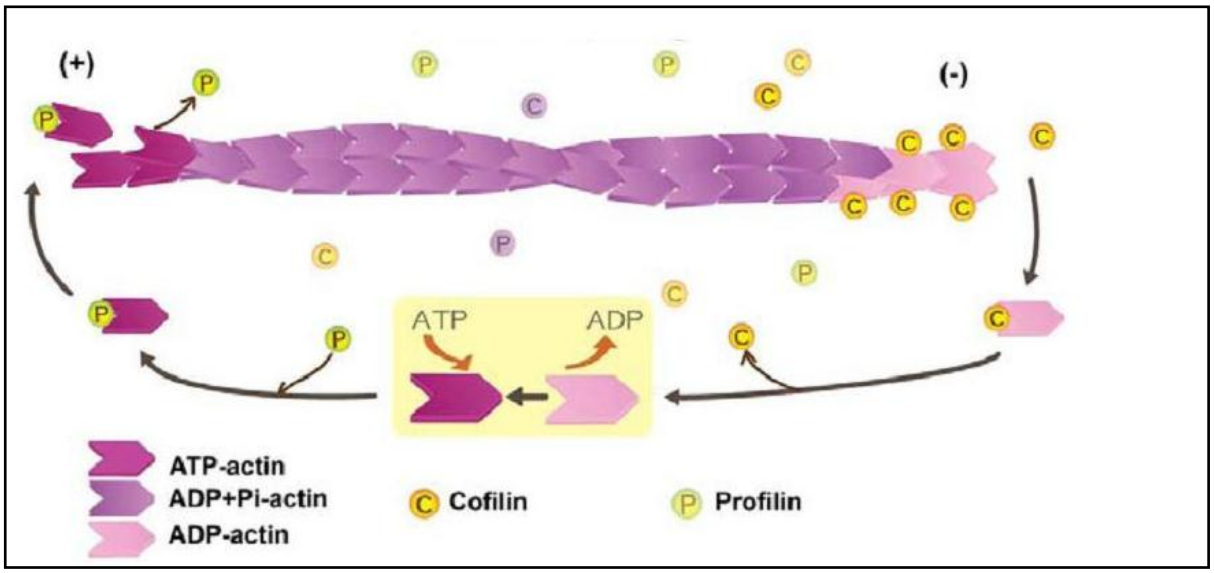

Abb. 1.2 Polymerisation und Depolymerisation eines Aktinfilaments. Das doppel-helikale Aktinfilament zeigt einen asymmetrischen Aufbau. Dies führt zum so genannten „a*ctinthreadmilling“*. Das „*barbed end“*, auch + Ende, baut neue ATP-gebundene Monomere ein. Das – Ende (*pointed end*) weist eine hohe Instabilität auf und enthält ADP-gebundene Untereinheiten. Aktinbindende Proteine wie Cofilin fördern die Dissoziation von Aktinmonomeren vom – Ende (Lee & Dominguez, 2010).

1.2.2 Zelluläre Aktinstrukturen

Invasive Tumorzellen bilden verschiedene Formen von Aktinstrukturen aus. Man unterscheidet Lamellipodien, Filopodien und Invadopodien. Lamellipodien sind blattähnliche Strukturen, die aus einem engmaschigen, dynamischen Netz von quervernetzten Aktinfilamenten bestehen. Sie befinden sich am sogenannten *„leading edge“* der Zelle. Zur Ausbildung von Lamellipodien ist eine hohe und regulierte Cofilinaktivität unabdingbar. Quervernetzungen werden durch den Arp2/3-Komplex ausgebildet. Durch die Aktinfilamente wird eine Kraft auf die Zellmembran ausgeübt und die Zelle dadurch vorwärts geschoben. Die Vorwärtsbewegung der Zelle impliziert ein ständiges Bilden und Lösen von Integrin vermittelten Kontakten zwischen Zelle und Substrat. Die Breite eines Lamellipodiums beträgt ca. 1 - 5 µm (Wang *et al.,* 2007).

Bei Filopodien handelt es sich um fingerförmige zytoplasmatische Strukturen, die sich vom *„leading edge“* der Zelle ausbilden. Sie bestehen zu einem sehr hohen Anteil aus quervernetzten Aktinbündeln. Die Bündelung der Aktinfilamente wird durch aktinbindende Proteine induziert, wie beispielsweise Fimbrin oder Gelsolin (Wang *et al.,* 2007).

Invadopodien sind besonders für invasive Tumorzellen charakteristisch und enthalten einen Kern von Aktinfilamenten. Sie werden von der Tumorzelle in die extrazelluläre Matrix hinein ausgeformt (Ayala *et al.,* 2008; Wang *et al.,* 2007). Charakteristisch ist das Vorhandensein von Cortaktin und WASp, zwei aktinbindenden Proteinen, die auch als Invadopodienmarker gelten (siehe Abb. 3 und Clark *et al.,* 2007). Ferner sezernieren Invadopodien Metalloproteasen, die die umgebende extrazelluläre Matrix abbauen können (Yamaguchi & Condeelis, 2007). Dies führt zu einem invasiven Verhalten der Zelle, die somit in

umliegendes Gewebe und Blutbahn eindringen und von dort entlang eines chemischen Gradienten zu anderen Organen wandern kann.

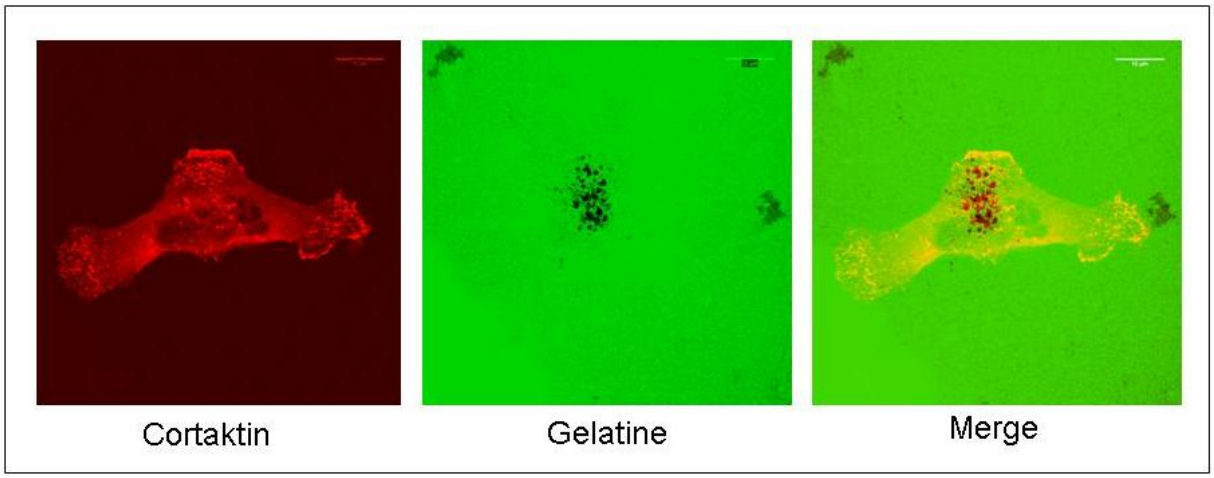

Abb. 1.3 Nachweis von Invadopodien in MDA-MB-231 Zellen durch Matrixdegradation. MDA-MB-231 Zellen wurden für 3 h auf einer FITC-gekoppelten Gelatinematrix ausgesät, fixiert, permeabilisiert und der Invadopodienmarker Cortaktin mittels indirekter Immunfluoreszenz (Alexa546 gekoppelter Antikörper) nachgewiesen. Die Ausbildung von Invadopodien ist durch Degradationsspuren in der Gelatine, die mit den Signalen für Cortaktin überlagern, ersichtlich. (Peterburs, unveröffentlicht).

1.3 Die Rolle von Cofilin in der Zellmigration

Cofilin gehört zur Familie der Aktin-depolymerisierenden Faktoren (ADF). Es handelt sich um ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 19 kDa, das in der Lage ist sowohl G-Aktin als auch F-Aktin zu binden. Mittels NMR-Studien konnte die 3D-Struktur des Proteins geklärt und die für F- und G-Aktin-Interaktionen wichtigen Domänen lokalisiert werden (Pope *et al.,* 2004). Die ADF / Cofilin Familie besteht aus den drei Mitgliedern Cofilin 1 und 2 sowie ADF. Cofilin 1 wird in Nichtmuskelgewebe exprimiert, die Isoform 2 ist dagegen ausschließlich in Muskelgewebe zu finden (Bernstein & Bamburg, 2009). Im Gegensatz zu ADF wird Cofilin von Src an Tyr68 phosphoryliert, was zu dessen Ubiquitinierung und Degradierung führt (Yoo *et al.,* 2009). Sowohl Aktin als auch Cofilin werden an Serin 3 phosphoryliert und dadurch deaktiviert. Die genaue Regulation von ADF ist jedoch noch nicht bekannt (Bernstein & Bamburg, 2009). Cofilin ist sowohl in der Lage die Anzahl neuer *barbed end*s zu erhöhen als auch die Depolymerisation von Aktin zu fördern und somit den Vorrat an Aktinmonomeren wieder aufzufüllen (Hotulainen *et al.,* 2005; Ichetovkin *et al.,* 2000; Ichetovkin *et al.,* 2002; Andrianantoandro *et al.,* 2006).

In Brustkarzinomzellen konnte eine Aktivität von Cofilin bereits 60 Sekunden nach der Stimulation mit den Wachstumsfaktor EGF beobachtet werden, wodurch neue *barbed ends* generiert werden (Yamaguchi *et al.,* 2005; Song *et al.,* 2006). Dieser schnelle Anstieg von neuen *barbed ends* ist ein Resultat der schnellen Aktivierung von Cofilin und kann *in vivo* direkt mit dem invasiven und metastatischen Verhalten der Tumorzellen korreliert werden

(Wang *et al.,* 2007; Wang *et al.,* 2006). In invasiven Brustkarzinomzellen ist die kurzzeitige Aktivierung und Inhibition von Cofilin besonders exakt reguliert (Nishita *et al.,* 2005; Sidani *et al.,* 2007). Für die Ausbildung von Lamellipodien muss die Aktivierung von Cofilin zudem lokal reguliert werden (Mouneimne *et al.,* 2004; Mouneimne *et al.,* 2006). Eine zu starke oder zu geringe Aktivität von Cofilin kann die Entstehung von Membranausstülpungen beeinträchtigen. Weiterhin ist eine räumliche Lokalisation der Cofilinaktivierung als zelluläre Antwort auf einen Stimulus durch EGF für eine optimale gerichtete Zellmigration und Chemotaxis von Brustkarzinomzellen notwendig. Diese Prozesse sind bei der Ausbildung von Metastasen von entscheidender Bedeutung (Mouneimne *et al.,* 2006). In Brustkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Cofilin im nichtaktiven Zustand an Phosphatidyl-Insositol-3,5-Bisphosphat (PIP_2) gebunden ist und sich an der Plasmamembran der Zelle befindet. Hierfür verfügt Cofilin über eine entsprechende Bindungsdomäne. Eine Stimulation der Zelle mit EGF führt zu dessen Freisetzung ins Zytosol (van Rheenen *et al.,* 2007). Darüber hinaus ist die Aktivierung von Cofilin ebenfalls pH-abhängig. Eine Verringerung des pH-Wertes in der Zelle führt zu einer strukturellen Veränderung in der Aktinbindungstasche von Cofilin, was eine verringerte PIP_2 Bindungskapazität zur Folge hat (Frantz *et al.,* 2007; Bernstein & Bamburg *et al.,* 2009). Darüber hinaus wird Cofilin durch posttranslationale Modifikation reguliert. Die Inhibierung von Cofilin erfolgt über dessen Phosphorylierung an Serin 3 durch LIMK1 und 2 sowie TESK1 und 2 (Nishita *et al.,* 2005; Rosok *et al.,* 1999). Die Dephosphorylierung von Cofilin erfolgt durch die Phosphatasen der Slingshot (SSH) Familie sowie Chronophin (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004; Niwa *et al.,* 2002).

In Abbildung 1.4 ist der Cofilin-Signalweg zusammengefasst. Dargestellt ist die Regulation von Cofilin durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung und die Auswirkungen auf die Aktinpolymerisation (Wang *et al.,* 2007). Nicht gezeigt ist dagegen der Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivierung von Cofilin.

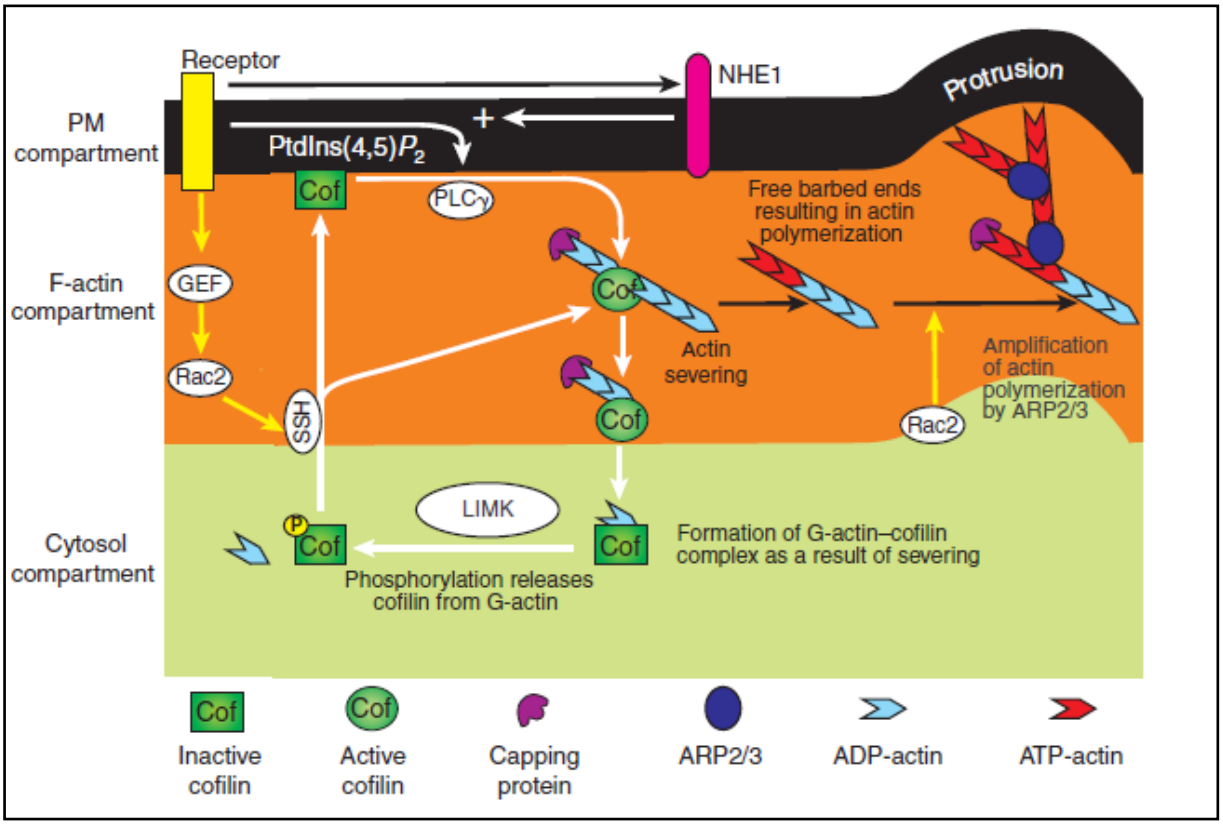

Abb. 1.4 Die Rezeptor vermittelte, räumliche und zeitliche Lokalisation von aktiviertem Cofilin. *In vivo* Studien in Tumorzellen konnten zeigen, dass nach einem Stimulus Phospholipase Cγ (PLCγ) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) hydrolysiert und zu einer Freisetzung von Cofilin von der Plasmamembran, wo es im nichtaktivierten Zustand an PIP_2 gebunden vorliegt, führt. Dies führt zu einer asymmetrischen Aktivierung von Cofilin in der Tumorzelle und zur Generierung neuer *barbed ends* in Richtung der Zellmembran und des chemischen Stimulus wie z.B. EGF oder Heregulin. Die simultane Aktivierung von Cofilin-Aktivatoren wie PLCγ, SSH und Cronophin, resultiert in der beschriebenen kurzzeitigen Aktivierung von Cofilin und einer Inhibition der LIM-Kinase. Diese ist für die Phosphorylierung und von Cofilin an Serin 3 und somit für dessen Inaktivierung verantwortlich. Sie wird bei der Aktivierung von Cofilin durch den Rezeptor vermittelten Signalweg inhibiert. Cofilin beginnt somit lokal bestehende Aktinfilamente zu trennen, wodurch Aktinpolymerisation und die Ausbildung neuer Filamente und Quervernetzungen induziert werden. Durch die gezielte Inaktivierung von Cofilin durch die LIM-Kinase wird die Regulation von Cofilin lokal kontrolliert (aus van Rheenen *et al.,* 2009).

1.4 LIM-Kinasen

Die Familie der LIM-Kinasen besteht aus den Isoformen 1 und 2 und gehört zu den Serinkinasen (Stanyon & Bernard, 1999). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie regulieren die Aktinpolymerisation durch Phosphorylierung von Cofilin. LIM-Kinase 1 und 2 weisen eine Homologie von 50% auf, in der Kinasedomäne sogar 70% (Mizuno *et al.,* 1994; Nonoue *et al.,* 1995). Direkt am N-Terminus befinden sich zwei LIM-Domänen, die je ein doppeltes Zinkfingermotiv enthalten (Smolich *et al.,* 1997). Es folgt eine PDZ-Domäne, eine Prolin-/Serinreiche Region sowie eine carboxyterminale Kinasedomäne, die auch eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) enthält (siehe Abb. 1.5).

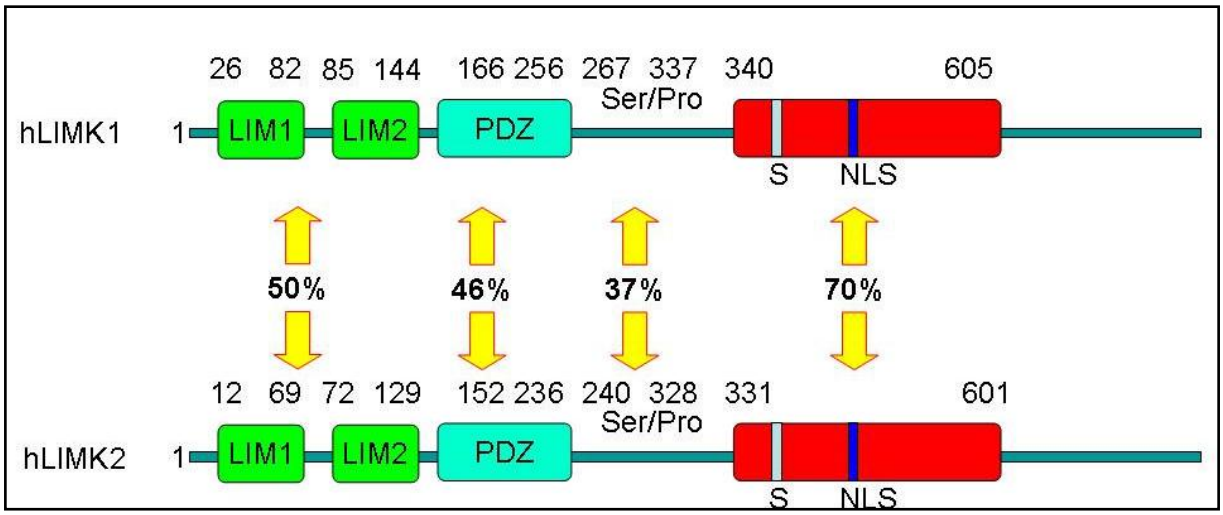

Abb. 1.5 Domänenstruktur und Homologien zwischen LIMK1 und 2. LIMK1 und 2 weisen eine Homologie von 50% auf. Beide bestehen aus zwei N-terminalen LIM-Domänen, gefolgt von einer PDZ-Domäne und einer Prolin-/Serinreichen Region. Im C-terminalen Bereich befindet sich die Kinasedomäne, die eine Homologie von 70% aufweist (verändert nach Scott & Olson, 2007).

Ähnlich wie bei anderen Kinasen führt eine Phosphorylierung in der Aktivierungsregion zu einer verstärkten Aktivität. Hierzu wird die LIMK1 an Threonin 508, die LIMK2 an Threonin 505 phosphoryliert (Bernard, 2007). Im aktivierten Zustand phosphorylieren beide Isoformen das gemeinsame Substrat Cofilin, was zu dessen Inhibition führt. Diverse Stimuli wie TGF, VEGF oder BMP sind in der Lage die Phosphorylierung von LIMK1 und 2 zu induzieren. An der Weiterleitung des entsprechenden Signals sind kleine GTPasen wie Rho, Rac oder Cdc42 beteiligt, die die Regulatoren der LIMK1 und 2 spezifisch aktivieren (Bernard, 2007; Foletta *et al.,* 2003, Vardouli *et al.,* 2005). Die Phosphorylierung erfolgt durch unterschiedliche Kinasen wie ROCK und PAK1 und 4 (Edwards *et al.,* 1999; Maekawa *et al.,* 1999; Rosok *et al.,* 1999; Dan *et al.,* 2001; Kobayashi *et al.,* 2006) sowie der MAPKAP2 Kinase. ROCK ist in der Lage beide Isoformen gleichermaßen zu aktivieren. LIMK1 kann darüber hinaus unabhängig von Threonin 508 durch die MAPKAP2 Kinase an Serin 323 phosphoryliert und aktiviert werden. Dieser Aktivierung der LIMK1 ist bei der VEGF- (*vascular endothelial growth factor*) vermittelten Aktinpolymerisation von Bedeutung (Kobayashi *et al.,* 2006).

Eine Translokation der LIM-Kinasen in den Zellkern ist ebenfalls möglich. In beiden Isoformen befindet sich in der serinreichen Region zwischen PDZ- und Kinasedomäne eine „nukleäre Lokalisationssequenz“, eine zweite ist innerhalb der Kinasedomäne der LIMK2 zu finden (Goyal *et al.,* 2006). Die Phosphorylierung der LIMK2 an Serin 283 durch PKCδ führt zu einer Inhibition des Imports der Kinase in den Zellkern (Goyal *et al.,* 2005). Ferner kann die Kernlokalisation der LIMK1 auch durch Bindung an den Inhibitor der Cyklin-abhängigen Kinasen (CDK) $p57^{KIP2}$ beeinflusst werden. Dabei interagiert $p57^{KIP2}$ mit den LIM-Domänen der LIM-Kinase 1 (Yokoo *et al.,* 2003). Die beiden LIM-Domänen sind von besonderer Wichtigkeit für die Regulation der Kinaseaktivität. Möglicherweise sind sie auch für Protein-

Protein-Interaktionen als auch für Protein-DNA-Interaktionen notwendig (Nagata *et al.,* 1999; Hiraoka *et al.,* 1996; Nishiya *et al.,* 1998). Ein direkter Einfluss der LIM-Kinasen auf die Genregulation oder die Bindung an DNA-Sequenzen konnte bisher allerdings nicht gezeigt werden. Dennoch können LIM-Kinasen möglicherweise indirekt einen Einfluss auf die Transkription nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass neben Cofilin auch die Transkriptionsfaktoren CREB und Nurr1 von der LIMK1 phosphoryliert werden (Yang *et al.,* 2004; Sacchetti *et al.,* 2006). In histologischen Untersuchungen bei Mäusen konnte weiterhin festgestellt werden, dass die zelluläre Lokalisation unterschiedlich, die gewebsspezifische Expression jedoch weitgehend identisch ist. LIMK2 wurde im Gegensatz zu LIMK1 punktuell im Zytoplasma, jedoch nie in *„focal adhesions“* beobachtet (Sumi *et al.,* 2006). Darüber hinaus sind Daten über eine mögliche Beteiligung beider LIM-Kinase Isoformen bei der Metastasenbildung bekannt. So konnte in einem Zebrafischmodell eine Funktion der LIMK1 und 2 bei der zellinduzierten Angiogenese festgestellt werden (Vlecken *et al.,* 2009).

1.5 Die Cofilinphosphatase Slingshot (SSH)

Die Familie der Slingshotphosphatasen besteht aus den Isoformen SSH1L, SSH2L und SSH3L (Niwa *et al.,* 2002; Ohta *et al.,* 2003). Alle Isoformen dephosphorylieren den Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin an Serin 3 und sind somit für seine Aktivierung verantwortlich. In Abbildung 1.6 ist die Domänenstruktur von SSH dargestellt. Das Protein umfasst vier hoch konservierte Regionen: die N-terminalen Phosphatasedomänen A, B und P sowie die serinreiche Domäne am N-Terminus. Für die Wirkung als Cofilinphosphatase scheinen hier die Domänen A und B von besonderer Bedeutung zu sein (Ohta *et al.,* 2003). Die Isoformen 1 und 2 weisen eine hohe Affinität zu F-Aktin auf, SSH3L dagegen kann kein F-Aktin binden. Für die Bindung an F-Aktin scheinen die C- und N-terminalen Regionen des Proteins von besonderer Bedeutung zu sein. Es konnte mittels Kosedimentationsversuchen gezeigt werden, dass ein Verlust dieser Regionen die Bindung von SSH1L an Aktin herabsetzte (Ohta *et al.,* 2003). Darüber hinaus ist bekannt, dass SSH1L neben seiner Fähigkeit Cofilin zu dephosphorylieren auch Aktinfilamente bündeln kann (Kurita *et al.,* 2007). Die Phosphataseaktivität ist in der Isoform 3 am geringsten (Ohta *et al.,* 2003). Durch Northern Blot-Versuche und *in situ*-Hybridisierungsexperimente konnte festgestellt werden, dass alle Isoformen in sämtlichen Gewebetypen von Mäusen zu finden sind. Die Expression der einzelnen Isoformen ist jedoch in jeder Gewebeart unterschiedlich: Isoform 1 ist in den meisten Gewebearten exprimiert und somit die ubiquitäre Form der Phosphatase. Die mRNA für Isoform 2 konnte vorwiegend in neuronalem Gewebe nachgewiesen werden. Isoform 3 konnte vorwiegend in epithelialen Geweben vorhanden.

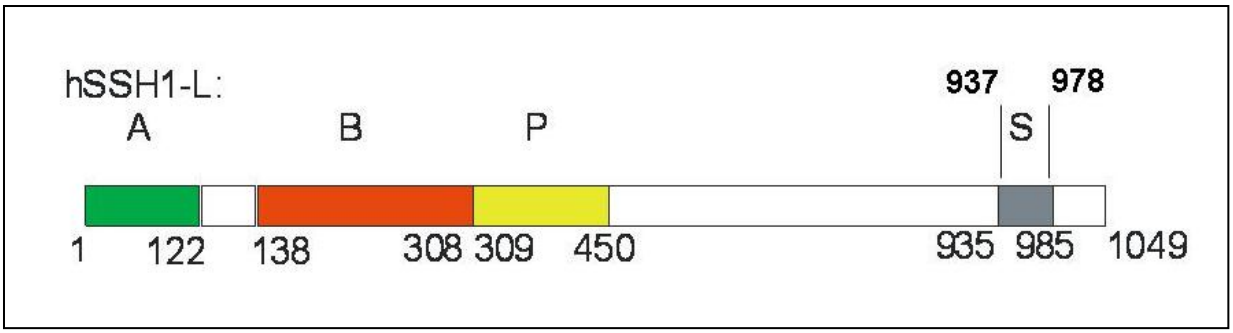

Abb. 1.6 Domänenstruktur der Cofilinphosphatase SSH1L (slingshot). Das Protein verfügt über drei konservierte Phosphatasedomänen, A, B und P sowie eine ebenfalls konservierte serinreiche Region S. Seine Funktion ist die Dephosphorylierung und somit Aktivierung von Cofilin. Die Regulation von SSH1L erfolgt durch Phosphorylierung der Serine 937 und 978, welche hervorgehoben sind. Unter phosphorylierten Bedingungen bindet SSH1L an 14-3-3 Adapterproteine.

Auch die Mitglieder der SSH-Familie unterliegen einer Regulation durch Phosphorylierung. Für alle drei Isoformen ist eine phosphorylierungsabhänge Bindung an 14-3-3 Adaptorproteine beschrieben worden (Kligys *et al.,* 2007; Kligys *et al.,* 2009; Nagata-Ohashi *et al.,* 2004; Ohta *et al.,* 2003). In SSH1L ist für diese Interaktion eine Phosphorylierung der Serine 937 und 978 notwendig (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). Dies führt zu einer Bindung von 14-3-3 Proteinen und somit zu einer Rekrutierung der Phosphatase in das Zytoplasma (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004; Kligys *et al.,* 2009). Die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase war jedoch nicht bekannt. Weiterhin konnte eine Aktivierung von SSH durch die reaktive Sauerstoffspezies H_2O_2 gezeigt werden (Kim *et al.,* 2009). In Keratinozyten kann SSH1L durch das Integrin *α4β6* in einem Rac-abhängigen Wegaktiviert werden. Bei der Stimulation durch Heregulin / Neuregulin wird die Aktivierung von SSH1L ebenfalls durch Rac1 induziert (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). SSH1L kann demnach durch unterschiedliche chemische Stimuli, wie Ca^{2+}, H_2O_2, Neuregulin/Heregulin, PDGF und Insulin aktiviert werden (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004; Nishita *et al.,* 2004; Kim *et al.,* 2009; Wang *et al.,* 2004). Neben der Aktivität als Cofilinphosphatase ist SSH1L auch für die Dephosphorylierung und Inaktivierung von LIMK1 verantwortlich (Soosairajah *et al.,* 2005). Abbildung 1.7 zeigt eine Übersicht der Regulation von Cofilin durch LIMK und SSH1L.

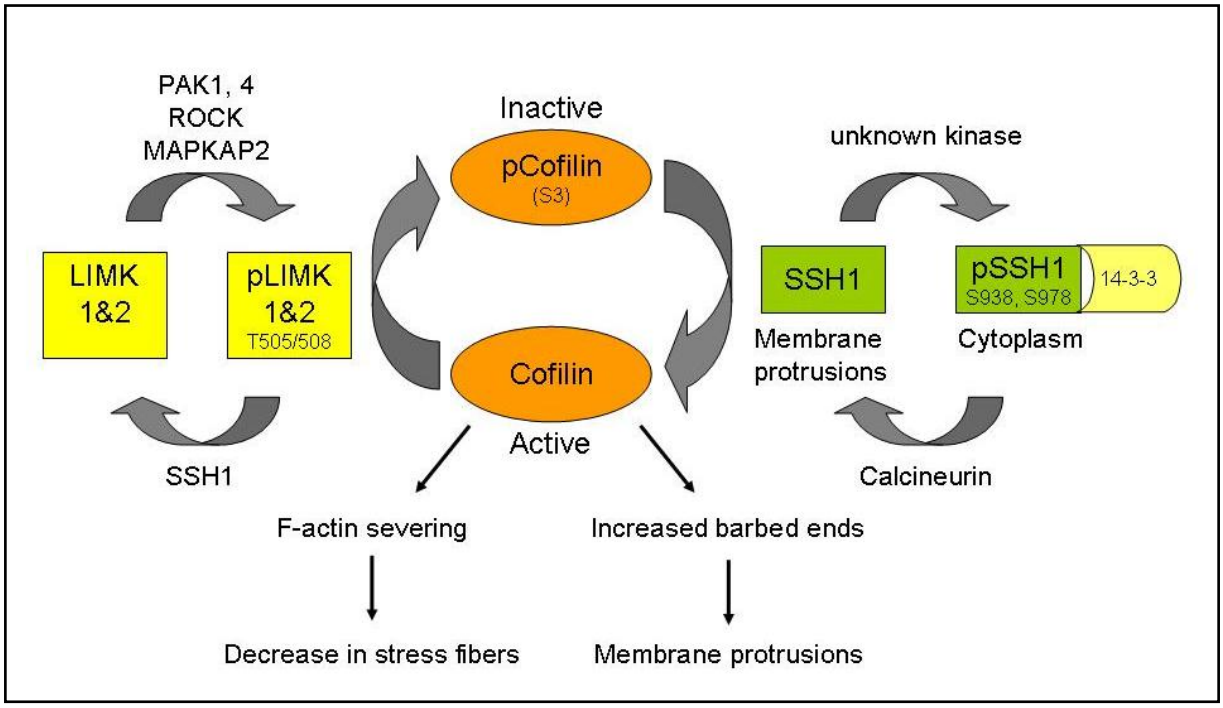

Abb. 1.7 Regulation von Cofilin durch die LIM-Kinase und SSH1. Die Phosphorylierung und somit Inaktivierung von Cofilin erfolgt durch die LIM-Kinase an Serin 3, die Aktivierung durch die Phosphatase SSH1L. Beide Regulatorproteine werden ebenfalls durch Phosphorylierung kontrolliert. Im Falle der LIMK1/2 erfolgt eine aktivierende Phosphorylierung durch PAK1 und 4 oder ROCK an Threonin 505 bzw. 508 oder der MAPKAP Kinase, die LIMK1 an Serin 323 phosphorylieren kann. Die Dephosphorylierung und somit Aktivierung von Cofilin erfolgt durch die Phosphatase SSH1L, welche durch eine unbekannte Kinase reguliert wird. Im phosphorylierten Zustand bindet sie an 14-3-3 Proteine und wird dadurch im Zytosol zurückgehalten.

1.6 Protein Kinase D

Die Mitglieder der Proteinkinase D– Familie gehören zur Klasse der Serin-Threoninkinasen. Es werden hier drei Isofomen unterschieden: PKD1 (auch PKCμ), PKD2 und PKD3 (auch PKCv), wobei PKD1 die bisher am meisten charakterisierte Isoform ist (Valverde *et al.,* 1994; Sturany *et al.,* 2001; Hayashi *et al.,* 1999). Mitglieder dieser Kinasefamilie sind eine Unterklasse der Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (Rozengurt *et al.,* 2005). PKD1 und 2 weisen im N-terminalen Bereich der regulatorischen Region eine apolare bzw. prolinreiche Region auf, die für die Bindung an Aktinfilamente verantwortlich sein kann (Eiseler *et al.,* 2007). Das Konsensusmotiv für Mitglieder der PKD weist eine hohe Sensitivität für Leucin in der -5 Position auf. Das PKD Konsensusmotiv kann demnach wie folgt beschrieben werden: LXR(Q/KEM)(M/L/K/E/Q/A)pSXXX (Nishikawa *et al.,* 1997; Doppler *et al.,* 2005), wobei Leucin durch Isoleucin oder Valin ersetzt werden kann.

Für die Aktivierung von PKD ist, bis auf wenige Ausnahmen, Diacylglycerol (DAG) ein wichtiger *„second messenger“* in der Zelle, notwendig (Newton *et al.,* 2001). DAG entsteht durch Lipidhydrolyse von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat [PtdIns(4,5)P_2] durch die Phospholipase C (PLC) in Folge der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR *„G-Protein coupled receptors“)* oder der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen. Am

Golgi-Komplex entsteht DAG bei der Sphingomyelinsynthese und ist für die Aktivierung von PKD essentiell (Baron & Malhotra, 2002). Die Bindung von DAG durch PKD erfolgt durch die in der regulatorischen Domäne enthaltene C1-Region, welche über zwei Zinkfingerdomänen verfügt. DAG induziert die Aktivierung von PKD durch nPKC-abhängige Phosphorylierung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nPKC direkt mit der PH-Domäne der PKD interagiert (Iglesias *et al.,* 1998), wodurch die sogennanten „activation loop“ Serine in PKD transphosphoryliert werden und zur Aktivierung führen (Waldron *et al*., 2003). Neben DAG kann die C1-Region auch Phorbolester binden (Phorbol 12,13-dibutyrat). Dies führt ebenfalls zu einer Aktivierung von PKD (Valverde *et al.,* 1994; Iglesias *et al.,* 1998; Auer *et al.,* 2005). In wenigen Ausnahmen kann die PKD-Aktivierung auch unabhängig von PKC erfolgen z.B. durch Phosphorylierung an Tyrosin 463 durch einen Src-Abl beteiligten Signalweg (Storz *et al.,* 2003). Des Weiteren konnten Murphy *et al.* eine PKC-unabhängige Aktivierung der PKD in Mastzellen nach Induktion diverser Wachstumsfaktoren beobachten (Murphy *et al.,* 2007). Sinnett-Smith *et al.* Konnten zeigen, dass PKD mitogene Signale mittels G_q-gekoppelter Rezeptoren PKD-unabhängig vermittelt (Sinnett-Smith *et al.,* 2009). Aktive PKD reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse wie z.B. Proteintransport, Differenzierung und Zellmigration (siehe Abb. 1.8).

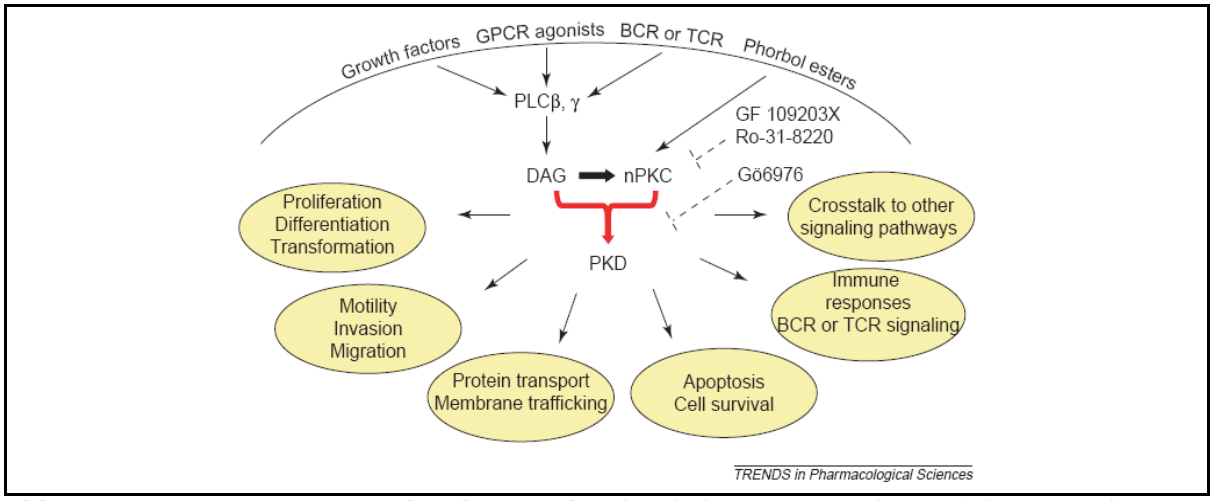

Abb. 1.8 Das DAG-PKC-PKD Signalnetzwerk. Die Bindung von Wachstumsfaktoren und GPCR-Antagonisten an die entsprechenden Rezeptoren sowie die Aktivierung von T- und B-Zellrezeptoren induziert eine Aktivierung der Phospholipase Cβ oder γ und führt somit zur sofortigen Produktion von DAG. Einerseits rekrutiert DAG nach Bindung an PKD diese zu unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle, anderseits führt DAG zur Aktivierung von Mitgliedern der PKC Familie. Diese sind in der Lage PKD zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Aktivierte PKD ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Phorbolester und pharmakologische DAG-Analoga können PKC ohne die Beteiligung von PLC aktivieren. GF 109203X und Ro-31-8220 sind breiteinsetzbare, nichtselektive PKC Inhibitoren. Gö6976, der vorzugsweise cPKC Isoformen inhibiert, ist gleichfalls ein potentieller PKD Inhibitor (aus Wang, 2006).

1.6.1 PKD und Zellmigration

1999 konnte durch Bowden und Mitarbeiter ein Zusammenhang zwischen dem Aktinzytoskelett und PKD beschrieben werden. PKD kolokalisierte mit dem Aktinzytoskelett in invasiven Strukturen von MDA-MB-231 Zellen. Hier konnten aktinbindende Proteine, wie das für die Ausbildung von Invadopodien verantwortliche Cortaktin und das *„focal-adhesion"*-Protein Paxillin zusammen mit PKD1 co-immunopräzipitiert werden (Bowden *et al.,* 1999), was auf eine Komplexbildung dieser Proteine zurückgeführt wurde. In nichtinvasiven Tumorzelllinien ist dieser Komplex nicht vorhanden. Jaggi *et al.* konnten zeigen, dass eine Inhibition von PKD durch Gö6976 zu einer Abnahme der Zell-Zell-Kontakte führte, wohingegen eine Überexpression von PKD1 zu einer gesteigerten Zellaggregation und somit zu einer verminderten Zellmotilität führte (Jaggi *et al.,* 2005). Dies konnte durch die Arbeiten von Tim Eiseler bestätigt werden: Eine Überexpression von PKD1 in Panc89 Zellen führte zu einer reduzierten Zellmigration. Die Überexpression der kinasetoten PKD1 hingegen verursachte eine signifikante Steigerung der Zellmigration (Eiseler *et al.,* 2007). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PKD1 und PKD2 in der Lage sind selektiv an F-Aktin zu binden (Eiseler *et al.,* 2007). Interessanterweise ist PKD1 für die Phosphorylierung und Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche verantwortlich und kolokalisiert mit dem Protein an Zell-Zell Kontakten (Jaggi *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass PKD1 über die Regulation des Transkriptionsfaktors β-Catenin die Zellmigration regulieren kann (Du *et al.,* 2009). Die Mutation beider für eine Phosphorylierung notwendigen Threonine von β-Catenin, führte zu einer verstärkten Kernlokalisation von β-Catenin und einer erhöhten Zellmigration. Darüber hinaus steigerte die Expression dieser Mutante ebenfalls die Invasivität der Zellen (Du *et al.,* 2009). Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten, beispielsweise durch Depletion von Ca^{2+}-Ionen, führt zu einer RhoA-vermittelten Neuorganisation des Aktinzytoskeletts. (Cowell *et al.,* 2009). In den durch Cowell und Mitarbeiter vorgestellten Daten wurde postuliert, dass durch RhoA ebenfalls Kinasen der Src-Familie sowie ROCK und nPKCs aktiviert werden. Die Aktivität dieser Kinasen führt zu einer Aktivierung von PKD1. PKD1 wiederum aktiviert den Transkriptionsfaktor NF-κB. Dieser reguliert sowohl die Expression von Genen für die Zelladhäsion, als auch für die Proliferation (Cowell *et al.,* 2009). Kürzlich konnte PKD als Teil der Arp2/3-Aktin Polymerisationsmaschinerie identifiziert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das aktinbindende Protein Cortaktin (Ren *et al.,* 2009) ebenfalls ein Substrat von PKD ist. Cortaktin interagiert in Lamellipodien mit dem Arp2/3-Komplex und WAVE2 und bildet auf diese Weise einen Komplex, der für die Aktin *de novo* Synthese von Bedeutung ist. Cortaktin wird von PKD an Serin 298 phosphoryliert, das sich in der sechsten aktinbindenden HS-1 Domäne befindet. Durch die Phosphorylierung des Serins 298 wird eine Bindung von Cortaktin an 14-3-3 Proteine induziert (Eiseler *et al.,* 2010). Phosphorylierungsdefizientes Cortaktin S298A konnte *in vitro* im Vergleich zum Wildtyp eine Zunahme der

Aktinpolymerisation induzieren. Cortaktin verbindet im nichtphosphorylierten Zustand den Arp2/3-Komplex und das Protein WAVE2 mit dem Aktinzytoskelett. Dadurch wird die Entstehung von neuen Aktin-Nukleationskomplexen begünstigt, was zu dynamischen Aktinstrukturen und somit zu einer gesteigerten Bildung an Lamellipodien führt. Dieser Prozess wird durch die Phosphorylierung von Serin 289 und die Bindung von 14-3-3 Proteinen negativ reguliert. Diese Ergebnisse konnten mittels Heregulin stimulierter MCF7 Zellen *in vivo* bestätigt werden. Hier induzierte die Expression der Mutante Cortaktin S298A eine gesteigerte Ausbildung von Lamellipodien (Eiseler *et al.,* 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Kinase Src die Effekte von PKD auf Cortaktin verstärkt (de Kimpe *et al.,* 2009). PKD ist ebenfalls an der Regulation von invasiven Prozessen, insbesondere bei der Ausbildung von Invadopodien beteiligt. Hier reguliert PKD die Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMPs) (Eiseler *et al.,* 2009 a). Zusammengenommen zeigen diese bisherigen Ergebnisse eine fundamentale Bedeutung von PKD in der Zelladhäsion, -migration und -invasion.

1.7 Zielsetzung

PKD lokalisiert in aktinreichen Zellstrukturen wie Invadopodien und Lamellipodien, interagiert dort direkt mit F-Aktin und reguliert die gerichtete Zellmigration negativ (Eiseler *et al.,* 2007). Substrate und Signalwege, über die PKD die Zellmigration beeinflusst waren zu Beginn dieser Arbeit dagegen nur spärlich bekannt. Des Weiteren waren die funktionellen Studien zu PKD und Zellmigration überwiegend mit Zellen durchgeführt worden, in denen die Kinase überexprimiert war. Zuerst sollte daher ein Zellsystem identifiziert werden, in dem mittels siRNA-vermittelter Depletion von PKD die Funktion der endogenen Kinase in der Zellmigration studiert werden konnte. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob PKD an der Regulation des Cofilin-Signalweges beteiligt ist. Auf Grund vorhandener PKD-Konsensusmotive in der Cofilinphosphatase SSH1L war ein Ziel aufzuklären, ob PKD SSH1L direkt phosphoryliert und damit dessen zelluläre Aktivität regulieren kann. Darüber hinaus sollte außerdem analysiert werden, ob und wie PKD in die Regulation der LIM-Kinasen involviert ist. Hierfür sollten potentielle PKD-Konsensusmotive in den beiden LIMK-Isoformen überprüft und auf Funktionalität getestet werden.

2. Materialien

2.1 Reagenzienliste

Alle hier nicht aufgeführten Reagenzien und Lösungen werden gesondert bei der Vorstellung der einzelnen Methoden aufgeführt.

β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid, RotiphoreseGel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose, low Eeo	Applichem GmbH, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BCIP	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BSA	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Coomassie-G250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMF	Merck, Darmstadt
DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EGTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Epoxy-aktivierte Sepharose 6B	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway (USA)
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanolamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
FCS	PAA Laboratories, Linz (Österreich)
Fluormount® G	Bizol, Eiching
[γ^{32}P]-ATP	GE Healthcare, Braunschweig
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, Braunschweig
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gylcin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
H_3PO_4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KH_2PO_4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$NaCO_3$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaF	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$NaHCO_3$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$NaH_2PO_4*H_2O$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Na_2HPO_4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$Na_2HPO_4*H_2O$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$Na_2HPO_4*2H_2O$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Na-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

NBT	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$MgCl_2$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Oligofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
PFA	Elektron Microscopy Science, Fort Washington (USA)
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protein G-Agarose 4B	GE Healthcare, Braunschweig
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton-X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin / EDTA, 10x	PAA Laboratories, Pasching (Österreich)
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
DNAse I, RNase frei	Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
Pfu turbo Polymerase	Stratagene, Amsterdam (Niederlande)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.3 Puffer und Lösungen

AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM Mg_2Cl
10% APS-Lösung	10% (w/v) APS in H_2O
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml in DMF
Blockierungslösung für Immunhistochemie	5% (v/v) FCS in PBS
Blockierungslösung für Western Blot (10x)	Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
Blocking-Lösung	Ethanolamin: 1 M C_2H_7NO, pH 8
Blotting-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Coating (Couppling) Lösung	0,2 M $NaHCO_3$ 0,2 M $NaCO_3$ pH 10
Complete™ EDTA-frei Stocklösung	1 Tablette auf 2 ml ddH_2O

DNA-Probenpuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau 40% (w/v) Saccharose 50% (v/v) Glycerin
Lysispuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1% (v/v) Triton-X-100 / NP40 (IGPAL) 0,5% Complete™ EDTA-frei 20 mM β-Glycerolphosphat 10 mM NaF 1 mM Na-Orthovanadat
NBT-Stammlösung	100 mg/ml in 70% DMF
NBT / BCIP-Gebrauchslösung	33 µl NBT Stammlösung 33 µl BCIP Stammlösung 10 ml AP-Puffer
PBS, pH 7,2	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4
PBS, pH 3 (10x)	0,5 M $Na_2HPO_4*H_2O$ 0,5 M H_3PO_4 pH 3
PBS, pH 7 (10x)	a) 0,5 M $Na_2HPO_4*2H_2O$ pH 9 b) 0,5 M $NaH_2PO_4*H_2O$ pH 4,1 a) und b) im Verhältnis 3:1 mischen pH 7 mit 0,5 M $Na_2HPO_4*H_2O$ einstellen
PBS, pH11 (10x)	0,5 M $Na_2HPO_4*2H_2O$ 1 M NaOH Mit 1 M NaOH auf pH 11 einstellen
PFA-Fixierlösung	4% (w/v) PFA in PBS
Phosphorylierungspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 10 mM $MgCl_2$ 2 mM DTT (frisch hinzugegeben)
POD-Substrat für ECL	Lösung A: 100 mM Tris-HCl, pH 6,8 250 mg/ml Luminol Lösung B: 1,1 mg/ml para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Ponceau S	0,1% (w/v) Ponceau S 5% (v/v) Essigsäure

Probenpuffer (5x)	312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 25% (v/v) β-Mercaptoethanol 25% (v/v) Glycerol 10% (v/v) SDS 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Sammelgellösung	4% (v/v) Acrylamid 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1% (v/v) SDS 150 µl 10% APS 15 µl TEMED 3,4 ml ddH_2O
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% (v/v) SDS 0,7% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch hinzugegeben)
TBS	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,4
Trenngellösung	10% bzw. 12,5% (v/v) Acrylamid 375 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1% (v/v) SDS 50 µl 10% APS 8 µl TEMED ad 15 ml ddH_2O

2.4 Antikörper

2.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen-Anti-Cofilin polyklonal	WB: 1:1000	Cell Signaling, Frankfurt a.M.
Kaninchen-Anti-p-Cofilin polyklonal	WB: 1:1000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Maus-Anti-GFP monoklonal	WB: 1:2000 IP: 3 µl	Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
Maus-Anti-FLAG monoklonal	WB: 1:2000 IP: 3 µl	Sigma-Aldrich Deisenhofen
Maus-Anti-HA monoklonal	WB: 1:2000	Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)
Kaninchen-Anti-PKCµ (C20) polyklonal	WB: 1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (USA)
Kaninchen-Anti-PKD2 polyklonal	WB: 1:2000	Calbiochem, Bad Soden

Kaninchen-Anti-PKD3 polyklonal	WB: 1:2000	V. Malhotra (CRG, Barcelona; Spanien)
Maus-Anti-Tubulin monoklonal	WB: 1:2000	Thermo Scientific
Ziege-Anti-GST polyklonal	WB: 1:2000	Amersham Pharmacia
Kaninchen-Anti-LIMK1 polyklonal	WB: 1:2000	Cell Signaling Frankfurt a. M.
Kaninchen-Anti-LIMK2 polyklonal	WB: 1:2000	Santa Cruz, Santa Cruz, CA (USA)
Kaninchen-Anti-Phospho-(Ser289)-LIMK2 polyklonal	WB: 1:1000	Pineda, Berlin
Kaninchen-Anti-SSH1L polyklonal	WB: 1:2000	Abcam, Cambridge (Großbritannien)

2.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Maus-Anti-Ziege, AP-Konjugat	WB: 1:5000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Alexa488-Konjugat	IHC: 1:500	Molecular Probes, Göttingen
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Alexa546-Konjugat	IHC: 1:500	Molecular Probes, Göttingen
Ziege-Anti-Maus, POD-Konjugat	WB: 1:10000	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Kaninchen, POD-Konjugat	WB: 1:10000	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Kaninchen, AP-Konjugat	WB: 1:5000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.5 Vektoren, Konstrukte und Oligonukleotide

2.5.1 Vektoren und Plasmide

pEGFP-N1-PKD1 KD (K612W)	Hausser *et al.* 2002
pEGFP-N1-PKD1	Hausser *et al.* 2002
pEGFP-N1-PKD2 KD (K580W)	Hausser *et al.* 2005
pEGFP-N1-PKD2 S706/710E	G. Link
pCherry-N1-PKD2 KD (K580W)	P. Peterburs
pEGFP-N3-SSH1 S937/978A	K. Schlett
pEGFP-N3-SSH1	K. Schlett
pEGFP-Vektor	Clonetech, Palo (USA)

pCR3.V62-Met-FLAG-SSH1 S937/978A	K. Schlett
pCR3.V62-Met-FLAG-SSH1	K. Schlett
GST-LIMK2-DN	O. Bernard, Victoria (Australien)
FLAG-LIMK1-DN	O. Bernard, Victoria (Australien)
GFP-LIMK1	O. Bernard, Victoria (Australien)
HA-LIMK2	O. Bernard, Victoria (Australien)
HA-LIMK2 S289A	P. Peterburs
HA-LIMK2 S314A	P. Peterburs
pEGFP-N1-LIMK2 WT	P. Peterburs
pEGFP-N1-LIMK2 S289A	P. Peterburs
pGEX4T2-14-3-3β	J. Bergeron, Texas (USA)

2.5.2 Verwendete siRNAs

siRNA	Sequenz 5'- 3'
siLacZ	5'-gcggcugccggaauuuacctt-3'
siPKD1	5'-gucgagagaagaggucaaatt-3'
siPKD2#1	5'-gcaaagacugcaaguuuaatt-3'
siPKD2#2	5'-ggacaucaaugaccagauctt-3'
siSSH1L	5'-ucgucacccaagaaagauatt-3'

2.5.3 Verwendete Oligonukleotide

siRNA	Sequenz 5' - 3'
SSH1L 900-1043 for	ATTAAGCTTATGCCCCCTTTCTACCGCCTGGACCAC
SSH1L 900-1043 rev	GCAAAGCTTGGCTTTTGCTCATCCACGAAGG
SSH1L S937A for	CTGACCCGGAGTTCCGCCAGCGATAGCATCCAC
SSH1L S978A for	CTGAAGCGCTCACACGCTCTTGCCAAGCTGGGG
LIMK2 S289A for	CCTAAGGCGCAGTAACGCTATCTCCAAGTCCCC
LIMK2 S289A rev	CAGGGGACTTGGAGATAGCGTTACTGCGCCTTAGG
LIMK2 S314A for	CTCCTGAGCCGAGACATCGCTCGCTCAGAGTCCCTTCG
LIMK2 S314A rev	CGAAGGGACTCTGAGCGAGCGATGTCTCGGCTCAGGAG

2.6 Bakterienkultur

2.6.1 Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Herkunft
E.coli	DH5α	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

2.6.2 Komponenten und Lösungen

Ampicilin Stocklösung	100 mg/ml in ddH_2O
Kanamycin Stocklösung	30 mg/ml in ddH_2O
LB-Agar-Platten	15 g/l Agar Agar in LB-Medium 0,1% (v/v) Antibiotika Stocklösung
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl 0,1% (v/v) Antibiotika Stocklösung

2.7 Zellkultur

2.7.1 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Herkunft
COS7	Affe (Niere)	ATCC, Manassas (USA)
HEK293T	Mensch (Niere)	ATCC, Manassas (USA)
HeLa	Mensch (Cervix)	ATCC, Manassas (USA)
MCF7	Mensch (Brust)	Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart
MDA-MB-231	Mensch (Brust)	Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart

2.7.2 Komponenten und Lösungen

Einfriermedium	10% (v/v) FCS	HyClone®, Cranlington (Großbritannien)
	10% (v/v) DMSO	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	RPMI 1640	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
OPTIMEM		Gibco / Invitrogen, Karlsruhe

2.8 Verbrauchsmaterialien

2.8.1 Laborware

Bio-Trace™ Nitrocellulosememebran	PALL Gelman Laboratory, Dreieich
Deckgläschen 15 x 15 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
24 well Filtereinsätze 8µm Poren-Durchmesser (Kat. Nr.: 4244)	Corning, New York (USA)
Röntgenfilme	Fujifilm, Düsseldorf; Kodak, Stuttgart
Sterilin Boxen	Bibby Sterilin, Staffs (Großbritannien)
Sterilware	Greiner, Frickenhausen
Whatman Papier	Whatman international, Maidstone (Großbritannien)

2.8.2 Reagenziensysteme

AMAXA-Nukleofektionskit V	Lonza, Köln
First strand cDNA synthesis kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
FLAG-Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin Extract	Machery-Nagel, Düren
Nucleobond plasmid isolation	Machery-Nagel, Düren
Oligofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy Mini	Qiagen, Hilden
TransIT®293 Transfection	Mirus Corporation, Madison (USA)

2.8.3 Geräte

AMAXA-Nukleofektor	Lonza, Köln
Filmentwickler	Kodak, Stuttgart
Fluoreszenzmikroskop (Leica DM-IRB)	Leica Microsystems, Bensheim
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (Leica TCS SP2)	Leica Microsystems, Bensheim
Kühlzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler®	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Olympus CKX41	Tokyo, Japan
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Multifuge 3L_R	Kondro, Osteraden
Phosphoimager Storm 860	Molecular Dynamics, Krefeld
Zentrifuge	Beckmann (USA)

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR ermöglicht eine selektive Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Abschnitts. Dabei ist lediglich vorausgesetzt, dass die Enden des Abschnitts bekannt sind. Die Kenntnis dieser Sequenz ist notwendig, um kurze Oligonukleotide (Primer) zu konstruieren, die spezifisch mit diesen Sequenzen hybridisieren können. Gleichzeitig wird der Bereich der DNA-Synthese durch diese Primer begrenzt. Die einzelnen Schritte der PCR können in Denaturierung, Annealing und Elongation aufgeteilt werden. Für die Versuche wurde die thermostabile *Pfu* turbo Polymerase eingesetzt, bei der das Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Beispielansätze für die Amplifikation der Sequenz für *ssh1l 900-1043* sowie das Temperaturprofil der PCR sind in Tabelle 3.1 und 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.1 Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Volumen [µl]	Bestandteil
3	Matrizen DNA (100 ng/µl)
5	5'-Oligonukleotid (*sense*) (10 mM)
5	3'-Oligonukleotid (*antisense*) (10 mM)
1	*Pfu* turbo Polymerase 2 U/µl
5	dNTP-Mix (5 mM)
5	*Pfu*-Puffer 10x (Invitrogen, Karlsruhe)
37	ddH_2O

Tab. 3.2 Programm zur Amplifikation der Sequenz *ssh1l 900-1043.*

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
Denaturierung	97	30''	
Denaturierung	97	30''	25 Zyklen
Annealing	55	30''	
Elongation	72	30''	
	72	10'	

3.1.2 Reverse Transkriptase - PCR (RT- PCR)

Für den qualitativen Vergleich der Expression der mRNA für die PKD Isoformen in HEK293T, A375 und MDA-MB-231 Zellen wurde aus jeweils 1,5 x 10^6 Zellen unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) die gesamte RNA isoliert. Durch die Behandlung der Proben mit DNase I (Roche Diagnostics, Basel (Schweiz)) und einer Phenol-Chloroformextraktion wurden Verunreinigungen durch genomische DNA entfernt. In einem weiteren Schritt wurde eine cDNA Synthese durchgeführt. Hierfür wurden 10 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 20 µl unter Verwendung des „First strand cDNA synthesis kit“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Für den Versuch wurde unverdünnte cDNA sowie cDNA im Verhältnis 1:5 und 1:25 eingesetzt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels 1% Agarosegelelektrophorese unter Verwendung des 1kb DNA-Ladders (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Zusammensetzung eines Ansatzes sowie das eingesetzte PCR-Programm der RT-PCR sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 dargestellt.

Tab. 3.3 Zusammensetzung eines Ansatzes für eine RT-PCR.

Volumen [µl]	Bestandteil
18,8	ddH_2O
2,5	dNTP (10 mM)
2,5	Puffer (10x)
1	Primer for (10 µM)
1	Primer rev (10 µM)
1	cDNA
0,2	*Taq*-Polymerase

Tab. 3.4 PCR-Programm für eine RT-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
Denaturierung	92	1’	
Denaturierung	92	30’’	30 Zyklen
Annealing	55 / 60*	1’	
Elongation	72	1’	
	72	10’	

*55°C: PKD2 60°C:PKD1 und 3

Die für die unterschiedlichen RT-PCRs eingesetzten Primer sowie ihre spezifischen Sequenzen sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tab. 3.5 Verwendete Oligonukleotide.

Primer	Sequenz 5' - 3'
PKD1 for	AAC CTT CAT CAC CCT GGT GGT GTA A
PKD1 rev	CTG GTT TGA GGT CAC AGT GAA CGA T
PKD2 for	AGC TTC TCT GAG CAT CTC CTC TGT
PKD2 rev	GGT GAA GCT GTG TGA CTT TGC
PKD3 for	GCC CGA TCT GGA TGG AAA AGA TGG T
PKD3 rev	CTC CAA GGC AGT CTC TTG GTA CTT T
GAPDH for	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA G
GAPDH rev	TCC TTG GAG GCC ATG TAG GC CAT

3.1.3 Einfügen von Punktmutationen in SSH1L und LIMK2 Konstrukte mittels der Quick Change PCR

Um Mutationen an bestimmten Stellen in ein Gen einzufügen, wurde die Methode der Quick-Change PCR verwendet. Diese beruht auf dem Prinzip der PCR, nur dass hier 5' (*sense*)- und 3' (*antisense*) - mutagene Oligonukleotide genutzt wurden. Auf diese Weise werden in die Matrizen DNA Mutationen in Form von ausgetauschten Basen eingefügt und amplifiziert. Bei den hier verwendeten Plasmiden handelte es sich um die Vektoren pEGFP-N1 sowie pCR.V62-Met-FLAG mit der Sequenz von *ssh1l* und *limk1* oder *2*. Das PCR-Produkt umfasste den gesamten Vektor und das Genfragment, das nun die entsprechenden Mutationen enthielt. Die PCR-Produkte wurden nun mit der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut, um ursprüngliche parentale, methylierte DNA zu beseitigen. Es folgte die Transformation des Plasmids in DH5α Zellen, in denen das Plasmid mit den entsprechenden Mutationen vermehrt wurde. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch eine Minipräparation isoliert und durch eine Sequenzierung überprüft. Der Reaktionsansatz und das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 3.6 und 3.7 zusammengefasst.

Tab. 3.6 Zusammensetzung der Quick-Change PCR.

Volumen [µl]	Bestandteil
1	Matrizen DNA (100 ng/µl)
2,5	5'-Oligonukleotid (*sense*) (10 mM)
2,5	3'-Oligonukleotid (*antisense*) (10 mM)
1	*Pfu* turbo Polymerase 2 U/µl
5	dNTP-Mix (5 mM)
5	*Pfu*-Puffer 10x (Invitrogen, Karlsruhe)
33	ddH_2O

Tab. 3.7 PCR-Programm der Quick-Change PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
Denaturierung	97	30''	
Denaturierung	97	30''	16 Zyklen
Annealing	55	60''	
Elongation	72	10'	
	72	10'	

3.1.4 Durchführung von DNA- Mini- und Midipräparationen

Für die Reinigung von DNA in kleinen Maßstäben wurde 1 ml einer *E. coli* Übernachtkultur bei 13000 rpm für 1 Minute abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 150 µl der Puffers S1 des Machery and Nagel Midipräparationskits resuspendiert. In einem darauffolgenden Schritt erfolgte eine alkalische Lyse des Pellets durch den Puffer S2. Nach einer 5 minütigen Inkubation wurde die Lyse durch Zugabe des Puffers S3 gestoppt. Genomische DNA und zelluläre Proteine wurden hier durch einen weißen Niederschlag sichtbar. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 20 Minuten bei 4°C und 13000 rpm. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels 1 ml 100% reinem Ethanol gefällt. Es folge eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 13000 rpm. Im nächsten Schritt wurde das DNA Pellet mit 70% reinem Ethanol gewaschen und nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm nach Abnahme des Überstandes getrocknet. Das DNA Pellet wurde in autoklaviertem ddH_2O aufgenommen und die DNA Konzentration photometrisch bei 280 nm bestimmt. Die Durchführung der Präparation von DNA im Midi-Maßstab wurde nach Angaben des Herstellers Machery und Nagel mit dem entsprechenden Reaktionskit durchgeführt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die unter 2.7.1 aufgeführten Zellen wurden in Gewebekulturflaschen der Firma Greiner (Frickenhausen) mit RPMI 1640 Medium und 10% FCS unter Standardbedingungen (5% CO_2 und 37°C) kultiviert.

3.2.2 Transfektionsmethoden zur transienten Proteinexpression in eukaryotischen Zelllinien

Die Transfektion von Zellen mittels Lipofectamin™2000-Transfektiosreagenz beruht auf der Methode des lipidvermittelten Gentransfers. Dabei wird die zu transfizierende DNA von polykationischen Lipiden komplexiert und in dieser Form durch Verschmelzung mit der Zellmembran über Endozytose aufgenommen. Für die Transfektion von HEK293T Zellen mit

DNA wurde das Reagenz TransIT®-293 verwendet. Dieses enthält ein nichttoxisches, zelluläres Protein sowie ein Polyamin. Die Kombination bildet einen Komplex mit der zu transfizierenden DNA, welcher im Anschluss effizient in die Zelle eingeschleust wird. Bei der Verwendung von Lipofectamin™2000 und TransIT®-293 wurden 3 x 10^5 Zellen pro Ansatz eingesetzt. Für die Anfertigung von mikroskopischen Präparaten kamen 1 x 10^5 Zellen zum Einsatz. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für HEK293T Zellen wurden 100 µl OPTIMEM mit 3 µl TransIT®-293 für 20 Minuten inkubiert und im Anschluss 2 µg DNA zugegeben und für weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Für den Einsatz von Lipofectamin™2000 wurden 250 µl OPTIMEM mit 4 µl Lipofectamin™2000 für 5 Minuten inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden das gleiche Volumen OPTIMEM mit 2 µg DNA vorgelegt. Nach dem Mischen der beiden Ansätze folgte ein Inkubationsschritt für 20 Minuten bei RT. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Schlecht transfizierbare Zelllinien, wie MCF7 Zellen, wurden mit dem AMAXA Transfektions-Kits transfiziert. Hierzu wurden pro Ansatz 2,5 x 10^6 Zellen in 100 µl Transfektionsreagenz und 3 µg DNA aufgenommen und in Küvette überführt. Es folgte ein elektrischer Impuls über den die DNA in die Zellen aufgenommen wurde. Die Zellen wurden anschließend in der Küvette in 500 µl Medium mit 10% FCS aufgenommen und in 10 cm Petrischalen mit 10 ml serumhaltigen Medium überführt.

3.2.3 Transfektion von Zellen mit siRNA

Für die Analyse von Signalwegen wurde das Verfahren der RNA-Interferenz verwendet. Hierbei werden kurze „*antisense*“ Oligonukleotide in die Zellen transfiziert, welche mit der spezifischen Sequenz der mRNA eines bestimmten Gens interagierten. Die Bindung der Oligonukleotide führt zu einem Abbau der mRNA wodurch das Genprodukt, z.B. ein Protein eines Signalweges nicht mehr korrekt ausgebildet werden kann. Die verwendeten siRNAs sind in Tabelle (2.5.2) aufgeführt. Die Transfektion erfolgte mittels des Reagenz Oligofectamin (Invitrogen, Karlsruhe). Hierzu wurden 1,2 x 10^6 Zellen ausgesät. Für die Transfektion wurden in einem Reaktionsgefäß 175 µl OPTIMEM mit 10 µl einer 20 µM Lösung der entsprechenden siRNA inkubiert. In einem anderen Gefäß erfolgte die Inkubation von 11 µl OPTIMEM mit 4 µl Oligofectamin. Nach dem Mischen der beiden Ansätze wurde dieser für 20 Minuten inkubiert und anschließend auf die Zellen pipettiert. Diese wurden zuvor mit serumfreien Medium gewaschen und mit 800 µl desselben Medium überschichtet. Nach Zugabe der Transfektionsansätze erfolgte eine Inkubation für 4 h in denen die Vesikel mit der siRNA von den Zellen aufgenommen werden. Anschließend wurden 500 µl Medium mit 30% FCS hinzugegeben, so dass eine Ausgangskonzentration von 10% FCS wieder hergestellt war. Die weitere Analyse der Zellen wurde nach 48 h bzw. 72 h durchgeführt.

3.2.4 Analyse der Zellmigration mit Hilfe von Transwell-Filtereinsätzen

Die Analyse der Zellmigration wurde mit diversen Brustkarzinomzelllinien durchgeführt, die entweder eine RNAi vermittelte verringerte Expression von SSH1L oder PKD aufwiesen oder ein Konstrukt transient überexprimierten. Für die Experimente wurden 24 well Transwell-Filtereinsätze mit einem Porendurchmesser von 8 µm verwendet (Corning, New York (USA)). Abhängig von der Zelllinie wurden 2,5 x 10^5 bzw. 5 x 10^5 Zellen in serumfreien RPMI 1640 Medium auf der Oberseite des Filters ausgesät und die Migration durch einen FCS-Gradienten von 0% nach 10% induziert (Oberseite Filtereinsatz / Medium unterhalb des Filtereinsatzes). Eine Fixierung mit 4% (v/v) PFA beendete nach 3 h, 5 h oder 24 h in Abhängigkeit der Zelllinie, die Migration. Zellen, die nicht durch die Poren der Membran gewandert waren, wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Visualisierung der gewanderten Zellen erfolgte durch eine 15 minütige Inkubation mit Kristallviolett (0,1% (w/v) gelöst in ddH_2O). Reste ungebundenen Farbstoffes wurden durch einen Waschschritt entfernt. Die Auswertung erfolgte durch photographische Dokumentation der Filter. Hierfür wurden mittels eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops (Leica, Bensheim) mit einer CCD Kamera pro Filter 5 Ausschnitte mit einer zehnfachen Vergrößerung aufgenommen und die Zellen in jedem sichtbaren Feld gezählt. Die Zellmigration wurde durch die Quantifizierung der gewanderten Zellen pro Feld erfasst.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Mittels SDS-PAGE und Western Blot können Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Dazu erfolgt zunächst eine Auftrennung der denaturierten Proteinproben mittels reduzierender 10%iger oder 12,5%iger SDS-Gelen bei 100 V für ca. 30 Minuten. Als Standard für die SDS-PAGE wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Es folgte ein Transfer der aufgetrennten Probe mittels der semidry-Methode auf eine Nitrozellulosemembran bei 160 mA für ca. 2 h. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden mit einer Blocking-Lösung blockiert. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Die Inkubation des spezifischen Sekundärantikörpers erfolgte nach drei Waschschritten mit PBST bei RT für 1 h. Die Immundetektion spezifischer Proteine erfolgte je nach Fragestellung mit dem alkalische Phosphatase (AP) System nach den vorhandenen Standardprotokollen (Asubel, 1994) oder durch ECL (*enhanced chemilumiscence*) Detektion nach einer Vorschrift von S. Haas (Universität Rostock).

Für einige Versuche war eine feinere Auftrennung in 4% - 12% Gelen notwendig. Hierzu wurden die Proteine mit Bis-Tris-Gradientengelen separiert. Die benötigten Geräte (XCell Sure *Lock*™, Mini Cell, XCell II™ Blot Module) und Pufferlösungen (NuPAGE® MES SDS

Running Buffer, NuPAGE® Transfer Buffer) wurden von der Firma Invitrogen bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.2 Durchführung von 14-3-3 Pulldown-Assays

Um die potentielle Interaktion von Proteinen mit 14-3-3ß Adapterproteinen zu überprüfen wurden Pulldown-Assays durchgeführt. Hierzu wurden Zelllysate mit Lysispuffer auf 1 ml aufgefüllt und mit an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-14-3-3 Fusionsproteinen (siehe 3.3.5) für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit Lysispuffer und eine Zugabe von 25 µl 5x Laemmli Probenpuffer. Die Proben wurden bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

3.3.3 Herstellung von GST-14-3-3β Beads

Für die Durchführung von GST 14-3-3β Pulldown-Assays wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelte Fusionsproteine hergestellt. Eine bakterielle Übernachtkultur mit DH5α Zellen wurde angeimpft, die das Plasmid pGEX-14-3-3β enthielten. Das Kulturvolumen umfasste 50 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin. Mit dieser Kultur wurde eine 450 ml Hauptkultur angeimpft und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte mit 0,1 mM IPTG für 6 h. Vor der Induktion wurde 1 ml Kultur entnommen und die darin enthaltenen Zellen bei 13000 rpm pelletiert und in 100 µl 5x Laemmli Probenpuffer aufgenommen. Die Zellen der Kultur wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm pelletiert und durch Ultraschall (Bandlin Sonor 200, MD73/D, Cycle 50%, 3 x 15 sec) aufgeschlossen. Zwischen jedem Schritt erfolgte eine einminütige Inkubation auf Eis. Das Lysat wurde bei 13000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es folgte eine Probennahme von 0,5 ml des Überstandes. Im nächsten Versuchsschritt wurde die Glutathion-Sepharose dreimal mit sterilem 1x PBS gewaschen. Zu 12 ml Lysat wurde 1 ml Glutathion-Sepahrose gegeben und bei 4°C auf einem Rollinkubator inkubiert. Die Glutathion-Sepharose Beads wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm und 4°C pelletiert. Vom Überstand wurde eine Probe von 0,5 ml abgenommen. Zur Beseitigung unspezifischer Bindungen folgten drei Waschschritte mit kaltem 1x PBS. Die Glutathion-Sepharose Beads wurden in 1 ml kaltem 1x PBS aufgenommen, in 500 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Die erfolgreiche Reinigung wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-G250-Färbung der während des Versuchs abgenommenen Proben überprüft.

3.3.4 Durchführung von Immunpräzipitationen

Zur Immunpräzipitation wurden Zelllysate mit Lysispuffer auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt und für 2 h bei 4°C unter Rotation mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Anschließend folgte eine Zugabe von 20 µl Protein G-Agarose Beads und eine weitere Inkubation bei 4°C für 1 h bei ständiger Rotation. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit Lysispuffer wurden 25 µl 5x Laemmli Probenpuffer zugesetzt und die Proben bei 95°C denaturiert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

3.3.5 *in vitro* Kinase Assay

Für eine Analyse der Phosphorylierung der Phosphatase SSH1L und der LIM-Kinase 1 / 2 wurden die gereinigten PKD Isoformen 1 und 2 als Kinase verwendet. PKD1 wurde in Insektenzellen (Zelllinie Sf158) mit rekombinanten Bacculoviren erzeugt und von der Arbeitsgruppe Hausser zur Verfügung gestellt. Die Isoform PKD2 wurde als gereinigtes rekombinant hergestelltes Protein erworben.

Aus Lysaten von HEK293T Zellen wurden mittels eines HA-, FLAG- bzw. GFP-Antikörpers ektopisch exprimierte Proteine immunpräzipitiert. Hierzu wurden die Proteine SSH1L, SSH1L S937/978A, LIMK1 WT, LIMK2 WT, LIMK2 S289A und LIMK2 S314A verwendet. Nach der Inkubation wurden die Präzipitate zweimal mit Lysispuffer sowie einmal mit DTT-haltigem Phosphorylierungspuffer gewaschen. In einem weiteren Schritt erfolgte eine Inkubation mit 2 µCi [γ-^{32}P]-ATP und 4 µl gereinigter PKD1 bzw. PKD2 in Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bei 37°C. Durch Zugabe von 5x Laemmli SDS-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt und die Proteine bei 80°C denaturiert. Es folgten eine SDS-PAGE und ein Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Die Membran wurde getrocknet und über Nacht auf einer Verstärkerfolie exponiert. Das resultierende Autoradiogramm wurde mittels eines „Phosphoimagers“ (Molecular Dynamics, Krefeld) aufgenommen und mit Hilfe der „ImageQuant“ Software ausgewertet.

3.3.6 Reinigung von FLAG-SSH1L

Für die Durchführung von *in vitro* Substratphosphorylierungen wurden gereinigte Proteine mit FLAG-Tag verwendet. Hierfür wurden pro Ansatz vier 10 cm Petrischalen mit 3,5 x 10^6 HEK293T Zellen ausgesät und mit 7 µg Plasmid für das entsprechende Konstrukt transfiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in 5 ml kaltem 1x PBS geerntet, abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Lysispuffer mit Inhibitoren aufgenommen. Für die Reinigung wurde das Prinzip der Affinitätschromatographie angewandt. Hierfür wurde 1 ml FLAG-Agarose für 1 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und dreimal mit TBS gewaschen und mit 100 mM Glycin pH 3,5 für 15 Minuten aktiviert. Es folgten anschließend erneut drei Waschschritte mit TBS und ein Waschschritt mit dem verwendeten Lysispuffer. Die Lysate wurden für 4 h mit 250 µl

Beads pro Ansatz bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Dem Überstand wurde eine Probe für eine Western Blot Analyse der Aufreinigung entnommen. Es folgten erneut drei Waschschritte mit Lysispuffer und ein Waschschritt mit 1x PBS. Nach der Entnahme einer Probe wurden die Fusionsproteine durch Inkubation mit FLAG-Peptid [5 µg/µl in TBS] eluiert. Das Elutionsvolumen betrug dabei 250 µl. Es wurden drei Elutionsschritte von je 30 Minuten bei 4°C unter Rotation durchgeführt. Die eluierten Fusionsproteine wurden bei -80°C gelagert. Die Überprüfung der erfolgreichen Reinigung erfolgte mittels eines Western Blots.

3.3.7 Reinigung von Antikörpern über Epoxy-aktivierte Sepharose 6B

Für die Reinigung eines phosphospezifischen Antikörpers gegen pSer289 der LIMK2 wurden drei Kaninchen über einen Zeitraum von 120 Tagen mit dem Peptid NH_2-CRRSNpSISKS-$CONH_2$ immunisiert. Nach anschließendem Ausbluten der Tiere wurde der gebildete Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus dem Serum der Tiere isoliert. 0,5 g Epoxy-aktivierte Sepharose 6B wurden über einer Filternutsche mit 200 ml eiskalten ddH_2O gewaschen und in einem Restvolumen von 10 ml in ein BlueCap überführt. Nach dem Absinken der Sepharose erfolgte die Reduzierung des Überstandes auf 5 ml. In einem Zentrifugationsschritt bei 2500 rpm für 4 min und 4°C wurde der komplette Überstand entfernt. Das Peptid wurde für die Kopplung an die Sepharose in 1 ml H_2O aufgenommen und anschließend 2 ml Kopplungspuffer zugegeben (Sequenz: NH_2-CRRSNpSISKS-$CONH_2$). Das gelöste Peptid wurde über Nacht unter Rotation bei Raumtemperatur mit der Sepharose inkubiert. Die Entfernung von überschüssigem Ligand erfolgte durch einen Waschschritt mit 2,5 ml Kopplungspuffer. Verbliebene aktive Gruppen der Sepharose wurden durch einen Blocking-Schritt mit 1 M Ethanolamin, pH 8 besetzt. Die mit dem Peptid gekoppelte Sepharose wurde in eine Säule des Typs C 10/10 mit Adaptoren des Typs AC 10 überführt und diese luftblasenfrei verschlossen. Die Matrix der Säule wurde jeweils einmal mit PBS pH 7, 3 und 11 gewaschen und anschließend mit 1 ml Anti-Peptid-Kaninchenserum geladen. Es folgte ein Waschschritt mit 10 ml 1x PBS, pH 7. Die Elution erfolgte in 18 Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, in welche PBS, pH 11 vorgelegt war. Die Überprüfung der Elutionsfraktionen auf vorhandenen Antikörper erfolgte mittels ELISA.

3.3.8 Bestimmung IgG-reicher Fraktionen durch einen ELISA-Test

Das lyophylisierte Peptid mit der Sequenz NH_2-CRRSNpSISKS-$CONH_2$ wurde in H_2O, so dass eine Endkonzentration von 10 mg/ml vorlag. 1 µg Peptid / ml wurde mit Kopplungspuffer versetzt und damit eine ELISA-Platte des Typs Greiner # 655081 mit 100 µl der Lösung / Well gecoatet. Die Bindung des Peptids an die Platte erfolgte durch Inkubation über Nacht bei 4°C. Im Anschluss folgte ein dreimaliges Waschen der ELISA-Platte mit 1x PBS und 0,1% (v/v) Tween. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte durch eine

Inkubation mit 100 µl der aufgefangenen Fraktionen (siehe 3.3.7) für 2 h bei RT. Es folgte erneut ein dreimaliges Waschen mit 1x PBS und 0,1% (v/v) Tween. Als Sekundärantikörper diente ein POD-gekoppelter anti-rabbit IgG Antikörper, der im Verhältnis 1:5000 in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS verdünnt wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der gebundene primäre Antikörper mit 1 mg/ml ABTS in ABTS-Puffer (Boehringer Ingelheim, Biberach) 100 µl / Well (30 min Inkubation bei RT) und bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem ELISA-Reader detektiert.

3.4 Mikroskopische Verfahren

3.4.1 Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz von COS7, MDA-MB-231 oder MCF7 Zellen wurden Mikroskopiedeckgläser mit Kollagen (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) beschichtet. Die Deckgläser wurden über Nacht bei 4°C mit einer Kollagenlösung (22,5 µg/µl in 1x PBS) inkubiert. Die anschließende Entfernung überschüssigen Kollagens erfolgte durch drei Waschschritte mit 1x PBS. Für die mikroskopische Analyse von COS7 Zellen erfolgte keine Beschichtung.

Die ausgesäten Zellen wurden zunächst bei 37°C für 24 h inkubiert, daraufhin mit 1x PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 4% (v/v) PFA fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit 1x PBS. Freies PFA wurde mit 1 M Glycin, pH 7,4 gequencht. Die Entfernung des Glycins erfolgte durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS. Um die Zellen permeabel für Antikörper zu machen, wurden die Zellen für 2 min mit 0,1% (v/v) Triton-X-100 inkubiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Für die Blockierung freier Bindungsstellen auf dem Glas wurden die Zellen mit 5% FCS in PBS für 30 Minuten inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit Blocking-Lösung verdünnt und für mindestens 2 h mit den Proben inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte eine Inkubation mit einem entsprechenden Sekundärantikörper. Dieser wurde für mindestens 1 h unter Lichtausschluss mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Einbettung der Präparate in Fluoromount G (Dianova, Hannover).

3.4.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Methode der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie ermöglicht es, Aufnahmen eines Objekts innerhalb einer dünnen Fokusebene durchzuführen, welche schrittweise zu verschieben sind. Somit ist eine exakte räumliche Zuordnung der Fluoreszenzsignale möglich. Die Präparate wurden an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop des Typs TCS SP2 (Leica, Bensheim) unter Verwendung eines Plan-Neofluor-Ölimmersionsobjektivs (63-fache Vergrößerung) analysiert. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte unter den in Tabelle 3.8 aufgelisteten Bedingungen.

Tab. 3.8 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

	Laser-Typ	Extinktion	Emission
GFP	Argon	488 nm	507 nm
Alexa488	Argon	495 nm	519 nm
Alexa546	Helium-Neon	466 nm	681 nm

3.4.3 Bestimmung der von einer einzelnen Zelle eingenommenen Fläche

Die Zellen wurden mit einer 40.0/1.25 HCX PL APO Objektivlinse eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops des Typs TCS SP2 (Leica, Bensheim) aufgenommen. Die von einer einzelnen Zelle eingenommene Oberfläche wurde mittels der Axiovision Software (Carl Zeiss GmbH, Jena) analysiert. Es wurden identische mikroskopische Einstellungen vorgenommen (Bildgröße, 1024 x 1024 Pixel, 375 x 375 µm). Pro Ansatz wurden 70 Zellen analysiert. Die gezeigten Bilder stellen einen Stapel von mehreren konfokalen Sektionen dar.

4. Ergebnisse

Durch die Arbeiten von Tim Eiseler (Eiseler *et al.,* 2007) konnte gezeigt werden, dass PKD einen negativen Einfluss auf die gerichtete Zellmigration hat. Die Autoren beobachteten einen Anstieg der Zellmigration, wenn eine kinasetote Form von PKD1 in Panc89 Zellen stabil exprimiert wurde. Die Überexpression einer wildtypischen Form von PKD1 führte hingegen zu einer stark reduzierten Zellmigration. Des Weiteren konnten die Autoren zeigen, dass PKD1 und PKD2 direkt mit filamentösem Aktin (F-Aktin) interagieren. Dies deutet darauf hin, dass PKD an Prozessen, die den dynamischen Umbau des F-Aktinzytoskeletts regulieren, beteiligt ist. Darüber hinaus ist in sämtlichen invasiven Tumorzellen eine verringerte Expression von PKD zu finden (Kim *et al.,* 2008). Somit kann ein unmittelbarer Einfluss von PKD auf die Migration und Invasion von Tumorzellen angenommen werden (Qiang *et al.*, 2004; Bowden *et al.,* 1999). PKD-Substrate, die diese Funktion vermitteln, waren allerdings nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher PKD-regulierte Proteine und Signalwege in der Zellmigration und – invasion zu identifizieren.

4.1 Identifikation eines geeigneten Zellsystems

Zunächst wurde ein Zellsystem ausgewählt, in welchem die Funktion von PKD bei Migrations- und Invasionsprozessen von Tumorzellen untersucht werden konnte. Die hochinvasive humane Brustkarzinomzelllinie MDA-MB-231 und die ebenfalls hochinvasive humane Melanomzelllinie A375 wurden auf die Expression der drei PKD Isoformen PKD1, 2 und 3 untersucht. HEK293T Zellen dienten dabei als Kontrolle, da diese alle drei PKD Isoformen exprimieren (S. Schmid, persönliche Kommunikation). Zunächst wurde eine RT-PCR wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt (siehe Abb. 4.1). Für das Vorhandensein von mRNA für PKD1 wurde ein Fragment von 198 bp erwartet, für PKD2 ein Fragment von 310 bp und für PKD3 ein Fragment von 179 bp. Wie erwartet konnte in HEK293T Zellen die mRNA aller drei PKD Isoformen nachgewiesen werden. Die mRNA von PKD1 wurde des Weiteren in A375 Zellen, jedoch nicht in MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen. Die mRNA für PKD2 und 3 war in beiden Zelllinien nachweisbar.

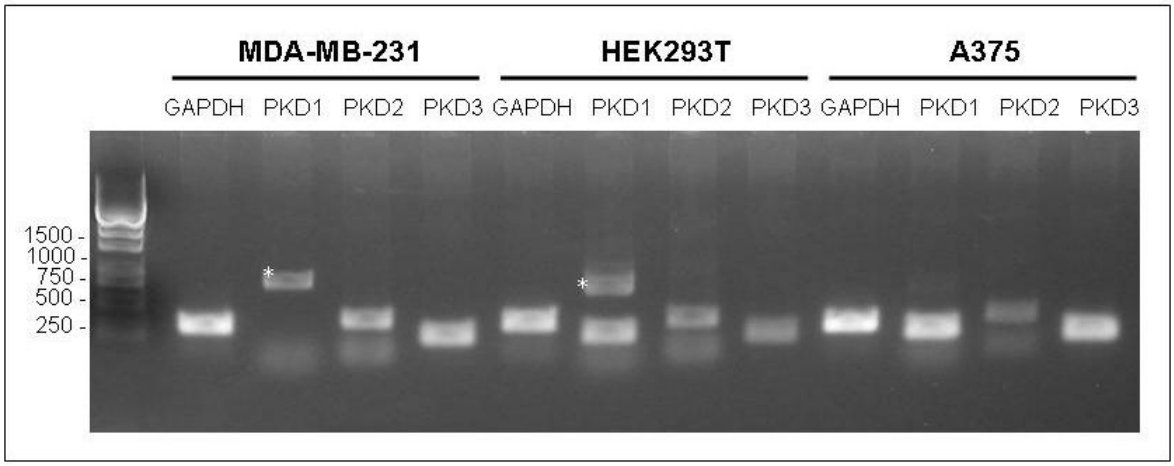

Abb. 4.1 Expressions-Analyse der PKD Isoformen in A375, MDA-MB-231 und HEK293T Zellen mittels RT-PCR. Die mRNA wurde wie unter 3.1.2 beschrieben isoliert und durch eine RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der cDNA Abschnitte erfolgte durch eine PCR-Reaktion mittels spezifischer Oligonukleotide für die Sequenzen von PKD1, 2 und 3. Die PCR-Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Visualisierung der amplifizierten DNA erfolgte durch eine Ethidiumbromidfärbung. Die Verwendung gleicher mRNA Mengen wurde durch die Amplifikation der Sequenz für GAPDH verifiziert. * PKD1-Amplifikat verursacht durch eine Kontamination mit genomischer DNA.

Für den Nachweis der Expression der PKD-Isoformen mittels Western Blot Analyse wurden für jede Zelllinie 5 x 10^5 Zellen eingesetzt (siehe Abb. 4.2). Als Kontrolle dienten wieder HEK293T Zellen. PKD1 konnte in Übereinstimmung mit der RT-PCR nur in den A375 Zellen durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. PKD2 war in beiden Zelllinien detektierbar. Überraschenderweise konnte PKD3, trotz eines positiven Signals in der RT-PCR, mittels Western Blot Analyse nur in A375 aber nicht in MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass der PKD3-Proteinlevel in diesen Zellen sehr niedrig ist. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die folgenden Experimente mit MDA-MB-231 Zellen durchgeführt, da diese lediglich PKD2 stark und nachweisbar exprimieren.

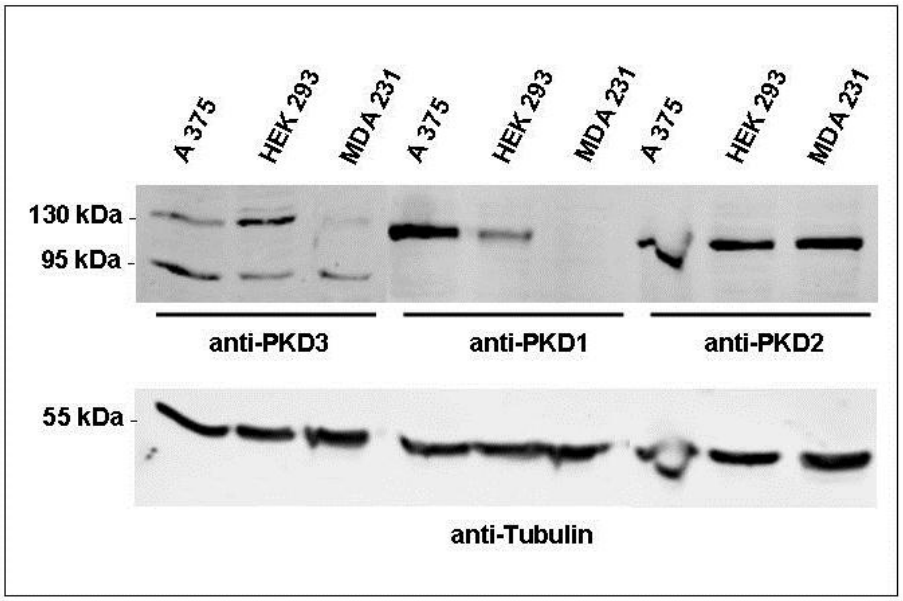

Abb. 4.2 Expressions-Analyse der PKD Isoformen in A375, MDA-MB-231 und HEK293T Zellen mittels Western Blot. 5 x 10^6 Zellen wurden lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der PKD Isoformen erfolgte durch Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern. Die Verwendung gleicher Proteinmengen wurde durch den Einsatz eines Tubulin-spezifischen Antikörpers verifiziert. Für PKD3 wurden mit dem spezifischen Antikörper zwei Proteinbanden detektiert, wobei die Bande bei 130 kDa PKD3 entspricht und die Bande bei 95 kDa einem unbekannten Protein zuzuordnen ist.

Weiterhin sollte die subzelluläre Lokalisation von PKD2 in MDA-MB-231 Zellen geklärt werden. Hierzu wurden MDA-MB-231 Zellen fixiert und endogene PKD2 mit einem spezifischen Antikörper und mit einem Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. F-Aktin wurde durch Alexa546 gekoppeltes Phalloidin angefärbt. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass PKD2 direkt am Lamellipodium der Zelle zu finden ist und dort mit F-Aktin kolokalisiert (siehe Abb. 4.3). Dies korreliert mit der Literatur (Eiseler *et al.*, 2007). Des Weiteren ist aus den in Abbildung 4.3 gezeigten Bildern zu erkennen, dass PKD2 ebenfalls mit perinuklären, aktinreichen Strukturen kolokalisiert. Hierbei handelt es sich vermutlich um den Golgi-Komplex, der aktinreiche Strukturen aufweist (Ulrich & Heisenberg, 2009) und an dem PKD2 lokalisiert ist (Hausser *et al.,* 2002).

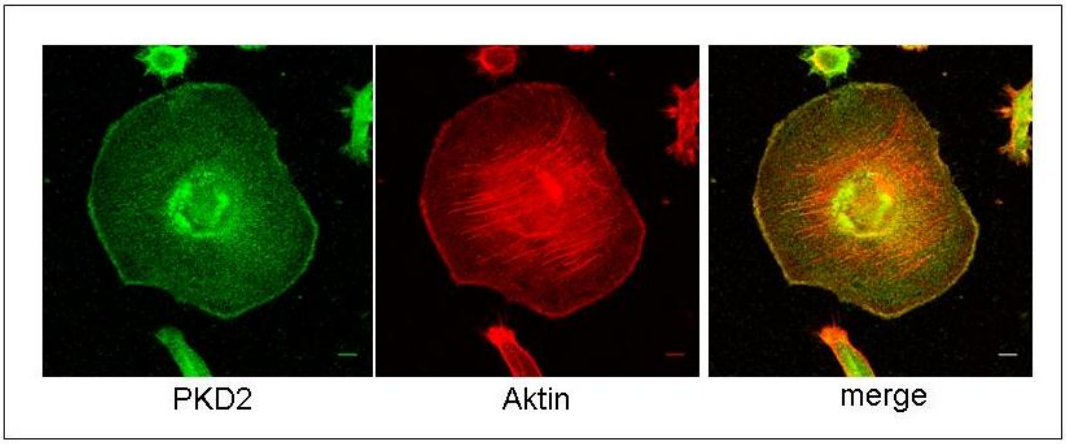

Abb. 4.3 Kolokalisation von PKD2 und F-Aktin am Lamellipodium einer MDA-MB-231 Zelle. 7,5 x 10^4 MDA-MB-231 Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, nach 24 h mit 4% PFA fixiert und mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert. Die Detektion von PKD2 erfolgte mit einem primären anti-PKD2-Antikörper und einem Alexa488 gekoppelten Sekundärantikörper. F-Aktin wurde mit Alexa546 gekoppeltem Phalloidin visualisiert. Die Präparate wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. *Scale bar:* 10 µm.

4.2 PKD reguliert die Zellmigration durch Phosphorylierung der Cofilinphosphatase Slingshot 1 like (SSH1L)

Um die Frage zu klären, ob PKD äquivalent zu Pankreaskarzinomzellen die gerichtete Migration von Brustkarzinomzellen direkt reguliert, wurden die schwachinvasive Brustkarzinomzelllinie MCF7 und die hochinvasive Brustkarzinomzelllinie MDA-MB-231 für Migrationsstudien verwendet. Durch eine RT-PCR und eine Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass MCF7 Zellen PKD1 und 2 exprimieren (S. Schmid, persönliche Kommunikation), wohingegen in MDA-MB-231, wie in Abb. 4.1 und 4.2 gezeigt, nur PKD2 vorhanden ist. In beiden Zelllinien wurde PKD mittels einer spezifischen siRNA ausgeschaltet und die Zellmigration durch einen Transwell-Filter-Assay (siehe Abb. 4.4 A und B) entlang eines FCS-Gradienten analysiert. In MCF7 Zellen führte die Depletion von PKD1 zu einer 3-fachen und von PKD2 zu einer 10-fachen Steigerung der Migration im Vergleich zu den Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert waren. Der erfolgreiche Knock-Down der Proteine wurde durch einen Western Blot (siehe Abb. 4.4 C und D) gezeigt. Der verwendete Antikörper zeigt bei PKD1 eine Doppelbande, wobei die untere Bande PKD1 und die obere Bande PKD2 entspricht. Für beide siRNAs war die Depletion erfolgreich, was durch schwächere Banden für beide Isoformen, verglichen mit der siLacZ Kontrolle, zu erkennen ist. Der Knock-Down von PKD2 in MDA-MB-231 Zellen mittels zwei spezifischer siRNAs führte ebenfalls zu einer signifikant gesteigerten Zellmigration. Der Effekt der Depletion von PKD2 auf die Zellmigration war hier allerdings weniger deutlich als im Fall von MCF7 Zellen.

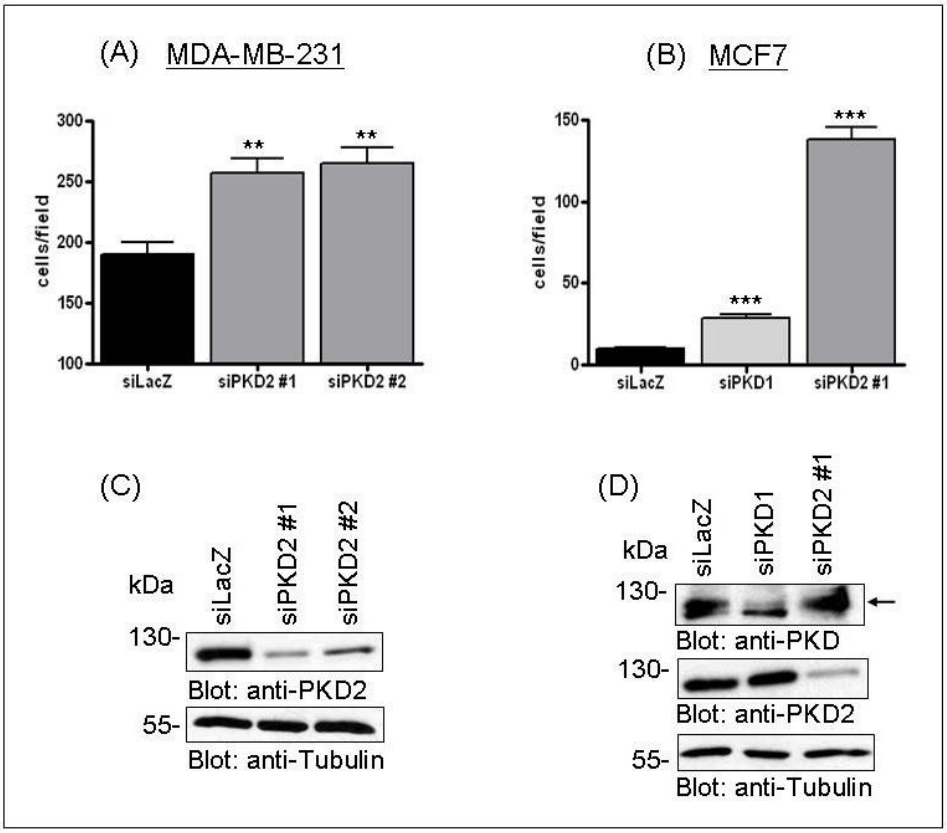

Abb. 4.4 Steigerung der Zellmigration durch die Depletion von PKD1 und 2 in MDA-MB-231 und MCF7 Zellen. MDA-MB-231 (A) und MCF7 Zellen (B) wurden mit spezifischen siRNAs gegen PKD1, PKD2 und einer LacZ siRNA als Kontrolle transfiziert und ein Transwell-Filter-Assay durchgeführt. *Säulen*: Darstellung von Doppelwerten, die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. *Balken*, SEM, **, P < 0,0001. (C) und (D) Die Expression von PKD1 und 2 wurde mittels Western Blot Analyse ermittelt (*Pfeil* PKD1). Der gleiche Proteingehalt wurde durch die Detektion von Tubulin verifiziert.

In migrierenden Zellen wird die Ausbildung von Lamellipodien am sogenannten „*leading edge*“ durch die Polymerisation von Aktin bestimmt. PKD1 und 2 interagieren mit dem Aktinzytoskelett, was eine direkte Beeinflussung der Proteine ermöglicht, welche die Regulation der Aktinpolymerisation regulieren (Eiseler *et al.,* 2007). Deshalb wurde der Einfluss einer Depletion von PKD auf die Morphologie und die Verteilung von F-Aktin in MCF7 Zellen untersucht. Die mit einer LacZ siRNA transfizierten Kontrollzellen wiesen die typische abgerundete Morphologie (siehe Abb. 4.5 A). Der Verlust von PKD1 zeigte einen schwachen, aber signifikanten Einfluss auf die Morphologie der Zellen, die etwas ausgebreiteter als die Kontrollzellen waren (siehe Abb. 4.5 A’). Der Verlust von PKD2 hingegen zeigte wesentlich deutlichere Effekte. Die Zellen wiesen eine runde und deutlich ausgebreitete Morphologie auf. Die Berechnung der Fläche, die von einer einzelnen Zelle eingenommen wurde zeigte, dass der Verlust von PKD1 zu einer doppelten, der Verlust von PKD2 zu einer vierfachen Zunahme der Fläche führte. Weiterhin zeigten PKD2 depletierte Zellen eine deutliche Zunahme an F-Aktin-reichen Strukturen am Lamellipodium der Zelle (siehe Abb. 4.5 B und B’’, siehe Pfeile).

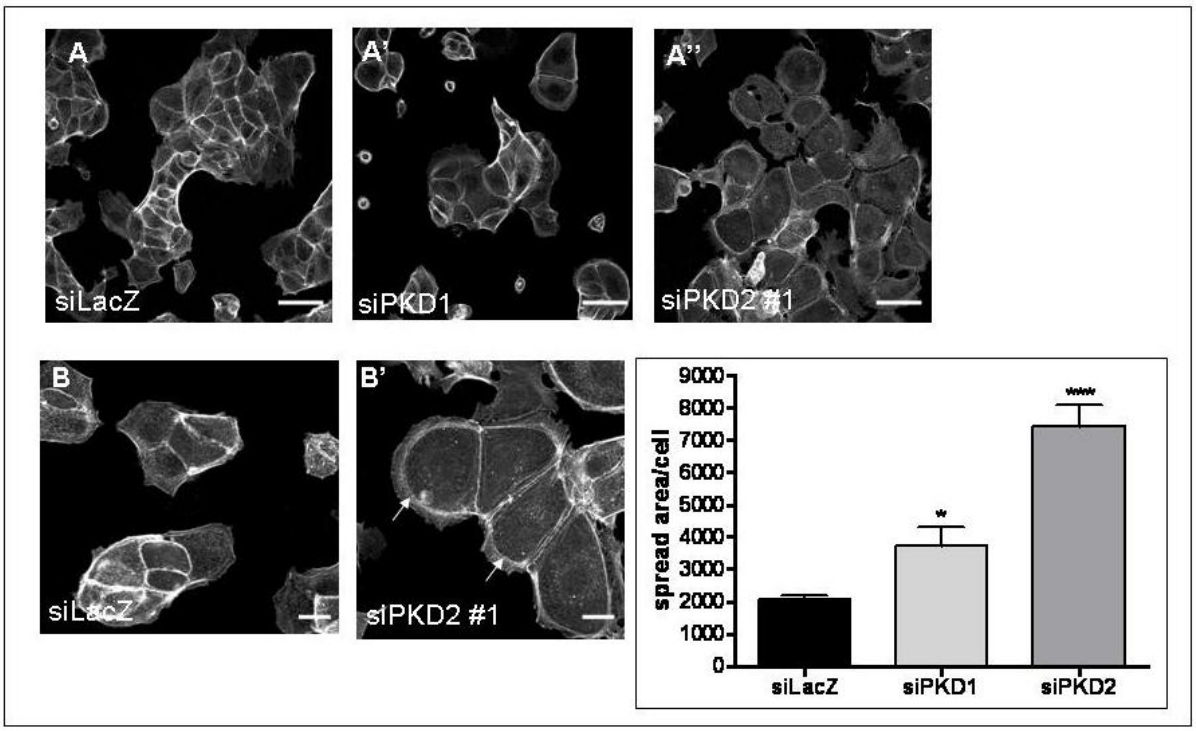

Abb. 4.5 Die Depletion von PKD beeinflusst die Zellmorphologie. MCF7 Zellen wurden mit siRNAs gegen PKD1 und 2 transfiziert, auf mit Collagen beschichtete Deckgläser ausgesät und mit Alexa546 gekoppelten Phalloidin gefärbt. *Pfeile*: F-aktin-reiche Membranausstülpungen. *Scale bar*: 50 µm (A, A' und A'') und 20 µm (B und B'). Das Diagramm zeigt die von einer Einzelzelle eingenommene Fläche, wie unter 3.4.3 beschrieben. *Säulen*: Fläche/Zelle in μm^2. *Balken*: SEM. Vier unabhängige mikroskopische Felder wurden analysiert. *, $P < 0,05$; ***; $P < 0,0001$.

Ein Hauptregulatorprotein, welches bei der gerichteten Zellmigration und bei der Ausbildung von Lamellipodien eine Rolle spielt, ist Cofilin, das zu der Familie der ADF-Proteine („*actin depolymerizing factor*“) gehört. Wachstumsfaktor-induzierte Signalwege führen zu einer Aktivierung von Cofilin und damit zu einer Ausbildung von Lamellipodien sowie einer Erhöhung der Ausbreitungsfläche der Zelle (Wang *et al.,* 2007). Deshalb wurde untersucht, ob PKD in die Regulation und Phosphorylierung von Cofilin involviert ist. Die Depletion von PKD in MCF7 und in MDA-MB-231 Zellen durch siRNAs führte, verglichen mit der Kontrolle, zu einer signifikanten Abnahme von inaktivem Phospho-Cofilin (pCofilin) (siehe Abb. 4.6). Auch hier war die Auswirkung des Verlustes von PKD2 wesentlich signifikanter als bei PKD1, was mit den Ergebnissen des Transwell-Filter-Assays korreliert (siehe Abb. 4.4).

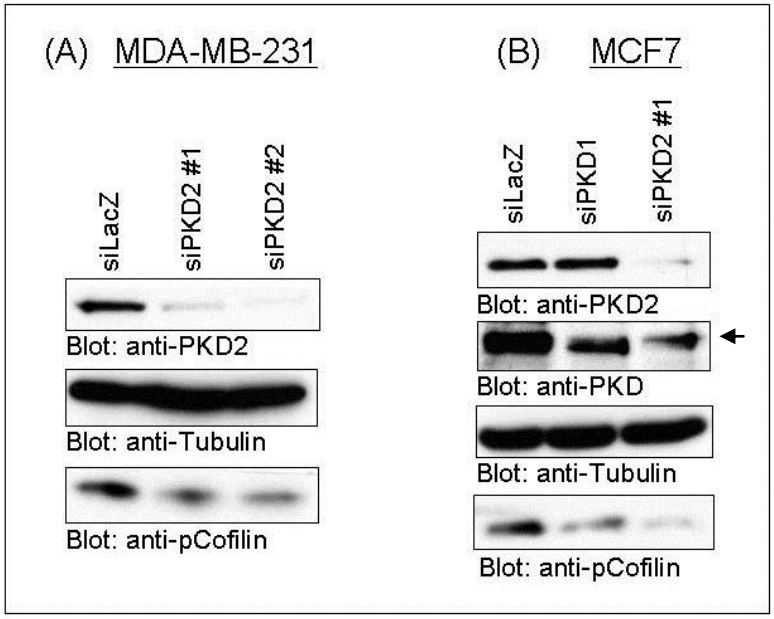

Abb. 4.6 Einfluss der Depletion von PKD auf die Phosphorylierung von Cofilin. MDA-MB-231 (A) und MCF7 Zellen (B) wurden mit spezifischen siRNAs gegen PKD1, PKD2 und einer LacZ siRNA als Kontrolle transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels Immunoblotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Knock Down Effizenz und von Phosphocofilin erfolgte durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern. Pfeil: PKD1.

Die Dephosphorylierung von Cofilin an Serin 3 wird von Cronophin (Ghola *et al.,* 2005) und Mitgliedern der Familie der Slingshot-Phosphatasen SSH1L, SSH2L und SSH3L vollzogen (Niwa *et al.,* 2002; Ohta *et al.,* 2003). SSH1L wird an F-Aktin-reiche Strukturen am Lamellipodium der Zelle rekrutiert und dort durch direkte Interaktion mit F-Aktin aktiviert. Die Inhibition von SSH1L erfolgt durch eine phosphorylierungsabhängie Bindung an 14-3-3 Proteine, die durch die Serine 937 und 978 vermittelt wird (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). Beide Serine passen auf das PKD Konsensusmotiv, welches in Abbildung 4.7 schematisch dargestellt ist. Das PKD-Konsensusmotiv beginnt mit einem Leucin, Isoleucin oder Valin an der -5 Position, gefolgt von einem Arginin an der -3 Position. An Position 0 ist entweder ein Serin oder Threonin möglich.

-5	-4	-3	-2	-1	0	
L/I	X	**R**	X	X	**pS**	PKD-Konsensusmotiv
L	T	R	S	S	pS	**SSH1 Ser937**
L	K	R	S	H	pS	**SSH1 Ser978**

Abb. 4.7 Vergleich des PKD-Konsensusmotivs mit den beiden potentiellen PKD Motiven in SSH1L Serin 937 und 978.

Um zu klären, ob PKD die Phosphatase SSH1L als Substrat erkennt und phosphoryliert, wurde ein *in vitro* Kinaseassay durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine PKD1 Wildtyp

(WT), PKD1 kinase-tot (KD), PKD2 WT und PKD2 KD mit gereinigten FLAG-SSH1L als Substrat inkubiert. Die Ergebnisse zeigen eine spezifische Phosphorylierung von SSH1L durch beide wildtypischen PKD-Isoformen. Bei Verwendung der kinasetoten Varianten war keine Phosphorylierung detektierbar (siehe Abb. 4.8). Dies zeigt, dass SSH1L ein Substrat für PKD1 und PKD2 *in vitro* ist.

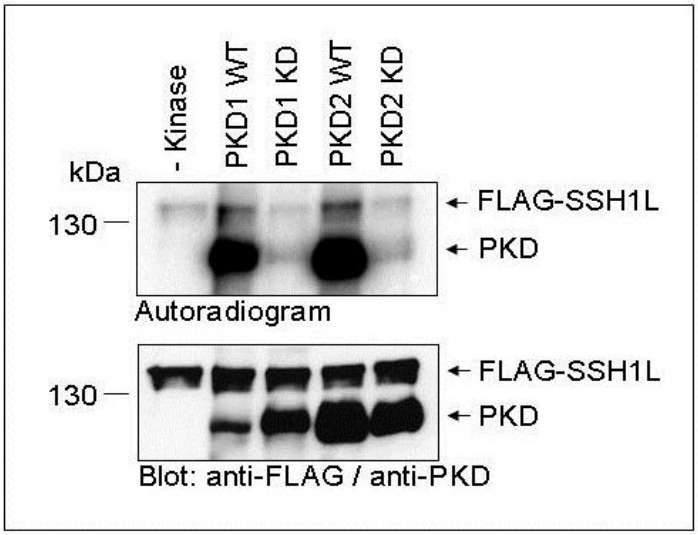

Abb. 4.8 PKD1 und 2 phosphorylieren FLAG-SSH1L *in vitro.* Gereinigtes FLAG-SSH1L wurde mit Kinasepuffer, der [^{32}P]-γ-ATP enthielt sowie PKD1 WT, PKD1 KD, PKD2 WT und PKD2 KD inkubiert. *(-)* Ansatz ohne Kinase. Die Einlagerung von radioaktivem Phosphat wurde durch einen Phosphoimager detektiert (Autoradiogramm). PKD und FLAG-SSH1L wurden mittels Western Blot Analyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Blot).

Die Inhibition der PKD-vermittelten Phosphorylierung von Serin 937 und 978 sollte in Zellen zu einer verstärkten Interaktion von SSH1L mit F-Aktin und einer reduzierten Bindung der Phosphatase an 14-3-3 Proteine führen. Zunächst wurden deshalb Lokalisationsstudien durchgeführt. COS7 Zellen wurden mit GFP-SSH1L oder mit einer ebenfalls GFP-getagten Doppelmutante von SSH1L transfiziert, in der die Serine 937 und 978 jeweils durch ein Alanin ersetzt waren. Wie in Abbildung 4.9 gezeigt, ist GFP-SSH1L WT vorwiegend im Zytoplasma zu finden, wohingegen die S937/978A Mutante besonders signifikant an F-Aktin-reichen Strukturen der Zelle zu finden ist. Die Koexpression von PKD2 KD führte zu einer verstärkten Lokalisation von GFP-SSH1L WT an F-aktin-reiche Strukturen und damit zu einem SSH1L S937/978A-ähnlichen Phänotyp. Dies deutet daraufhin, dass die Expression von PKD2 KD dominant-negativ auf endogene PKD wirkt und damit die Phosphorylierung von SSH1L inhibiert.

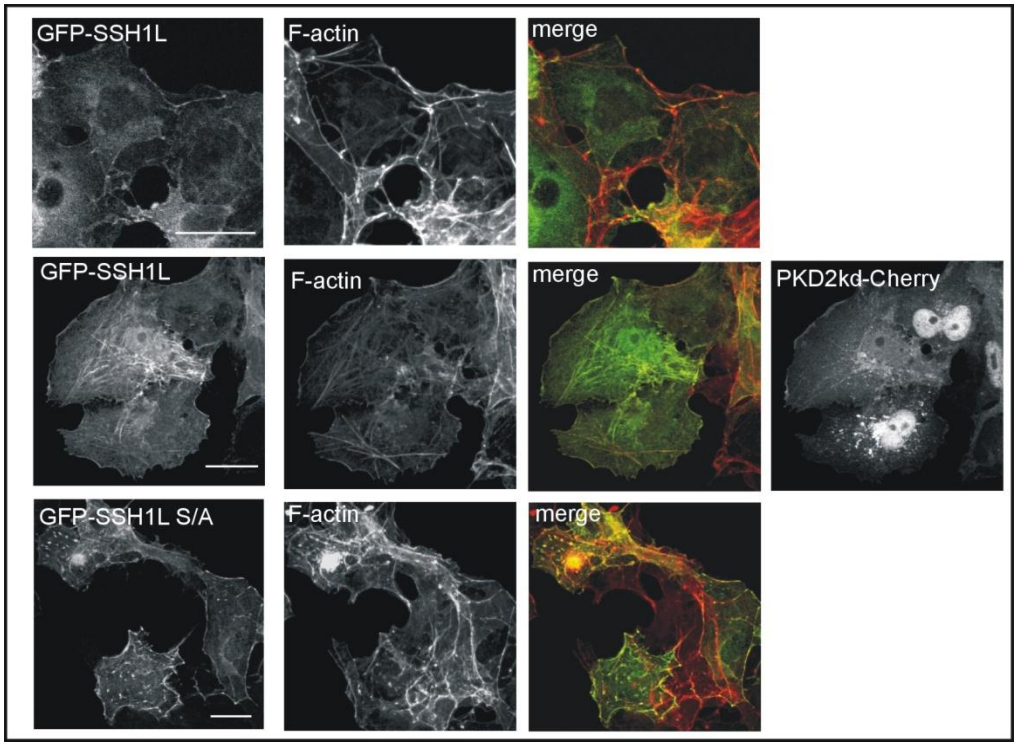

Abb. 4.9 PKD reguliert die Lokalisation von SSH1L. COS7 Zellen wurden mit GFP-SSH1L WT, GFP-SSH1L-S937/978A (S/A) und GFP SSH1L WT plus PKD2KD-Cherry wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert. Die Färbung des Aktinzytoskeletts erfolgte durch Alexa633-Phalloidin. *Scale bar*: 20 µm.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Verlust von PKD2 eine Reduzierung der Bindung von SSH1L an 14-3-3 Proteinen zur Folge hat. Hierzu wurde ein GST-Pulldown-Assay durchgeführt, bei dem Lysate von PKD2-depletierten MDA-MB-231 und PKD1- und 2-depletierten MCF7 Zellen verwendet wurden. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass in beiden Zelllinien ein Verlust von PKD zu einer Verringerung der Interaktion von SSH1L mit 14-3-3 Proteinen führt (siehe Abb. 4.10). Der Verlust von PKD1 in MCF7 Zellen zeigt auch hier einen wesentlich schwächeren Effekt als der Verlust von PKD2. Es konnte somit gezeigt werden, dass PKD die Bindung von 14-3-3 Proteinen an SSH1L und damit die subzelluläre Lokalisation und lokale Aktivität der Phosphatase reguliert.

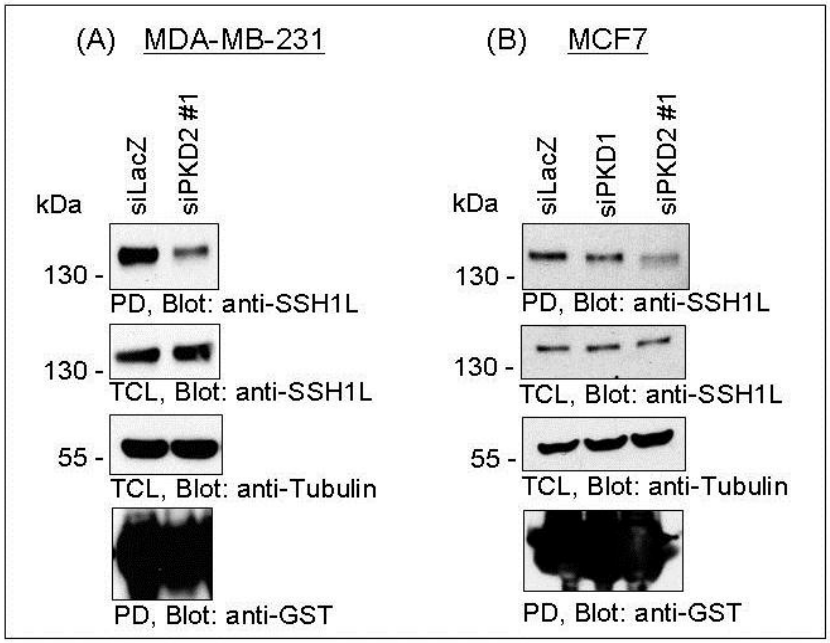

Abb. 4.10 Phosphorylierung von SSH1L durch PKD beeinflusst die Interaktion mit 14-3-3 Proteinen. MDA-MB-231 (A) und MCF7 (B) Zellen wurden mit spezifischen siRNAs gegen PKD1 bzw. PKD2 transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Lysate wurden mit an Glutathion-Sepharose Beads gekoppelten GST-14-3-3β Proteinen inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels eines SSH1L spezifischen Antikörpers detektiert. Die Expression von SSH1L und die Verwendung von gleichen Proteinkonzentrationen wurden durch einen Immunoblot mit SSH1L- und Tubulin-spezifischen Antikörpern verifiziert. Die Detektion von GST erfolgte durch einen GST-spezifischen Antikörper. *PD*, Pulldown. *TCL,* Total Cell Lysate.

Die Depletion von PKD führt zu einer Aktivierung von SSH1L und damit zu einer Dephosphorylierung von Cofilin. Die gleichzeitige Depletion von SSH1L sollte deshalb zu einer Anhebung des Levels von pCofilin führen sowie die durch PKD-Depletion erhöhte Zellmigration inhibieren. Die Ergebnisse in Abbildung 4.11 A und B zeigen, dass in PKD2-depletierten MDA-MB-231 und MCF7 Zellen der Verlust von SSH1L die Reduktion der Cofilin-Phosphorylierung verhindert. Eine Depletion von PKD2 führt, wie bereits gezeigt, zu einem Verlust von pCofilin. In MDA-MB-231 Zellen führt die Depletion von SSH1L zu einer erhöhten Phosphorylierung von Cofilin. In MCF7 Zellen hingegen zeigte die Depletion von SSH1L keinen Effekt auf die Phosphorylierung von Cofilin. Dies lässt darauf schließen, dass SSH1L in MCF7 Zellen schwach exprimiert oder aktiv ist, während in MDA-MB-231 Zellen SSH1L stärker exprimiert bzw. aktiv sein könnte und ein Verlust sich damit signifikant auf die Phosphorylierung von Cofilin auswirkt.

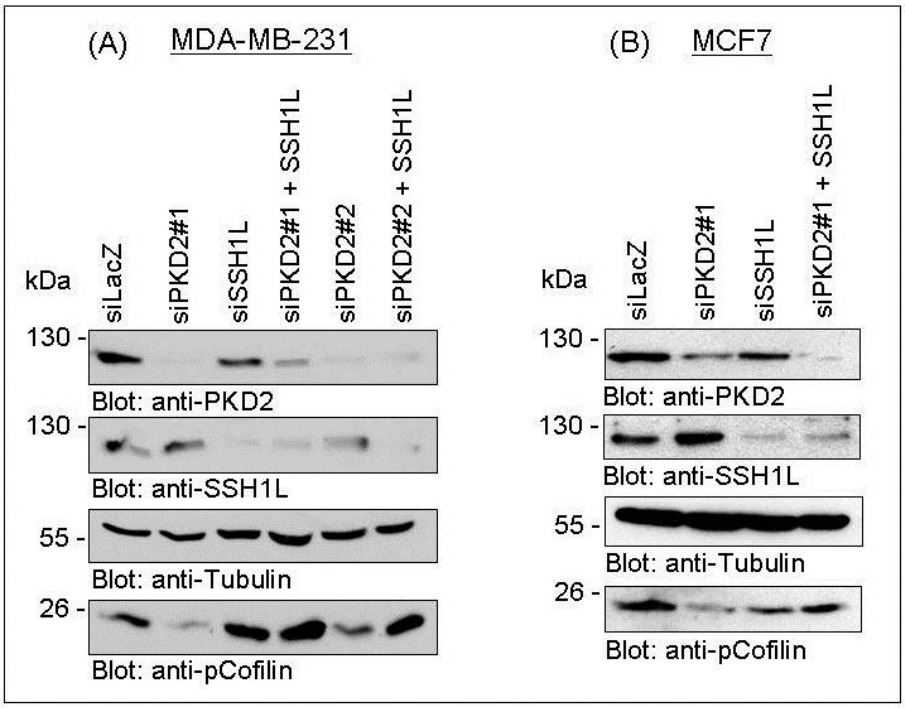

Abb. 4.11 Auswirkung der Depletion von PKD2 und SSH1L auf die Phosphorylierung von Cofilin. MDA-MB-231 (A) und MCF7 (B) Zellen wurden mit spezifischen siRNAs für PKD2 und SSH1L wie unter 3.2.3 beschrieben transfiziert, lysiert und mittels Immunoblotting analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper für PKD2, SSH1L und pCofilin. Der Einsatz gleicher Proteinmengen wurde durch die Detektion von Tubulin verifiziert.

Die Effekte einer gemeinsamen Depletion von PKD2 und SSH1L auf die gerichtete Migration von MCF7 und MDA-MB-231 Zellen wurden mittels Transwell-Filter-Assay untersucht. Die Migration dieser Zellen war vergleichbar mit der von Kontrollzellen, die mit einer siRNA gegen LacZ transfiziert waren. Eine Depletion von PKD2 führte in beiden untersuchten Zelllinien zu einer Steigerung der Migration, wohingegen eine Depletion von SSH1L die Migration von MDA-MB-231 Zellen erniedrigte, in MCF7 Zellen jedoch keinen Einfluss hatte. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass die Stimulation der Migration in PKD-depletierten Zellen mit einer erhöhten Aktivität der Cofilinphosphatase SSH1L zu erklären ist (siehe Abb. 4.12 A und B). Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die basale gerichtete Migration von MDA-MB-231 Zellen SSH1L-abhängig ist, während MCF7 Zellen unabhängig von SSH1L migrieren.

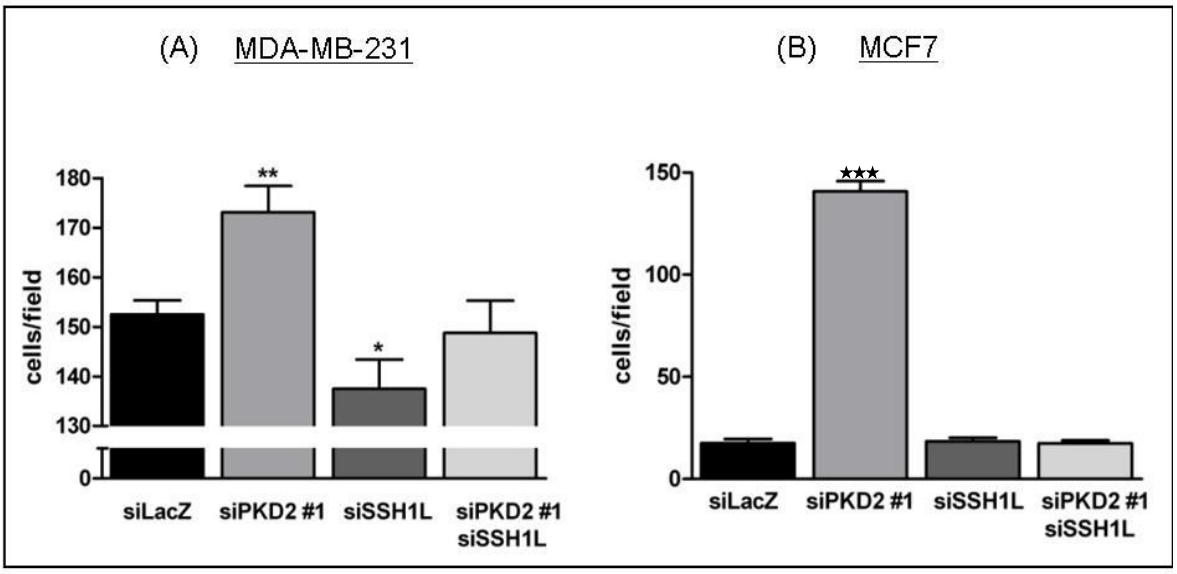

Abb. 4.12 Migration von MDA-MB-231 und MCF7 Zellen, die mit den angegebenen siRNAs transfiziert wurden. MDA-MB-231 (A) und MCF7 (B) Zellen wurden mit spezifischen siRNAs gegen PKD2, SSH1L und einer siRNA gegen LacZ als Kontrolle transfiziert und ein Transwell-Filter-Assay durchgeführt. *Säulen*, Doppelte Transwell-Filteransätze. Die Abbildungen sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente; *Balken*, SEM, *, P < 0,05; **; P < 0,01; ***, P < 0,0001.

4.3 PKD reguliert die Cofilin-Kinase LIMK2 durch Phosphorylierung an Serin 289

Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen aktiven Einfluss von PKD auf die Zellmigration durch die Phosphorylierung der Cofilinphosphatase SSH1L. Weiterhin wurde untersucht, ob die Cofilin-Kinasen LIMK1 und 2 ebenfalls Substrate von PKD sein könnten. Hierzu wurden zunächst die Aminosäuresequenzen von LIMK1 und 2 auf das Vorhandensein möglicher PKD-Konsensusmotive untersucht. Sowohl LIMK1 als auch LIMK2 weisen potentielle Erkennungssequenzen für PKD auf (siehe Abb. 4.13). Serin 323 in LIMK1 wird nach Stimulation der Zellen mit VEGF durch die MAPKAP2-Kinase phosphoryliert (Kobayashi *et al.,* 2006). Die Phosphorylierung von Serin 289 in der LIMK2 wurde erstmals durch Dephoure und Mitarbeiter durch eine massenspektrometrische Analyse des Phosphoproteoms von mitotischen HeLa-Zellen beschrieben (Dephoure *et al.,* 2008). Die für die Phosphorylierung des Serins 289 verantwortliche Kinase ist jedoch unbekannt. In LIMK2 sind darüber hinaus noch zwei weitere potentielle PKD-Zielsequenzen, Serin 310 und 314, vorhanden.

-5	-4	-3	-2	-1	0	
L/I	X	**R**	X	X	**pS**	PKD-Konsensusmotiv
L	G	R	S	E	pS	**LIMK1 Ser323**
L	R	R	S	N	pS	**LIMK2 Ser289**
L	S	R	D	I	pS	**LIMK2 Ser310**
L	S	R	S	E	pS	**LIMK2 Ser314**

Abb. 4.13 Vergleich des PKD-Konsensusmotivs mit den potentiellen PKD Motiven in LIMK1 und LIMK2.

Zunächst wurde mit einem *in vitro* Kinaseassay getestet, ob PKD in der Lage ist LIMK1 und 2 direkt zu phosphorylieren. Hierzu wurden ein FLAG-getagtes Konstrukt von LIMK1 und ein GST-getagtes Konstrukt von LIMK2 in HEK293T Zellen überexprimiert. Zur Vermeidung von Autophosphorylierungen wurden die dominant negativen (DN) Mutanten dieser Proteine verwendet. Die Proteine wurden immunpräzipitiert und mit einem 2 µCi [γ-^{32}P]-ATP-haltigen Phosphorylierungspuffer und gereinigter rekombinanter PKD1 inkubiert. Die Durchführung der *in vitro* Substratphosphorylierung erfolgte wie unter 3.3.4 beschrieben. Die Ergebnisse in Abbildung 4.14 zeigen, dass LIMK2, aber nicht LIMK1 von PKD1 *in vitro* phosphoryliert wird.

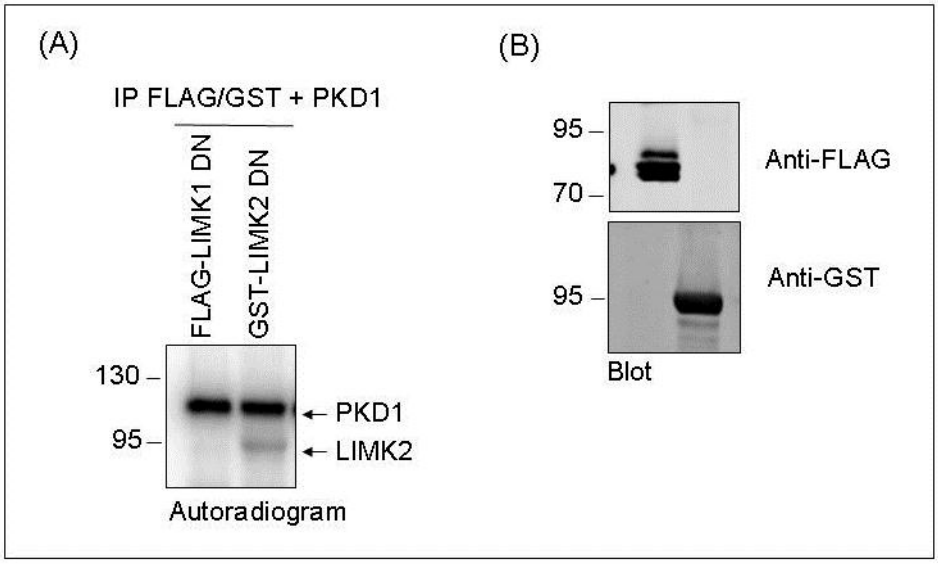

Abb. 4.14 PKD phosphoryliert LIMK2 *in vitro.* FLAG-LIMK1 DN bzw. GST-LIMK2 DN wurden in HEK293T Zellen exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Fusionsproteine mittels eines FLAG- bzw. GST-spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit Kinasepuffer, der [^{32}P]-γ-ATP und gereinigte PKD1 enthielt, inkubiert. Die Einlagerung von radioaktivem Phosphat wurde durch einen Phosphoimager detektiert (*A*). In einem weiteren Schritt wurden FLAG-LIMK1 DN bzw. GST-LIMK2 DN mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines FLAG- bzw. GST-Antikörpers nachgewiesen (B).

In Abbildung 4.15 ist die Domänenstruktur der LIMK2 mit der Position der potentiellen PKD-Konsensusmotive dargestellt. Mittels Quick-Change PCR wurden zunächst die Serine an den Positionen 289 und 314 durch ein Alanin ersetzt. Die Phosphorylierung dieser LIMK2-Mutanten durch PKD wurde erneut mit einem *in vitro* Kinaseassay überprüft (siehe Abb. 4.16). Hierzu wurde zuvor eine Immunpräzipitation der entsprechenden Mutanten der LIMK2 als GFP-Fusion mittels eines spezifischen Antikörpers durchgeführt. Es folgte eine Inkubation des Substrats mit einem 2 µCi [γ-^{32}P]-ATP-haltigen Phosphorylierungspuffer, der ebenfalls gereinigte rekombinante PKD1 oder 2 enthielt. Wie bereits gezeigt, wird LIMK2 von PKD1 und 2 phosphoryliert. Bei einem Austausch von Serin 289 zu Alanin war keine Phosphorylierung von LIMK2 durch PKD1 und 2 zu beobachten. Ein Austausch des Serins 314 zu Alanin zeigte keinen Effekt auf die Phosphorylierung des Proteins (Daten nicht gezeigt). Damit ist eindeutig gezeigt, dass PKD1 und PKD2 Serin 289 in LIMK2 *in vitro* phosphorylieren können. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde auf eine gesonderte Überprüfung des Serins 310 verzichtet.

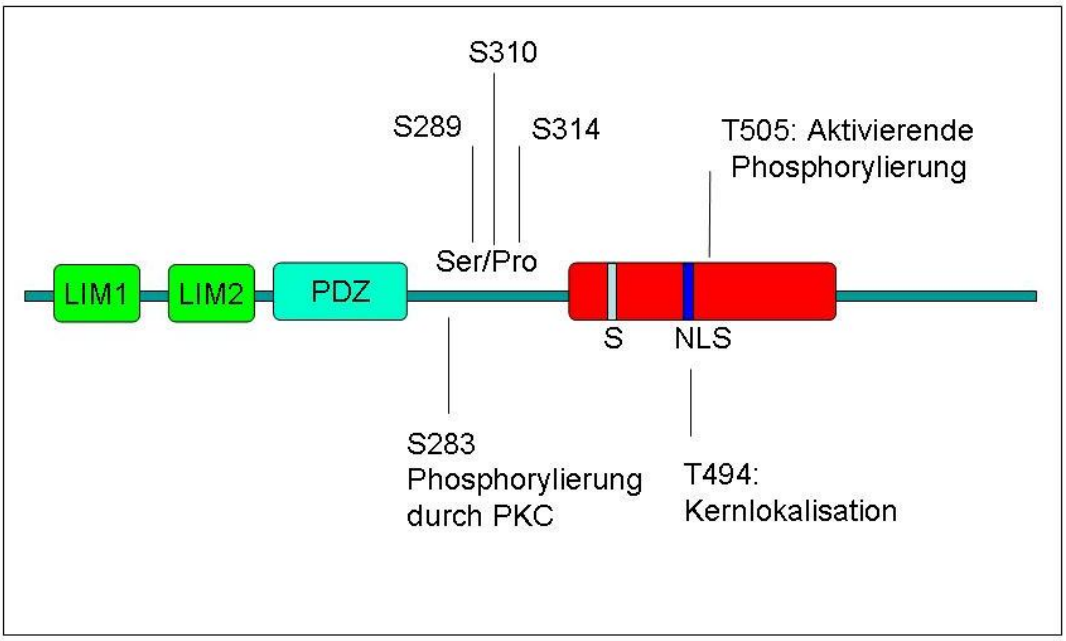

Abb. 4.15 Domänenstruktur der LIMK2 mit möglichen Modifikationen. Die potentiellen PKD-Konsensusmotive an Serin 289, Serin 310 und Serin 314 liegen in der serin- und prolinreichen Region der LIMK2. Das für die Aktivierung der Kinase notwendige Threonin befindet sich an Position 505.

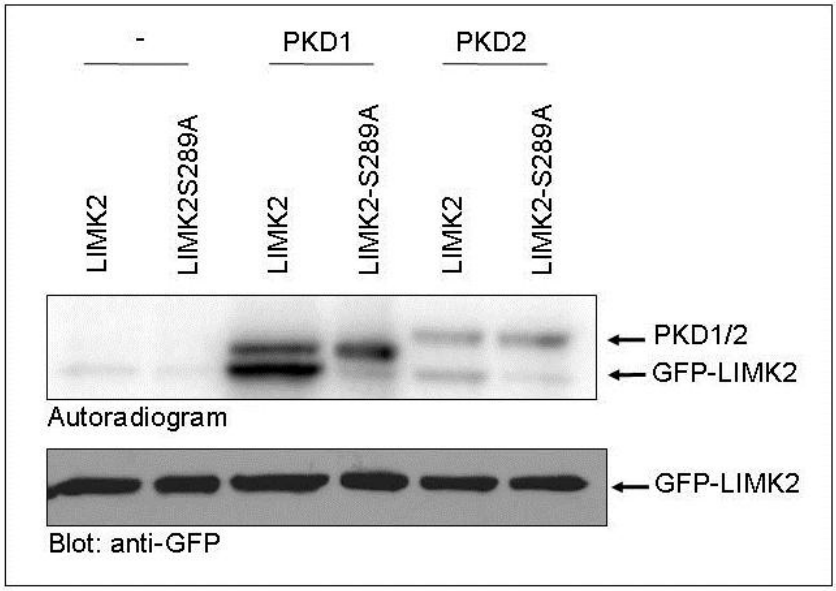

Abb. 4.16 PKD1 und 2 phosphorylieren LIMK2 an Serin 289 *in vitro*. GFP-LIMK2 bzw. GFP-LIMK2 S289A wurden in HEK293T Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Fusionsproteine mittels eines GFP-Antikörpers immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mit Kinasepuffer, der [^{32}P]-γ-ATP enthielt sowie gereinigter PKD1 und PKD2 inkubiert. *(-)* Ansatz ohne Kinase. Die Einlagerung von radioaktivem Phosphat wurde durch einen Phosphoimager detektiert (*oben*). In einem weiteren Schritt wurden GFP-LIMK2 bzw. GFP-LIMK2 S289A mittels Immunoblot unter Verwendung eines GFP-Antikörpers nachgewiesen.

Serin 289 ist Teil eines Motivs, das die Kriterien für die Bindung von 14-3-3 Adapterproteinen (RSXpSXP oder RXXpS) erfüllt (Brummer *et al.,* 2008; Obsilova *et al.,* 2008). Neben dem genannten Motiv sind auch Sequenzen wie RX(C/Y)XpSXP oder RXXpTXP als mögliche Bindungsmotive beschrieben worden, die allerdings hier nicht zutreffen (Obsilova *et al.,* 2008; Kostelecky *et al.,* 2009). Im Folgenden wurde überprüft, ob die Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289 die Bindung von 14-3-3 Adapterproteinen ermöglicht. Hierfür wurden die LIMK2 WT und die S289A Mutante als GFP-Fusion in HEK293T Zellen überexprimiert. Mit den Lysaten der Zellen wurde ein GST-14-3-3β Pulldown-Assay durchgeführt (siehe Abb. 4.17). Der Nachweis der GFP-LIMK2 WT und GFP-LIMK2 S289A Expression erfolgte mittels eines spezifischen Antikörpers. Als Ladungskontrolle diente dabei Tubulin. Der Einsatz gleicher Mengen GST-14-3-3β Beads wurde durch Visualisierung von GST auf der Membran durch eine Ponceau-Färbung sichergestellt. Die in Abbildung 4.17 gezeigten Ergebnisse zeigen eine Interaktion zwischen LIMK2 WT und 14-3-3β Proteinen. Die S289A Mutante konnte dagegen nicht mehr mit den GST-14-3-3β Beads präzipitiert werden. Dies zeigt, dass die Phosphorylierung an Serin 289 entscheidend für die Interaktion der LIMK2 mit 14-3-3β Proteinen ist.

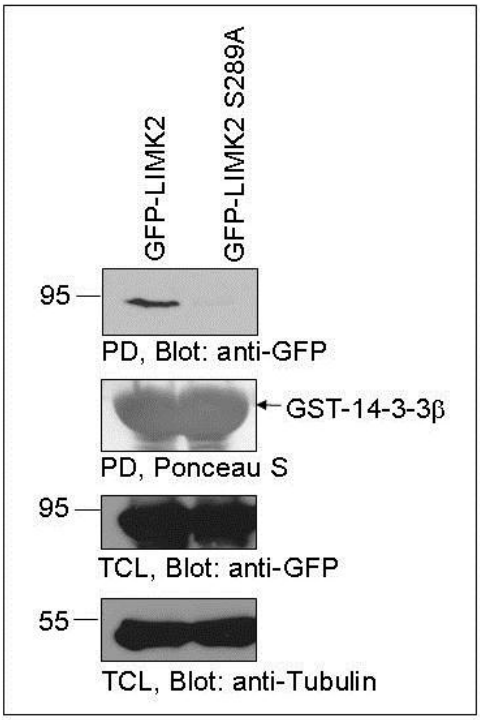

Abb. 4.17 LIMK2 interagiert mit 14-3-3β Proteinen. GFP-LIMK2 WT und GFP-LIMK2 S289A wurden in HEK293T Zellen überexprimiert. Die Lysate wurden mit GST-14-3-3β Proteinen inkubiert, die an Glutathion-Sepharose Beads gekoppelt waren. Die Detektion von GFP-LIMK2 und GFP-LIMK2 S289A erfolgte mittels eines GFP-spezifischen Antikörpers. Die Verwendung gleicher Proteinmengen wurde durch einen Tubulin-spezifischen Antikörper verifiziert. Die Detektion von GST erfolgte durch eine Färbung mit Ponceau-Rot.

Im nächsten Schritt wurde analysiert, ob die beobachtete Interaktion zwischen LIMK2 und 14-3-3β Proteinen von PKD reguliert wird. PKD1 und 2 wurden mittels siRNA in HEK293T Zellen depletiert und LIMK2 WT als GFP-Fusion in die Zellen transfiziert. Nach der Lyse der Zellen erfolgte erneut ein Pulldown-Assay mit an Glutathion-Sepharose Beads gekoppelten GST-14-3-3β Proteinen. Die Analyse, der an die Beads gebundenen GFP-LIMK2-Proteine erfolgte über einen Western Blot (siehe Abb. 4.18). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Depletion der beiden PKD Isoformen zu einer signifikant verringerten Bindung von LIMK2 an 14-3-3β Proteinen führt. Dies zeigt, dass PKD für die Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289 und die damit verbundene Interaktion mit 14-3-3β Proteinen in Zellen verantwortlich ist.

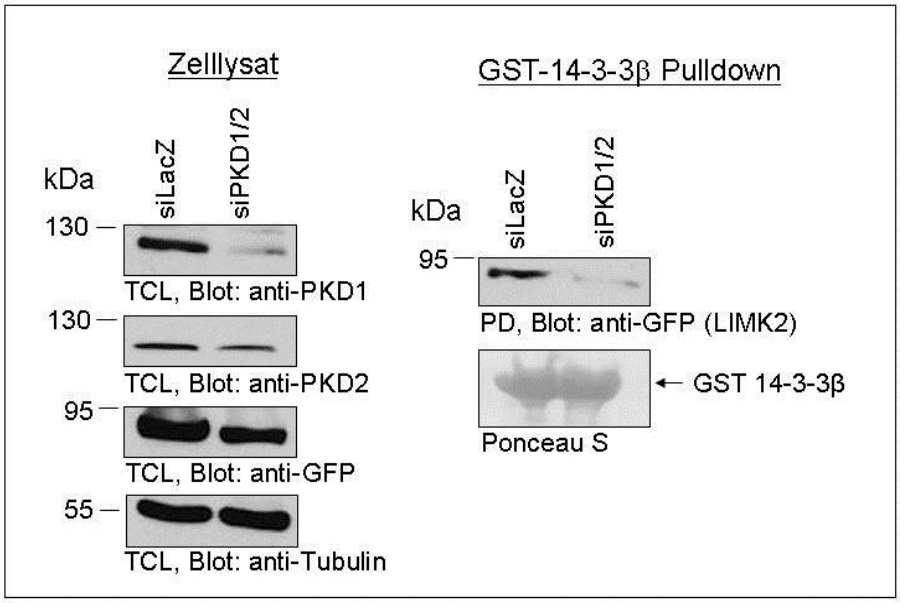

Abb. 4.18 PKD-abhängige Interaktion von LIMK2 mit 14-3-3β Proteinen. HEK293T Zellen wurden mit PKD1 und 2 spezifischen siRNAs transfiziert. In einem weiteren Schritt wurde GFP-LIMK2 WT in den Zellen überexprimiert. Es erfolgte die Lyse der Zellen nach 24 h und eine Inkubation der Lysate mit an Glutathion-Sepharose Beads, an die GST-14-3-3β Proteine gekoppelt waren. Die Detektion der LIMK2 erfolgte über einen GFP-spezifischen Antikörper. Die Effizienz der Knock-Downs und die Verwendung von gleichen Proteinmengen wurde durch einen Immunoblot und Antikörper gegen PKD1, 2 und Tubulin sichergestellt. Die Detektion von GST erfolgte durch eine Färbung mit Ponceau-Rot.

Die Bindung von 14-3-3 Proteinen kann unter anderem die Lokalisation eines Proteins beeinflussen. Beispielsweise kann durch 14-3-3 Proteine eine NLS maskiert und damit die Kerntranslokation des Interaktionspartners verhindert werden (HDAC-Proteine, Nishino *et al.*, 2008). Dies wurde bereits für einige PKD-Substrate beschrieben (HDAC5/7 bzw. DLC1 und CERT). Interessanterweise besitzt LIMK2 eine potentielle NLS (siehe Abb. 4.15). Ferner reguliert die PKC-vermittelte Phosphorylierung von Serin 283 die Kerntranslokation der Kinase (Scholz *et al.,* 2009, Fugmann *et al.,* 2007; Vega *et al.,* 2004; Dequiet *et al.,* 2005; Matthews *et al.,* 2006). Es ist deshalb denkbar, dass eine Phosphorylierung von Serin 289 ebenfalls die Lokalisation der LIMK2 beeinflusst. Um die Auswirkungen der Expression der LIMK2 S289A auf die Lokalisation und Zellmorphologie zu untersuchen wurden COS7 Zellen mit einem Plasmid für GFP-LIMK2 und GFP-LIMK2 S289A transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen wie beschrieben fixiert und permeabilisiert. Das Aktinzytoskelett wurde mit Alexa633-markiertem Phalloidin angefärbt. Abbildung 4.19 zeigt, dass LIMK2 WT und die S289A Mutante diffus im Zytoplasma und im Kern verteilt sind und es keine Anreicherung von LIMK2 S289A im Kern gibt. Die Phosphorylierung von Serin 289 scheint demnach nicht die Lokalisation der LIMK2 zu beeinflussen. Sowohl die wildtypische LIMK2 als auch die S289A Mutante kolokalisieren mit F-Aktin (siehe Abb. 4.19), darüber hinaus sind durch die Expression von LIMK2 S289A keine Veränderungen des Aktinzytoskelett im Vergleich zu LIMK2 WT sichtbar.

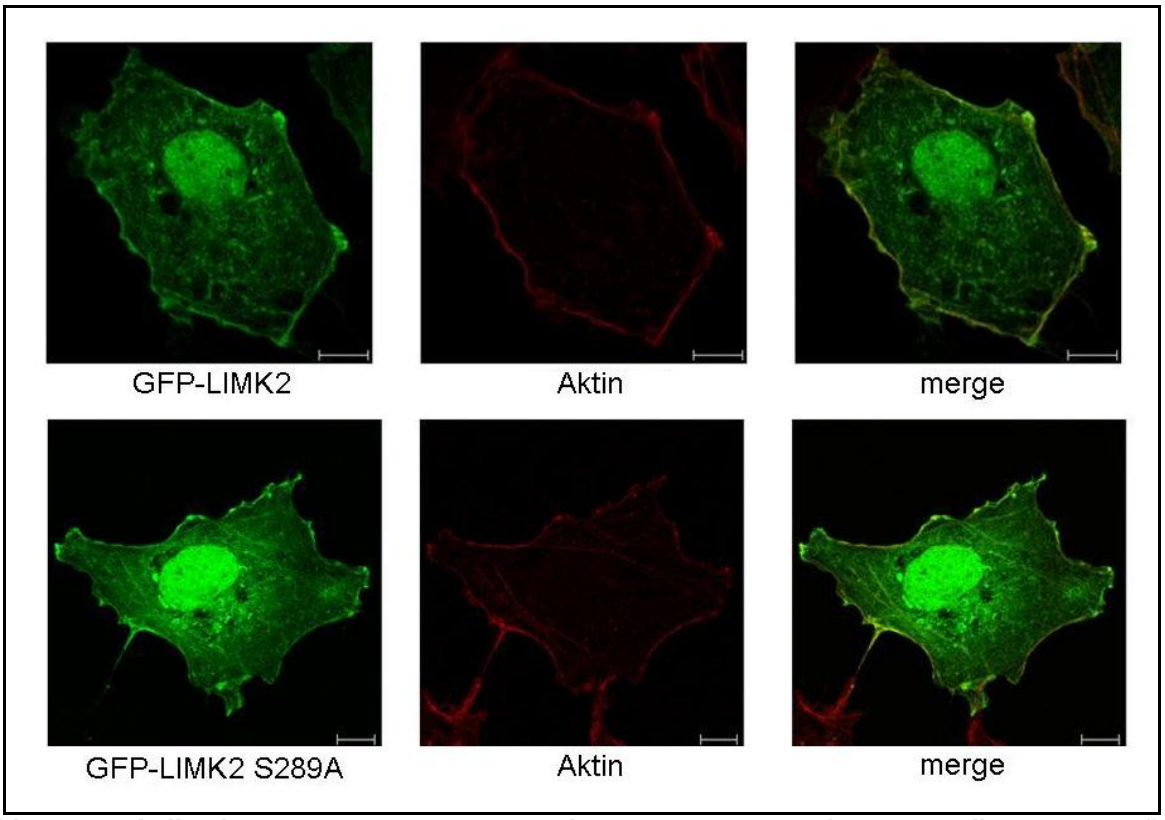

Abb. 4.19 Lokalisation von GFP-LIMK2 WT und GFP-LIMK2 S289A in COS7 Zellen. COS7 Zellen wurden auf einem Deckglas ausplattiert und wie unter 3.3.2 beschrieben mit einem Plasmid für GFP-LIMK2 (oben) bzw. GFP-LIMK2 S289A (unten) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und am konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert. Die Visualisierung des Aktinzytoskeletts erfolgte durch Alexa633 gekoppeltes Phalloidin. *Scale bar:* 10 µm.

4.4 Generierung und Reinigung eines phospho-Serin 289 spezifischen Antikörpers

Für die Untersuchung der Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289 wurde in Kaninchen ein spezifischer Antikörper gegen das entsprechende Epitop hergestellt. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Firma Pineda (Berlin) durchgeführt. Die Immunisierung der Tiere mit dem Peptid umfasste 120 Tage. Alle 30 Tage wurde den Tieren Blut entnommen und das Serum auf das Vorliegen und die Funktionalität des phosphospezifischen Antikörpers überprüft. Hierfür wurden Verdünnungen des Serums im Verhältnis 1:1000 in einem Western Blot eingesetzt. Aus dem Serum, welches den funktionalen Antikörper enthielt, wurde dieser mittels Affinitätschromatographie isoliert.

4.4.1 Reinigung und Funktionalitätstest des phosphospezifischen LIM-Kinase Serin 289 Antikörpers aus Kaninchenserum

Die Überprüfung der Seren auf die Existenz eines funktionalen Antikörpers gegen phosphoryliertes Serin 289 der LIMK2 erfolgte durch Western Blot Analyse. Hierzu wurden Lysate aus HEK293T Zellen erstellt, die zuvor mit einem Leervektor als Kontrolle sowie der LIMK2 WT und der Mutante S289A als GFP-Fusion transfiziert wurden. Für alle Tests wurden die gleichen Lysate verwendet. Die Überprüfung der Expression der Fusionsproteine

erfolgte über die Detektion von GFP. Der Test auf Funktionalität des Antikörpers erfolgte durch Verwendung des isolierten Serums als Primärantikörper gegen Serin 289 der LIMK2. Der phosphospezifische Antikörper sollte die wildtypische Version der LIMK2, nicht jedoch LIMK2 S289A erkennen. In Abbildung 4.20 sind die Ergebnisse der Tests zusammengefasst. Das Serum aus Tier 1 zeigt, dass der gebildete Antikörper erwartungsgemäß den Wildtyp der LIMK2, jedoch nicht die Mutante S289A erkennt. In Tier 2 detektiert der gebildete Antikörper sowohl den Wildtyp der LIMK2 als auch die S289A Mutante. Das Serum aus Tier 3 wies keinen funktionalen Antikörper auf.

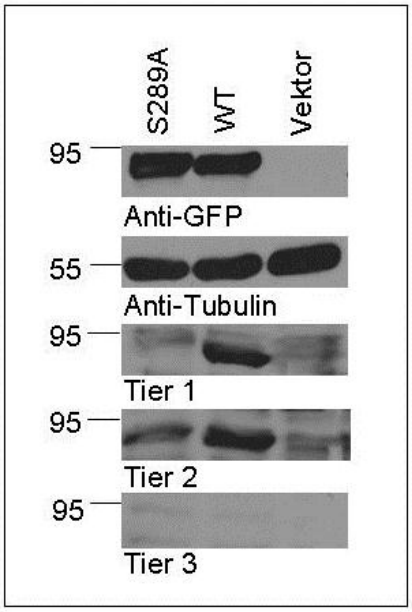

Abb. 4.20 Überprüfung der Seren auf Vorliegen und Funktionalität des Antikörpers gegen pS289 in LIMK2 nach 96 Tagen Immunisierung. In HEK293T Zellen wurden GFP-LIMK2 WT, GFP-LIMK2 S289A sowie ein Kontrollvektor exprimiert und die Zellen nach 24 h lysiert. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Expression der GFP-LIMK2 Proteine mit einem GFP-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Gleiche Proteinmengen wurden mit Tubulindetektion sichergestellt. Weiterhin wurde die Membran mit dem Kaninchenserum aus Tier 1, 2 und 3 inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen gegen Kaninchen gerichteten sekundären POD gekoppelten Antikörper.

Für die Reinigung des pS289-spezifischen Antikörpers wurde das Serum von Tier 1 verwendet. Die Seren aus den beiden anderen immunisierten Tieren eignen sich hierzu nicht, da der gebildete Antikörper entweder nicht phosphospezifisch ist (Tier 2) oder das Serum keinen Antikörper enthielt (Tier 3). Für die Reinigung des Antikörpers aus dem Serum von Tier 1 wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt (siehe 3.3.7). Hierzu wurde das Peptid, mit dem auch die Tiere immunisiert wurden, an Epoxy-aktivierte Sepharose 6B Beads gekoppelt. Die Überprüfung der Funktionalität des gereinigten Antikörpers erfolgte mittels eines Western Blots. Hierfür wurden erneut Lysate aus HEK293T Zellen verwendet, die zuvor mit Konstrukten für GFP-LIMK2 WT oder GFP-LIMK2 S289A transfiziert wurden. Den Erwartungen entsprechend konnte der Antikörper das entsprechende Epitop im Wildtyp der LIMK2 erkennen. Im Fall der S289A Mutante war hingegen kein Signal detektierbar.

Somit konnte die Phosphospezifität des Antikörpers verifiziert werden (siehe Abb. 4.21). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in wachsenden Zellen LIMK2 an Serin 289 phosphoryliert ist.

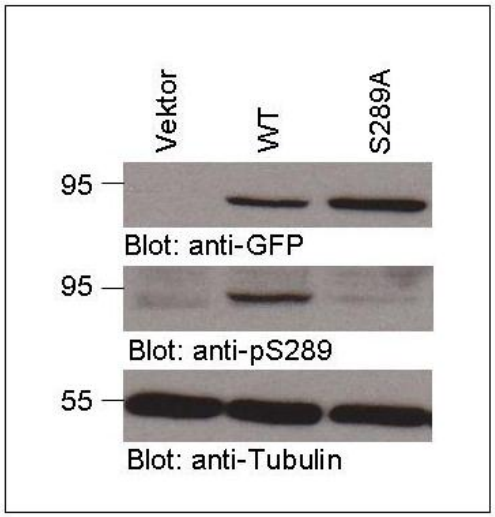

Abb. 4.21 Funktionstest des gereinigten phosphospezifischen Antikörpers gegen pS289 in LIMK2. GFP-LIMK2, GFP-LIMK2 S289A sowie ein Kontrollvektor wurden in HEK293T Zellen transfiziert und die Zellen nach 24 h lysiert. Die Proteine der Lysate wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem phosphospezifischen Antikörper gegen pS289 inkubiert. Die Überprüfung der Expression der Konstrukte erfolgte durch einen Antikörper gegen GFP. Die Verwendung gleicher Proteinmengen wurde durch einen Antikörper gegen Tubulin verifiziert. Die Detektion erfolgte mittels POD gekoppelter Antikörper.

4.4.2 Funktionsanalyse der Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289

LIM-Kinasen sind fundamentale Regulatoren des Aktinzytoskeletts (Bernard, 2007). Die Aktivität der LIMK führt zu einer Zunahme von Stressfibern in der Zelle, wohingegen eine Abschaltung der LIMK zu deren Abnahme führt (Maekawa *et al*., 1999; Bernard, 2007). LIM-Kinasen regulieren durch Phosphorylierung den Aktindepolymerisationsfaktor Cofilin (Bernard, 2007). Die Depletion von PKD hingegen reduziert die Phosphorylierung von Cofilin. Eine PKD-vermittelte Phosphorylierung von LIMK2 sollte daher die Aktivität der LIMK2 erhöhen, während die Mutation des Serins 289 zu einem Alanin die Aktivität der LIMK2 reduzieren sollte. Zunächst wurde daher der Einfluss der Expression von LIMK2 WT und der S289A Mutante auf die Phosphorylierung von Cofilin untersucht. Hierzu wurden der Wildtyp und die Mutante jeweils als GFP-Fusion sowie ein Kontrollvektor in HEK293T Zellen exprimiert und die Phosphorylierung von Cofilin durch einen spezifischen Antikörper untersucht. Die Expression der wildtypischen LIMK2 führte wie erwartet zu einem starken Anstieg an pCofilin im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Expression der S289A Mutante hingegen führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer leichten Abnahme der Cofilin Phosphorylierung (siehe Abb. 4.22). Dies lässt darauf schließen, dass die Phosphorylierung von Serin 289 aktivierend auf die Kinase wirkt.

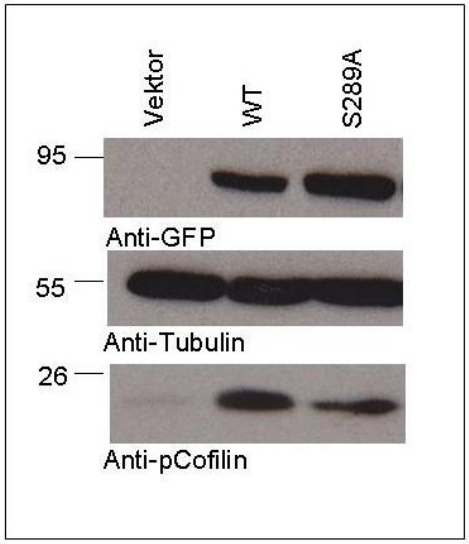

Abb. 4.22 Auswirkung der Überexpression von LIMK2 WT und LIMK2 S289A auf pCofilin. HEK293T Zellen wurden mit Konstrukten für GFP-LIMK2 WT, GFP-LIMK2 S289A sowie einem Kontrollplasmid transfiziert und nach 24 h lysiert. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Expression beider Konstrukte durch einen GFP-Antikörper überprüft. Die Auswirkung der Expression beider Konstrukte auf pCofilin wurde mittels eines spezifischen Antikörpers gegen an Serin 3 phosphoryliertes Cofilin überprüft. Die Verwendung gleicher Proteinmengen wurde durch die Detektion von Tubulin verifiziert.

Des Weiteren wurde die Auswirkung einer Überexpression von LIMK2 und der Mutante S289A auf die gerichtete Zellmigration untersucht. Hierzu wurde LIMK2 WT und LIMK2 S289A als GFP-Fusion in den Tumorzelllinien HeLa und MCF7 überexprimiert und ein Transwell-Filter-Assay durchgeführt. Im Vergleich zu vektortransfizierten Kontrollzellen führte eine Überexpression der LIMK2 zu einer Abnahme der Zellmigration. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Literatur (Sumi *et al.,* 2006). Hier wurde durch Überexpression von LIMK2 eine verstärkte Ausbildung von Adhäsionsstrukturen und Stressfibern beobachtet, was auf eine verringerte Migration schließen lässt. Die Expression der S289A Mutante zeigte dagegen in Hela-Zellen keinen und in MCF7 Zellen sogar einen leicht positiven Effekt im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe Abb. 4.23). Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Phosphorylierung von Serin 289 durch PKD die LIMK2 Aktivität positiv reguliert.

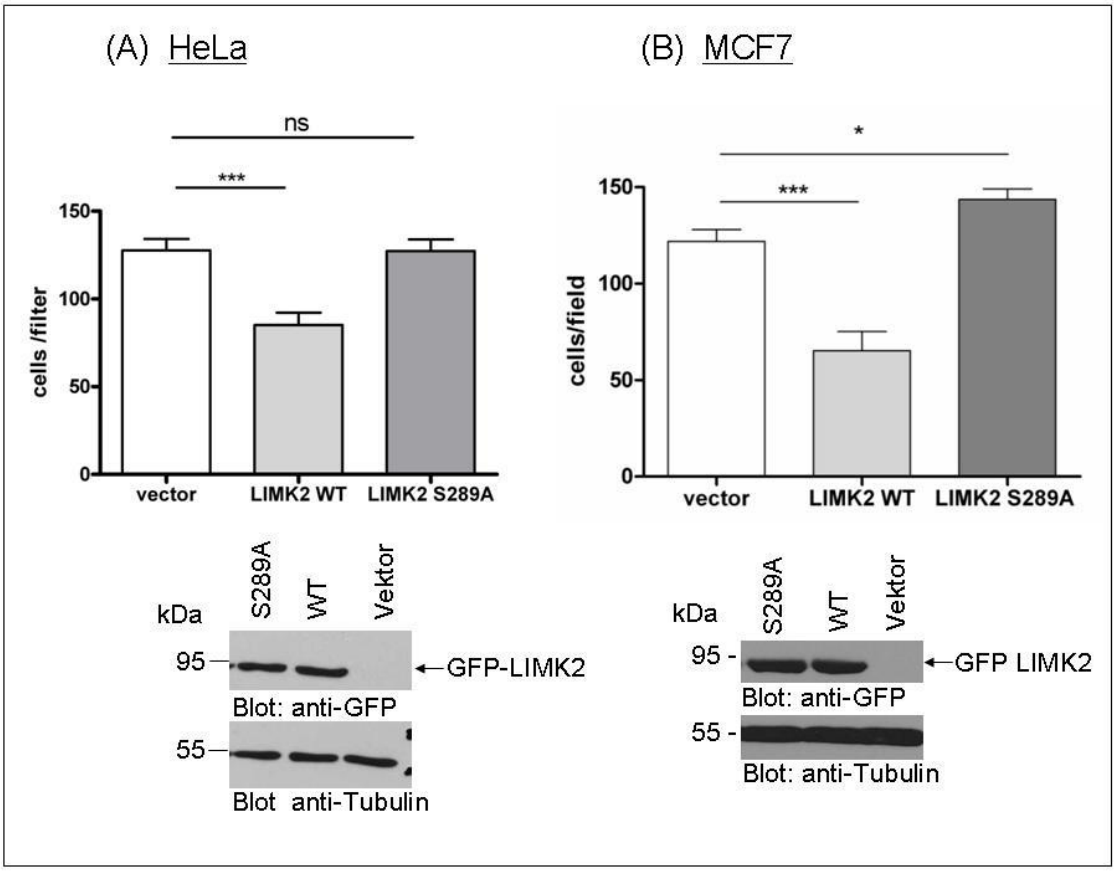

Abb. 4.23 Negative Regulation der Zellmigration von LIMK2 nach PKD induzierter Phosphorylierung in HeLa und MCF7 Zellen. HeLa (A) und MCF7 Zellen (B) wurden mit GFP-LIMK2 WT, GFP-LIMK2 S289A und dem Vektor pCR3.V62-Met-FLAG als Kontrolle transfiziert und ein Transwell-Filter-Assay wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt. *Säulen*: Darstellung von Doppelwerten. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. *Balken*, SE, *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,0001$. Für den Versuch wurde ein Gradient von 0% - 10% FCS verwendet. Pro Filter kamen 5 x 10^4 Zellen zum Einsatz. (unten) Die Kontrolle der Expression der Konstrukte erfolgte mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines GFP-Antikörpers. Die Verwendung gleicher Zellzahlen wurde durch die Detektion von Tubulin sichergestellt.

Abschließend wurden verschiedene invasive und nichtinvasive Brustkarzinomzelllinien auf die Expression der LIM-Kinase Isoformen 1 und 2, PKD1 und 2, SSH1L sowie auf den Gehalt von phosphoryliertem Cofilin analysiert. Von besonderer Relevanz war es, ein Zellsystem zu finden, in welchem ein direkter Einfluss von PKD auf LIMK2 untersucht werden konnte. Hierzu wurden von den verschiedenen Zelllinien Lysate erstellt und diese mittels eines Western Blots auf die Expression der genannten Proteine untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. HEK293T Zellen dienten dabei als Kontrolle. Die Verwendung gleicher Proteinmengen wurde durch die Detektion von Tubulin als Ladekontrolle sichergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.24 dargestellt. Generell kann festgestellt werden, dass eine hohe Expression von SSH1L mit einem niedrigen pCofilin-Level korreliert, Zellen in denen SSH1L nur schwach exprimiert wird oder nicht nachweisbar ist weisen dagegen einen hohen pCofilin-Level auf. Damit wäre die SSH1L Expression ein entscheidender Faktor für die Aktivität von Cofilin. Interessanterweise

weisen sowohl HEK293T als auch MDA-MB-231 Zellen ein hohes Migrationspotential auf, während MCF7, MDA-MB-468 und SKBR3 ein eher niedriges Migrationspotential besitzen (siehe Abb. 4.4 und persönliche Mitteilung J. Heering). Dies könnte darauf hinweisen, dass der Gehalt an pCofilin entscheidend für die Migration ist. Weiterhin ist ersichtlich, dass LIMK2 die ubiquitär exprimierte Isoform in den untersuchten Zelllinien ist, LIMK1 dagegen eher differentiell exprimiert wird. Im Gegensatz zu SSH1L kann kein Rückschluss von LIMK-Expression auf den pCofilin-Gehalt gezogen werden, da in einigen Zellen, die eine hohe LIMK2 Expression aufweisen, pCofilin nicht nachweisbar ist (MDA-MB-231 und HEK293T). Auffällig ist eine selektive Expression von PKD1 und PKD2, die mit Literaturdaten korreliert (Eiseler *et al.*, 2009a). Interessanterweise ist keine klare Korrelation zwischen der PKD-Expression und dem pCofilin Gehalt ersichtlich, hier wäre eine Analyse der Phosphorylierungszustände von SSH1L und LIMK2 und damit ein Rückschluss auf deren Aktivität wichtig. Abschließend könnten MDA-MB-468 Zellen sich für eine detaillierte Analyse der funktionellen Konsequenzen der PKD-vermittelten LIMK2 Phosphorylierung besonders eignen, da aufgrund der Abwesenheit von SSH1L hier der direkte Einfluss von PKD2 und LIMK2 auf pCofilin untersucht werden kann.

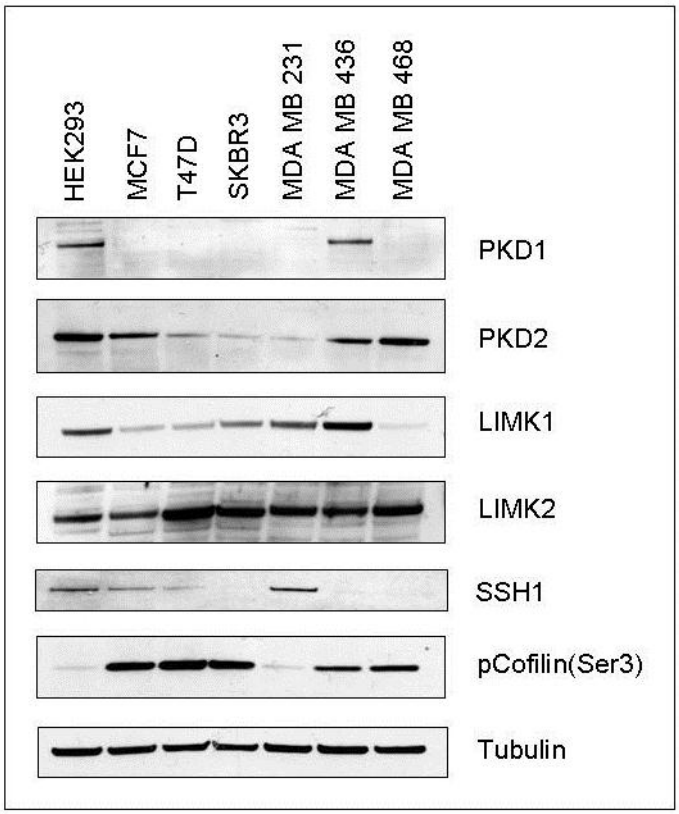

Abb. 4.24 Expression von PKD1/2, LIMK1/2, SSH1L und pCofilin in unterschiedlichen Tumorzelllinien. Diverse Tumorzelllinien sowie HEK293T Zellen als Kontrolle wurden lysiert und zelluläre Proteine mittels Immunoblotting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der einzelnen Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die Verwendung gleicher Proteinmengen wurde durch die Detektion von Tubulin verifiziert.

5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte die Cofilinphosphatase SSH1L als neues Substrat von PKD identifiziert werden. Sowohl *in vitro* als auch in intakten Zellen konnte gezeigt werden, dass PKD1 und PKD2 die Serine 937 und 978 in SSH1L phosphorylieren und somit eine Bindung der Phosphatase an 14-3-3 Proteine induzieren. Diese Bindung führt zu einer Translokation von SSH1L in das Zytosol und inhibiert dadurch die Dephosphorylierung von Cofilin an aktinreichen Strukturen des Lamellipodiums. Die Depletion von PKD1 und 2 mittels spezifischer siRNAs resultierte in Abhängigkeit von SSH1L in einem reduzierten zellulären Gehalt an phosphoryliertem Cofilin und einer gesteigerten Zellmigration. Diese Daten wurden durch eine unabhängige, zeitgleiche Publikation bestätigt (Eiseler *et al.*, 2009 b). Darüber hinaus konnte für PKD eine Funktion bei der Regulation der Cofilin-Kinase LIMK2 gezeigt werden. PKD phosphoryliert LIMK2 *in vitro* und in intakten Zellen an Serin 289, was ebenfalls eine Bindung an 14-3-3 Proteinen zur Folge hat. Die Überexpression der phosphorylierungsdefizienten LIMK2 S289A führte zu einem deutlich reduzierten Anstieg von phosphoryliertem Cofilin im Vergleich zum wildtypischen LIMK2 Protein. Gleichermaßen war die Zellmigration durch Überexpression von LIMK2 WT stark reduziert, während die Überexpression der LIMK2 S289A keinen Effekt hatte. Diese Ergebnisse lassen auf eine aktivierende Wirkung der PKD-vermittelten Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289 schließen. Somit wurde in dieser Arbeit PKD als zentraler Regulator der Cofilin-abhängigen Zellmigration identifiziert.

5.1 Negative Regulation der gerichteten Zellmigration durch PKD

Durch Eiseler und Mitarbeiter (Eiseler *et al.,* 2007) wurde gezeigt, dass eine Überexpression der wildtypischen PKD1 zu einer Inhibition gerichteter Zellmigration führt. Die Überexpression einer kinasetoten Variante hatte hingegen eine gesteigerte Zellmigration zur Folge. Diese Ergebnisse bestätigten Studien zur PKD-Funktion in Prostatakarzinomzellen der Linie LNCaP (Jaggi *et al.,* 2005). In dieser Arbeit konnte der negative Einfluss von PKD auf die gerichtete Zellmigration durch Depletion der PKD Isoformen 1 und 2 mittels spezifischer siRNAs in den Brustkarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF7 bestätigt werden. Interessanterweise reagierten MCF7 Zellen wesentlich sensitiver auf die Depletion von PKD2, die im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einem 10-fachen Migrationsanstieg führte. Ein Verlust von PKD1 resultierte dagegen lediglich in einem 3-fachen Anstieg der gerichteten Migration (siehe Abb. 4.4). In MDA-MB-231 als auch in MCF7 Zellen ging eine Depletion der jeweiligen PKD Isoform mit einer starkem Verlust der Cofilin-Phosphorylierung einher (siehe Abb. 4.11). Auch hier waren in MCF7 Zellen die Effekte der Depletion von PKD2 wesentlich stärker als nach Depletion von PKD1. Eine Erklärung könnte der Expressionslevel von PKD1 liefern, der vermutlich wesentlich geringer ist als der von PKD2.

Tatsächlich ist in vielen invasiven Tumorzelllinien die PKD1-Expression stark verringert (Kim *et al.,* 2008; Eiseler *et al.,* 2009 a). Durch eine vergleichende Analyse verschiedener Brustkrebszelllinien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PKD2 eine eher ubiquitäre Expression aufweist, während PKD1 überwiegend nicht exprimiert wurde (siehe Abb. 4.24). Diese Beobachtungen stimmen mit den publizierten Daten überein und lassen darüber hinaus vermuten, dass PKD2 in Brustkarzinomzellen von besonderer Bedeutung für die Steuerung der Migration und Invasion sein könnte. Die hochinvasive Brustkarzinomzelllinie MDA-MB-231 exprimiert lediglich PKD2. Die Auswirkung der Depletion von PKD2 führte in diesen Zellen ebenfalls zu einer gesteigerten Migration. Der Effekt war hier jedoch wesentlich schwächer als in MCF7 Zellen. Diese Beobachtung kann mit einem hohen basalen Migrations- und invasionspotential der MDA-MB-231 Zellen erklärt werden. In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass die PKD2 Menge in diesen Zellen im Vergleich zu MCF7 Zellen stark reduziert ist, weshalb eine weitere Depletion von PKD2 mittels siRNA weniger signifikante Auswirkungen haben könnte als bei MCF7 Zellen. Durch mikroskopische Studien konnten des Weiteren morphologische Veränderungen der PKD-depletierten MCF7 Zellen beobachtet werden. Die Depletion von PKD1 oder PKD2 resultierte in einer Zunahme der Ausbreitungsfläche einer Zelle. Ferner war eine verstärkte Ausbildung von Lamellipodien sowie eine Auflösung von Zellverbänden zu beobachten. Diese morphologischen Veränderungen entsprechen den ersten Phasen einer Metastasierung, wie z.B. das Lösen der Zellen aus dem Verbund und der Ausbildung von aktinreichen Strukturen (Vignjevic & Montagnac, 2008; Thiery *et al.,* 2002; Brabletz *et al.,* 2005). Interessanterweise konnten Jaggi und Mitarbeiter zeigen, dass PKD1 E-Cadherin phosphoryliert und somit Zell-Zell-Kontakte fördert. Die Überexpression von PKD1 führte daher zu einer verstärkten Aggregation der Zellen und einer verringerten Zellmigration. Eine Inhibition von PKD1 durch Gö9676 führte hingegen zu einer Abnahme von Zell-Zell-Kontakten und einem Anstieg der Zellmigration (Jaggi *et al.,* 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass PKD ebenfalls für die Phosphorylierung von β-Catenin verantwortlich ist. Eine Mutation der Threonine 112 und 120 führte zu einer verstärkten Lokalisation von β-Catenin im Kern sowie Aktivität bei der Transkription. Die Überexpression von PKD resultierte hingegen in einer verringerten Aktivität von β-Catenin und verringerte seine Aktivität sowohl in der Transkription, als auch in der Zellproliferation (Du *et al.,* 2009). Die in den beiden Publikationen gezeigten Ergebnisse zeigen deutlich, dass PKD die Zell-Zell-Adhäsion, Migration und Proliferation negativ reguliert. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen. Auch hier führte eine Depletion von PKD zu einer verstärkten Migration und einer Auflösung von Zell-Zell-Kontakten (siehe Abb. 4.5).

5.2 PKD als regulierende Kinase der Cofilinphosphatase SSH1L

Eine Depletion von PKD führte unmittelbar zu einem Verlust der Cofilin-Phosphorylierung. Die Frage, über welchen Interaktionspartner PKD auf die Cofilin-Phosphorylierung und damit dessen Aktivität wirkt, blieb jedoch zunächst ungeklärt. Nagata-Ohashi und Mitarbeiter konnten die Aktivierung der Zellmigration durch die SSH1L-abhängige Dephosphorylierung von Cofilin zeigen (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). Sie identifizierten in SSH1L die Serine 937 und 978, die im phosphorylierten Zustand Teil eines 14-3-3 Bindungsmotivs sind. Die Phosphorylierung der beiden Serine induziert die Bindung von SSH1L an 14-3-3 Proteine, die dann die Phosphatase im Zytosol zurückhalten. Nach Stimulation der Zellen mit einem Wachstumsfaktor (z.B. Neuregulin) wird SSH1L über einen Rac1-abhängigen Signalweg dephosphoryliert und dissoziiert von 14-3-3 Proteinen. SSH1L bindet an Aktinfilamente und dephosphoryliert daran gebundenes pCofilin. Interessanterweise korreliert das Bindungsmotiv der Cofilinphosphatase SSH1L für 14-3-3 Proteine mit dem PKD-Konsensusmotiv. Ferner binden einige PKD-Substrate wie z.B. PI4KIIIβ, RIN1, HDAC5 ebenfalls an 14-3-3 Proteine (Wang *et al.,* 2006; Hausser *et al.,* 2006, Grozinger *et al.,* 2000; Nishino *et al.,* 2008; Matthews *et al.,* 2006). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass SSH1L *in vitro* und intakten Zellen ein Substrat von PKD ist (Abb. 4.8 und Abb. 4.9). SSH1L wurde durch PKD1 und PKD2 *in vitro* phosphoryliert. Darüber hinaus verringerte sowohl in MCF7 als auch in MDA-MB-231 Zellen die Depletion von PKD1/2 die Bindung von SSH1L an 14-3-3β Proteine. Nagata-Ohashi und Mitarbeiter beobachteten außerdem eine erhöhte Lokalisation von SSH1L S2937/978A an aktinreichen Strukturen der Zelle sowie die zytosolische Lokalisation der wildtypischen SSH1L (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). Eine Koexpression von kinasetoter PKD2 und SSH1L WT führte, wie bei der Expression von SSH1L S937/978A, zu einer verstärkten Lokalisation von SSH1L WT an aktinreiche Strukturen. Dies lässt darauf schließen, dass kinasetote PKD2 dominant-negativ auf endogene PKD1 bzw. 2 wirkt und damit die Phosphorylierung von SSH1L inhibiert. PKD beeinflusst auf diesem Weg die lokale Aktivierung und Inaktivierung von Cofilin durch die Regulation von dessen Phosphatase SSH1L. Interessanterweise bleibt die Phosphataseaktivität von SSH1L nach der Bindung an 14-3-3 Proteinen erhalten. Die aktive Phosphatase wird durch die PKD-vermittelte Phosphorylierung daher lediglich in ihrer Lokalisation beeinflusst.

In Herzmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von SSH1L durch eine spezifische siRNA nach einer Stimulation mit PDGF zu einem Anstieg von pCofilin und zu einer Inhibition der Migration führt. Durch die fehlende Phosphatase kann Cofilin nicht mehr dephosphoryliert werden und eine Aktindepolymerisation kann somit nicht mehr stattfinden (San Martin *et al.,* 2008). Diese Beobachtung konnte anhand von Experimenten mit der Zelllinie MDA-MB-231 bestätigt werden. Der Level an pCofilin in MCF7 Zellen wurde durch

die Depletion von SSH1L jedoch nicht wesentlich beeinflusst. Dieses Ergebnis kann durch das niedrige basale Migrationspotential der Zellen erklärt werden. MCF7 Zellen sind im Gegensatz zu MDA-MB-231 Zellen außerdem nicht invasiv (Artym *et al.,* 2006). Es ist daher möglich, dass MCF7 Zellen keinen Bedarf an hohen Mengen aktives SSH1L haben. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SSH1L in MCF7 Zellen nur in äußerst geringen Mengen vorliegt (siehe Abb. 4.24) und damit diese Hypothese untermauert werden.

Wie bereits erwähnt, führt eine Stimulation von Zellen mit PDGF, Serum oder Neuregulin / Heregulin zu einer Dephosphorylierung von SSH1L und zu dessen Translokation in aktinreiche Kompartimente der Zelle, wie dem sogenannten *„leading edge“* (San Martin *et al.,* 2008; Bongalon *et al.,* 2004). Diese Stimuli können ebenfalls PKD aktivieren (van Lint *et al.,* 1998; Zugaza *et al.,* 1997), die direkt mit F-Aktin interagieren kann (Eiseler *et al.,* 2007). Eine Stimulation durch EGF induziert beispielsweise eine vermehrte Bildung von PIP_2 durch PLCγ. Dies resultiert in einem erhöhten Level an DAG in der Plasmamembran, wodurch nPKCs aktiviert werden können. Diese sind wiederum in der Lage PKD zu aktivieren (van Rheenen *et al.,* 2007; Chen *et al.,* 2008; Wang *et al.,* 2006; Valverde *et al.,* 1994). Die PKD-vermittelte Phosphorylierung von SSH1L in der Zelle ist ausgehend von den mikroskopischen Daten in aktinreichen Kompartimenten zu vermuten. Dagegen ist die Dephosphorylierung und Aktivierung von SSH1L im Zytoplasma zu lokalisieren (siehe Abb. 4.9 und Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). Als Phosphatase und Aktivator von SSH1L ist Calcineurin beschrieben worden (Wang *et al.,* 2005). Für die SSH-Familie sind drei Isoformen beschrieben worden (Ohta *et al.,* 2003). Zukünftige Experimente könnten zeigen, ob andere SSH-Isoformen ebenfalls direkt oder indirekt von Mitgliedern der PKD-Familie reguliert werden. Interessanterweise sind die Serine 937 und 978 in SSH2L vorhanden, stellen jedoch keine PKD-Konsensusmotive dar. In SSH3L sind beide Phosphorylierungsstellen nicht konserviert. Beide Phosphatasen, SSH2L und SSH3L, können jedoch phosphorylierungsabhängig 14-3-3 Proteine binden (Kligys *et al.,* 2007). Es ist daher möglich, dass PKD in SSH2L bzw. SSH3L andere, noch nicht identifizierte Serine bzw. Threonine phosphorylieren kann. Ferner wurde PAK4 ebenfalls als SSH1L-Kinase beschrieben (Soosairajah *et al.,* 2005) und könnte daher eine PKD-redundante Funktion auf die SSH-Isoformen haben. Darüber hinaus ist SSH1L nicht in jeder Zelllinie exprimiert (siehe Abb. 4.24), so dass alternative Mechanismen zur Regulation von Cofilin vorliegen müssen. Neben SSH sind beispielsweise auch Chronophin sowie PP2A und PP1 in der Lage Cofilin zu dephosphorylieren (Niwa *et al.,* 2002; Ohta *et al.,* 2003; Oleinik *et al.,* 2010).

In der Literatur finden sich zahlreiche Stimuli, die SSH1L aktivieren können. H_2O_2 löst die Bindung von SSH1L an 14-3-3 Proteine des Typs ζ durch Oxidation aus, was zu einer Freisetzung von SSH1L führt. Diese Aktivierung erfolgt unabhängig von Calcineurin (Kim *et*

al., 2009). Ebenfalls aktiviert H_2O_2 PKD mittels in der Mitochondrienmembran gebildetem DAG. PKD induziert auf diese Weise detoxifizierende und antiapototische Gene (Storz, 2007; Cowell *et al.,* 2008). Daher kann eine Funktion von PKD bei der ROS vermittelten Aktinpolymerisation vermutet werden. PKD könnte dabei unabhängig von RhoA aktiviert werden. Eine derartige Aktivierung von PKD wurde bereits beschrieben (Mullin *et al.,* 2006).
Ca^{2+} und Neuregulin sind ebenfalls Aktivatoren der Phosphatase SSH1L (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004; Wang *et al.,* 2004). Ein vorgeschlagenes Modell besagt eine Ca^{2+}-abhängige Aktivierung von Calcineurin, wodurch SSH1L von 14-3-3 Proteinen dissoziiert und an F-Aktin bindet (Nishita *et al.,* 2005; Ohta *et al.,* 2003; Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). Eine Involvierung der bei der Aktivierung von SSH1L erforderlichen GTPase Rac in diesen Prozess ist bisher nicht bekannt. Denkbar ist hierbei eine gleichzeitige Aktivierung von Rho und PKD, wodurch die Menge an aktiviertem SSH1L reguliert werden könnte.
Die Phosphatidylinositol III-Kinase (PI-3K) ist ebenfalls in der Lage nach Insulinstimulation SSH1L zu aktivieren und Membranausstülpungen (*„membrane protusions“*) zu induzieren (Nishita *et al.,* 2004). Qiang und Mitarbeiter konnten in multiplen Myelomzellen zeigen, dass eine Stimulation mit IGF-1 (insulin – like – growth - factor 1) ebenso PI-3K aktiviert und zu einer simultanen Aktivierung von RhoA und PKD führt (Qiang *et al.,* 2004). Es kann daher ein möglicher Zusammenhang zwischen der Integrin vermittelten Aktivierung von PI-3K sowie RhoA, PKD und SSH1L hergestellt werden. Das Ausbilden und Lösen von Adhäsionen ist ein wichtiger Prozess bei der Zellmigration. Integrine können beispielsweise die PI-3 Kinase aktivieren (Mercurio *et al.,* 2001; Sehgal *et al.,* 2006). PIP_3 ist in der Lage Rac zu induzieren, was zu einer erhöhten Aktivität von SSH1L führt (Kölsch *et al.,* 2007; Kligys *et al.,* 2007). Kligys und Mitarbeiter konnten eine Rac vermittelte Aktivierung von SSH1L durch das Integrin α6β4 beschreiben (Kligys *et al.,* 2007). Möglicherweise wird nach der Aktivierung von Rac und SSH1L über Integrine gleichzeitig ein SSH1L-inhibierender Mechanismus über Rho und PKD induziert. Auf Grund der Fähigkeit von Integrinen sowohl Rho als auch Rac zu aktivieren, ist eine simultane Aktivierung beider Signalwege denkbar (Danen *et al.,* 2005; Berrier *et al.,* 2002; Fujiwara *et al.,* 2004).

5.3 Funktion der PKD vermittelten Phosphorylierung der LIMK2

In dieser Arbeit konnte die Cofilin-Kinase LIMK2 als weiteres Substrat von PKD identifiziert werden (siehe Abb. 4.14 und Abb. 4.15). LIMK1 besitzt ebenfalls ein potentielles PKD-Konsensusmotiv an Serin 323, das jedoch nicht von PKD *in vitro* phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung an dieser Stelle *in vitro* und in intakten Zellen erfolgt durch die MAPKAP2–Kinase (Kobayashi *et al.,* 2006). In vielen Brustkarzinomzelllinien konnte LIMK2 als ubiquitär exprimierte Isoform ermittelt werden (siehe Abb. 4.24). LIMK1 war lediglich in einzelnen Zelllinien exprimiert. LIMK2 kommt damit möglicherweise eine verstärkte Funktion in der

Regulation des Aktinzytoskeletts zu. Die Auswirkungen der LIM-Kinase auf die Zellmigration werden in der Literatur kontrovers diskutiert. In der Literatur wurde sowohl ein positiver als auch ein negativer Einfluss von LIMK1 bzw. 2 auf die Zellmigration und die Metastasierung beschrieben (Bagheri-Yarmand *et al.,* 2006; Kobayashi *et al.,* 2006; Sumi *et al.,* 1999; Amano *et al.,* 2001; Yoshioka *et al.,* 2003; Borensztajn *et al.,* 2010). Die Effekte scheinen hier stark von der verwendeten Zelllinie abhängig zu sein. Auf die gerichtete Zellmigration von HeLa und MCF7 Zellen wirkte die Expression der wildtypischen LIMK2 inhibierend, während die Expression der S289A Mutante keinen bzw. einen leicht steigernden Effekt auf die Zellmigration hatte. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis induzierte die Expression der S289A LIMK2 Mutante einen schwächeren Anstieg des pCofilin Gehalts, als die wildtypische Kinase, was ein Hinweis für aktives Cofilin und eine gesteigerte Zellmigration sein kann (siehe Abb. 4.22; Wang *et al.,* 2007; Nagata-Ohashi *et al.,* 2004). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist daher zu schließen, dass sich die Phosphorylierung des Serins 289 der LIMK2 aktivierend auf die Kinase auswirkt. Interessanterweise binden 14-3-3 Proteine Serin 289-phosphorylierungsabhängig an LIMK2. Die Lokalisation der LIM-Kinase kann durch Phosphorylierungen oder die Interaktion mit anderen Proteinen durchaus beeinflusst werden. Beispielsweise transloziert LIMK1 bei Interaktion mit dem CDK (cyclin dependent kinase) inhibitor $p57^{Kip2}$ in den Zellkern (Yokoo *et al.,* 2003). Ferner kann die Phosphorylierung der LIMK2 an Serin 283 dessen Translokation in den Zellkern inhibieren (Goyal *et al.,* 2005). Auch in den Phasen der Mitose ist die subzelluläre Lokalisation und Verteilung der Mitglieder der LIM-Kinase Familie unterschiedlich (siehe 5.4). Eine GFP-fusionierte LIMK2 S289A wies allerdings bezüglich Lokalisation keine Unterschiede zum Wildtyp auf, so dass die Bindung der 14-3-3 Proteine möglicherweise die Phosphorylierung und damit die Kinaseaktivität stabilisiert. Dies wurde bereits für ein anderes PKD-Substrat, die PI4KIIIβ, gezeigt (Hausser *et al.,* 2006) und kann in zukünftigen Studien mittel *in vitro* Kinase Assays analysiert werden. Obsilova und Mitarbeiter konnten beispielsweise eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktor FOXO nach Bindung von 14-3-3 Proteinen zeigen (Obsilova *et al.,* 2008). Für eine weitere Untersuchung der Funktion der Serin 289 Phosphorylierung, ist es sinnvoll eine Version der LIMK2 zu entwickeln, die konstitutiv an 14-3-3 Proteine bindet. Dies ist durch Einfügen einer Sequenz für ein R18 Peptid an der Stelle des potentiellen 14-3-3 Bindemotivs mit der Sequenz PHCVPRDLSWLDLEANMCLP möglich (Brummer *et al.,* 2008). Dabei sind die Aminosäuren D (Asparaginsäure) und E (Leucin) für die Bindung entscheidend. Auf diese Weise wird eine ständige Phosphorylierung des 14-3-3 Bindungsmotivs nachgeahmt. Ebenso kann durch einen Austausch der Aminosäuren D und L durch jeweils ein Lysin (R18KK) die Bindung von 14-3-3 Proteinen in der R18-Variante wieder inhibiert werden. Brummer und Mitarbeiter konnten auf diese Weise die negative Regulation von Gab2 (*„Grb2-associated binder“*) durch die

phosphorylierungsabhängige Bindung von 14-3-3 Proteinen analysieren. 14-3-3 Proteine binden nach Phosphorylierung von Serin 210 und Threonin 391 an Gab2 und inhibieren dessen Aktivität. Die Insertion des R18 Peptids in Gab2 hemmte auf Grund der Bindung an 14-3-3 Proteine dessen Fähigkeit mit Grb2, Shc und EGFR zu interagieren. Die Expression der R18KK-Mutante führte hingegen zu einer Inhibition der 14-3-3 Bindung. Die Mutante zeigte eine konstitutive Interaktion mit Grb2, Shc und EGFR. Möglicherweise werden mit Hilfe der R18 Modifikation Serin 289-abhängige Unterschiede in der Lokalisation und in der Aktivität der LIMK2 deutlich. Für LIMK1 konnte gezeigt werden, dass die MAPKAP2-vermittelte Phosphorylierung von Serin 323 eine essentielle Rolle in der VEGF-A induzierten Aktin-Reorganisation und Migration spielt (Kobayashi *et al.,* 2006). Interessanterweise spielt hier die Aktivierung von LIMK1 durch Phosphorylierung von Threonin 508 keine Rolle. Ein ähnlicher Mechanismus könnte durchaus auch für die PKD-vermittelte Phosphorylierung von LIMK2 in Frage kommen.

Die Aktivität der LIM-Kinasen wird über GTPasen der Rho Familie, wie Rho, Rac und Cdc42, gesteuert (Scott & Olson, 2008). Deren Induktion geht ein extrazellulärer Stimulus wie z.B. Heregulin, EGF, PDGF, HGF (*„hepatocyte growth factor“*) oder TGF (*„transforming growth faktor“)* voraus (Wang *et al.,* 2007; Mosadegh *et al.,* 2008; Bongalon *et al.,* 2004; Ahmed *et al.,* 2008; Vardouli *et al.,* 2005). TGF-β spielt beispielsweise bei der Induktion der EMT eine entscheidende Rolle (Xu *et al.,* 2009). TGF-ß Stimulation induziert über Rho die Kinase ROCK1, die wiederum LIMK2 an Threonin 505 phosphoryliert und aktiviert und somit die Bildung von Aktin-Stressfibern induziert (Vardouli *et al.,* 2005; Pritchard *et al.,* 2004; Shea *et al.,* 2008; Azab *et al.,* 2009; Scott & Olson, 2007). Ein Stimulus, der die Phosphorylierung von LIMK2 an Serin 289 induziert ist bisher allerdings nicht bekannt. Rho und Rac können als Gegenspieler in der Steuerung der gerichteten Zellmigration bezeichnet werden. Rac1 ist oftmals in Signalwegen involviert, welche die Phosphatase SSH1L aktivieren (Nagata-Ohashi *et al.,* 2004; Kligys *et al.,* 2007). Rho hingegen aktiviert die LIM-Kinase (Wang *et al.,* 2007; Scott & Olson, 2007; Vardouli *et al.,* 2005). Sowohl die PKD-vermittelte Phosphorylierung von LIMK2 als auch die von SSH1L steigern die Menge an phosphoryliertem Cofilin und wirken sich inhibierend auf die Cofilin-gesteuerte Zellmigration aus (siehe Abb. 4.22). Darüber hinaus wird PKD durch Rho (Cowell *et al.,* 2009; Eiseler *et al.,* 2009 b), aber nicht durch Rac aktiviert (A. Hausser, persönliche Mitteilung). Eine hohe Rac-Aktivität sollte daher PKD und damit SSH1L- und LIMK2-Phosphorylierung inhibieren und folglich eine Cofilin-Aktivierung und Zellmigration ermöglichen. Aktives Rho hingegen aktiviert PKD und inhibiert damit über SSH1L und LIMK2 die Cofilin-Aktivierung und Zellmigration. Interessanterweise ist PKD ebenfalls an der korrekten Aktivierung und Inaktivierung von Rho-GTPasen beteiligt. PKD phosporyliert das Rho-GAP Protein DLC1 (*deleted in liver cancer 1*) und induziert dadurch eine Bindung an 14-3-3 Proteine, was zu

einer Inaktivierung von DLC1 führt. DLC1 ist in vielen Tumoren herunterreguliert. Dies führt zu einer erhöhten Migration und Invasion der Tumorzellen und steigert die Metastasierung. PKD beeinflusst somit die Migration und Invasion von Tumorzellen auch über Rho und DLC1 (Holeiter *et al.,* 2009; Scholz *et al.,* 2009).

Die Mitglieder der LIM-Kinase Familie sind nicht nur am Lamellipodium der Zelle, sondern auch in der Ausbildung von Adhäsionen (*„focal adhesions“*) beschrieben worden (Maekawa *et al.,* 1999; Amano *et al.,* 2001; Azab *et al.,* 2009; Parsons *et al.,* 2010). Dabei induziert Rho die Kinase ROCK, welche wiederum in der Lage ist, LIMK2 zu phosphorylieren und Cofilin zu inaktivieren, wodurch die Ausbildung von Stressfibern ermöglicht wird (Parsons *et al.,* 2010; Scott & Olson, 2007). Die Ausbildung von Zelladhäsionen spielt bei der Zellmigration und Zellinvasion eine besondere Rolle. Yoshioka und Mitarbeiter entdeckten eine verstärkte Expression der LIMK1 in den Brustkarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF7 sowie eine damit einhergehende erhöhte Invasivität und Metastasierung in einem Mausmodell. Ferner konnten Horita und Mitarbeiter eine Inhibition der Invasivität von hochinvasiven MM1 Zellen zeigen, nachdem SSH1L und SSH2L sowie die LIMK1 mittels spezifischer siRNA depletiert wurden (Horita *et al.,* 2008). In einem Zebrafisch-Modell wurde ein Einfluss beider LIM-Kinase Isoformen für die Metastasierung und der Angiogenese *in vivo* gezeigt (Vlecken *et al.,* 2009). Möglicherweise sind in Brustkarzinomzelllinien diese Prozesse hauptsächlich über LIMK2 reguliert, da in diesen Zelllinien diese Isoform ubiquitär exprimiert wird (siehe Abb. 4.24; Pritchard *et al.,* 2004; Scott & Olson*,* 2007; Azab *et al.,* 2009). Auf Grund der genannten Publikationen kommt beiden Isoformen der LIM-Kinase eine Bedeutung in der Entstehung von Metastasen zu. LIMK1 bzw. 2 könnten bei der Ausbildung von invasiven Strukturen von Bedeutung sein wie beispielsweise bei der Bildung zellulärer Adhäsionen, die eine Basis für Invadopodien sein können (Oser *et al.,* 2009; Weaver, 2006; Parsons *et al.,* 2010). PKD bildet in invasiven Strukturen einen Komplex mit Cortaktin und Paxilin aus (Bowden *et al.,* 1999). Dieser Komplex ist in Zelladhäsionen und Invadopodien von Bedeutung und beeinflusst die Nukleation für neue Aktinfilamente. Auch hier könnte eine Regulation der LIMK2 durch PKD stattfinden.

5.4 Funktion von LIMK2 im Zellzyklus und der Mitose

Neben dem Einfluss auf die Zellmigration und -invasion wurde für die beiden Isoformen der LIM-Kinase ebenfalls eine mögliche Bedeutung in der Zellteilung sowie der Regulation der mitotischen Spindel vermutet (Sumi *et al.,* 2006; Chakrabati *et al.,* 2007). Dabei kolokalisieren die beiden Isoformen der LIM-Kinase an unterschiedlichen Stellen der Zelle während der Mitose. LIMK1 wurde in mitotischen Zellen an den Spindelpolen und lediglich in der Telophase in der Teilungsfurche beobachtet. LIMK2 hingegen lag in der Interphase

punktuell im Zytoplasma vor. In der Prometaphase wurde sie am Zentrosom und in der Metaphase direkt an der mitotischen Spindel lokalisiert. Während der Anaphase und Telophase befand sich LIMK2 in der Mitte der Spindel (Sumi *et al.,* 2006). Auf Grund der unterschiedlichen Lokalisationen ist zu vermuten, dass die beiden Isoformen während der Mitose unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Chakrabati und Mitarbeiter konnten hingegen in MDA-MB-231 und DU145 Zellen zeigen, dass beide LIM-Kinase Isoformen in phosphoryliertem Zustand mit γ-Tubulin assoziiert sind (Chakrabati *et al.,* 2007). PKD ist ebenfalls an der Zellproliferation und Mitose beteiligt (Zhukova *et al.,* 2001; Wong *et al.,* 2005). Möglicherweise spielt die PKD vermittelte Phosphorylierung der LIMK2 im Rahmen der Regulation der mitotischen Spindel und des Aktinzytoskeletts bei proliferativen Prozessen ebenfalls eine Rolle. Po'uha und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die LIMK2 die Stabilität der Spindel und die Resistenz gegen Mikrotubili-destabilisierende Reagenzien in Neuroblastomzellen beeinflusst (Po'uha *et al.,* 2010). In gegen diese Reagenzien resistenten Neuroblastomzellen konnte ein erhöhter Level an phosphoryliertem Cofilin, jedoch nicht an aktivierter und somit phosphorylierter LIMK1 und 2 gezeigt werden. Dieses Resultat deutet möglicherweise darauf hin, dass es neben Threonin 505 noch eine weitere Möglichkeit gibt LIMK2 zu aktivieren. Diese Aktivierung könnte durch PKD-induzierte Phosphorylierung von Serin 289 vermittelt werden.

5.5 Ausblick

Basierend auf Publikationen und den Daten dieser Arbeit kommt PKD eine fundamentale Bedeutung in der Regulation des Aktinzytoskeletts von Tumorzellen zu. Die schnelle Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten am *„leading edge"* invasiver Tumorzellen bedarf der genauen Regulation durch diverse Mediatoren (Wang *et al.,* 2007; Pollard & Cooper, 2009; Nagata-Ohashi *et al.,* 2004; Nishita *et al.,* 2005). Für die Ausbildung von Lamellipodien müssen beide Prozesse sowohl zeitlich als auch räumlich genau reguliert sein (Wang *et al.,* 2007; Sidani *et al.,* 2007). Ein zu hoher Anteil an aktivem Cofilin kann beispielsweise die Ausbildung von Lamellipodien vollständig hemmen (Wang *et al.,* 2007). Die Daten dieser Arbeit lassen auf eine Kontrolle der Homöostase der Aktinpolymerisation und Depolymerisation durch PKD schließen. In zukünftigen Studien sollte geklärt werden, ob das Zusammenspiel von PKD und seinen Substraten SSH1L und LIMK2 auch in der Tumorzellinvasion relevant ist. Von besonderer Bedeutung könnte hier die Bildung von Invadopodien, für die Cofilin essentiell ist (Yamaguchi *et al.,* 2005), sein.

6. Literaturverzeichnis

Ahmed, T., Shea, K., Masters, J. R., Jones, G. E. & Wells, C. M. (2008). A PAK4-LIMK1 pathway drives prostate cancer cell migration downstream of HGF. *Cell Signal* **20**, 1320-8.

Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S. & Mizuno, K. (2001). LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem J* **354**, 149-59.

Andrianantoandro, E. & Pollard, T. D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell* **24**, 13-23.

Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K. M. & Mueller, S. C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* **66**, 3034-43.

Asubel. F.M. (1994). Current protocols in molecular biology. 3 Vol. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

Auer, A., von Blume, J., Sturany, S., von Wichert, G., Van Lint, J., Vandenheede, J., Adler, G. & Seufferlein, T. (2005). Role of the regulatory domain of protein kinase D2 in phorbol ester binding, catalytic activity, and nucleocytoplasmic shuttling. *Mol Biol Cell* **16**, 4375-85.

Ayala, I., Baldassarre, M., Giacchetti, G., Caldieri, G., Tete, S., Luini, A. & Buccione, R. (2008). Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *J Cell Sci* **121**, 369-78.

Azab, A. K., Azab, F., Blotta, S., Pitsillides, C. M., Thompson, B., Runnels, J. M., Roccaro, A. M., Ngo, H. T., Melhem, M. R., Sacco, A., Jia, X., Anderson, K. C., Lin, C. P., Rollins, B. J. & Ghobrial, I. M. (2009). RhoA and Rac1 GTPases play major and differential roles in stromal cell-derived factor-1-induced cell adhesion and chemotaxis in multiple myeloma. *Blood* **114**, 619-29.

Azoitei, N., Pusapati, G. V., Kleger, A., Moller, P., Kufer, R., Genze, F., Wagner, M., van Lint, J., Carmeliet, P., Adler, G. & Seufferlein, T. Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours. *Gut* **59**, 1316-30.

Bagheri-Yarmand, R., Mazumdar, A., Sahin, A. A. & Kumar, R. (2006). LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* **118**, 2703-10.

Baron, C. L. & Malhotra, V. (2002). Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* **295**, 325-8.

Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1071-6.

Bernstein, B. W. & Bamburg, J. R. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* **20**, 187-95.

Berrier, A. L., Martinez, R., Bokoch, G. M. & LaFlamme, S. E. (2002). The integrin beta tail is required and sufficient to regulate adhesion signaling to Rac1. *J Cell Sci* **115**, 4285-91.

Bongalon, S., Dai, Y. P., Singer, C. A. & Yamboliev, I. A. (2004). PDGF and IL-1beta upregulate cofilin and LIMK2 in canine cultured pulmonary artery smooth muscle cells. *J Vasc Res* **41**, 412-21.

Borensztajn, K., Peppelenbosch, M. P. & Spek, C. A. Coagulation Factor Xa inhibits cancer cell migration via LIMK1-mediated cofilin inactivation. *Thromb Res* **125**, e323-8.

Bourguignon, L. Y., Gilad, E. & Peyrollier, K. (2007). Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J Biol Chem* **282**, 19426-41.

Bowden, E. T., Barth, M., Thomas, D., Glazer, R. I. & Mueller, S. C. (1999). An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* **18**, 4440-9.

Brabletz, T., Hlubek, F., Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hiendlmeyer, E., Jung, A. & Kirchner, T. (2005). Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs* **179**, 56-65.

Brummer, T., Larance, M., Herrera Abreu, M. T., Lyons, R. J., Timpson, P., Emmerich, C. H., Fleuren, E. D., Lehrbach, G. M., Schramek, D., Guilhaus, M., James, D. E. & Daly, R. J. (2008). Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 terminates signalling by the Gab2 docking protein. *Embo J* **27**, 2305-16.

Chakrabarti, R., Jones, J. L., Oelschlager, D. K., Tapia, T., Tousson, A. & Grizzle, W. E. (2007). Phosphorylated LIM kinases colocalize with gamma-tubulin in centrosomes during early stages of mitosis. *Cell Cycle* **6**, 2944-52.

Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**, 563-72.

Chen, J., Deng, F., Li, J. & Wang, Q. J. (2008). Selective binding of phorbol esters and diacylglycerol by individual C1 domains of the PKD family. *Biochem J* **411**, 333-42.

Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G. & Weaver, A. M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* **67**, 4227-35.

Condeelis, J. S., Wyckoff, J. B., Bailly, M., Pestell, R., Lawrence, D., Backer, J. & Segall, J. E. (2001). Lamellipodia in invasion. *Semin Cancer Biol* **11**, 119-28.

Cowell, C. F., Doppler, H., Yan, I. K., Hausser, A., Umezawa, Y. & Storz, P. (2009). Mitochondrial diacylglycerol initiates protein-kinase D1-mediated ROS signaling. *J Cell Sci* **122**, 919-28.

Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. & Minden, A. (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem* **276**, 32115-21.

Danen, E. H., van Rheenen, J., Franken, W., Huveneers, S., Sonneveld, P., Jalink, K. & Sonnenberg, A. (2005). Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol* **169**, 515-26.

De Kimpe, L., Janssens, K., Derua, R., Armacki, M., Goicoechea, S., Otey, C., Waelkens, E., Vandoninck, S., Vandenheede, J. R., Seufferlein, T. & Van Lint, J. (2009). Characterization of cortactin as an in vivo protein kinase D substrate: interdependence of sites and potentiation by Src. *Cell Signal* **21**, 253-63.

Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J. & Gygi, S. P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10762-7.

Dequiedt, F., Van Lint, J., Lecomte, E., Van Duppen, V., Seufferlein, T., Vandenheede, J. R., Wattiez, R. & Kettmann, R. (2005). Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Exp Med* **201**, 793-804.

di Blasio, L., Droetto, S., Norman, J., Bussolino, F. & Primo, L. Protein kinase D1 regulates VEGF-a-induced alphavbeta3 integrin trafficking and endothelial cell migration. *Traffic* **11**, 1107-18.

Ding, Y., Milosavljevic, T. & Alahari, S. K. (2008). Nischarin inhibits LIM kinase to regulate cofilin phosphorylation and cell invasion. *Mol Cell Biol* **28**, 3742-56.

Doppler, H. & Storz, P. (2007). A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase D contributes to oxidative stress-mediated activation. *J Biol Chem* **282**, 31873-81.

Doppler, H., Storz, P., Li, J., Comb, M. J. & Toker, A. (2005). A phosphorylation state-specific antibody recognizes Hsp27, a novel substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* **280**, 15013-9.

Du, C., Jaggi, M., Zhang, C. & Balaji, K. C. (2009). Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin. *Cancer Res* **69**, 1117-24.

Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. & Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1**, 253-9.

Eiseler, T., Doppler, H., Yan, I. K., Goodison, S. & Storz, P. (2009b). Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res* **11**, R13.

Eiseler, T., Doppler, H., Yan, I. K., Kitatani, K., Mizuno, K. & Storz, P. (2009a). Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat Cell Biol* **11**, 545-56.

Eiseler, T., Hausser, A., De Kimpe, L., Van Lint, J. & Pfizenmaier, K. Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem* **285**, 18672-83.

Eiseler, T., Schmid, M. A., Topbas, F., Pfizenmaier, K. & Hausser, A. (2007). PKD is recruited to sites of actin remodelling at the leading edge and negatively regulates cell migration. *FEBS Lett* **581**, 4279-87.

Foletta, V. C., Lim, M. A., Soosairajah, J., Kelly, A. P., Stanley, E. G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J. & Bernard, O. (2003). Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* **162**, 1089-98.

Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M. J., Jacobson, M. P. & Barber, D. L. (2008). Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *J Cell Biol* **183**, 865-79.

Friedl, P. & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**, 362-74.

Fugmann, T., Hausser, A., Schoffler, P., Schmid, S., Pfizenmaier, K. & Olayioye, M. A. (2007). Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol* **178**, 15-22.

Fujiwara, H., Gu, J. & Sekiguchi, K. (2004). Rac regulates integrin-mediated endothelial cell adhesion and migration on laminin-8. *Exp Cell Res* **292**, 67-77.

Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S. A. & Linder, S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 235-41.

Gohla, A., Birkenfeld, J. & Bokoch, G. M. (2005). Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol* **7**, 21-9.

Gohla, A. & Bokoch, G. M. (2002). 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr Biol* **12**, 1704-10.

Goode, B. L. & Eck, M. J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* **76**, 593-627.

Goyal, P., Pandey, D., Behring, A. & Siess, W. (2005). Inhibition of nuclear import of LIMK2 in endothelial cells by protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-283. *J Biol Chem* **280**, 27569-77.

Goyal, P., Pandey, D. & Siess, W. (2006). Phosphorylation-dependent regulation of unique nuclear and nucleolar localization signals of LIM kinase 2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **281**, 25223-30.

Grozinger, C. M. & Schreiber, S. L. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7835-40.

Hao, Q., Wang, L., Zhao, Z. J. & Tang, H. (2009). Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J Biol Chem* **284**, 799-806.

Hausser, A., Link, G., Bamberg, L., Burzlaff, A., Lutz, S., Pfizenmaier, K. & Johannes, F. J. (2002). Structural requirements for localization and activation of protein kinase C mu (PKC mu) at the Golgi compartment. *J Cell Biol* **156**, 65-74.

Hausser, A., Link, G., Hoene, M., Russo, C., Selchow, O. & Pfizenmaier, K. (2006). Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity. *J Cell Sci* **119**, 3613-21.

Hayashi, A., Seki, N., Hattori, A., Kozuma, S. & Saito, T. (1999). PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu. *Biochim Biophys Acta* **1450**, 99-106.

Hiraoka, J., Okano, I., Higuchi, O., Yang, N. & Mizuno, K. (1996). Self-association of LIM-kinase 1 mediated by the interaction between an N-terminal LIM domain and a C-terminal kinase domain. *FEBS Lett* **399**, 117-21.

Holeiter, G., Heering, J., Erlmann, P., Schmid, S., Jahne, R. & Olayioye, M. A. (2008). Deleted in liver cancer 1 controls cell migration through a Dia1-dependent signaling pathway. *Cancer Res* **68**, 8743-51.

Horita, Y., Ohashi, K., Mukai, M., Inoue, M. & Mizuno, K. (2008). Suppression of the invasive capacity of rat ascites hepatoma cells by knockdown of Slingshot or LIM kinase. *J Biol Chem* **283**, 6013-21.

Hotulainen, P., Paunola, E., Vartiainen, M. K. & Lappalainen, P. (2005). Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* **16**, 649-64.

Ichetovkin, I., Grant, W. & Condeelis, J. (2002). Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **12**, 79-84.

Ichetovkin, I., Han, J., Pang, K. M., Knecht, D. A. & Condeelis, J. S. (2000). Actin filaments are severed by both native and recombinant dictyostelium cofilin but to different extents. *Cell Motil Cytoskeleton* **45**, 293-306.

Iglesias, T., Cabrera-Poch, N., Mitchell, M. P., Naven, T. J., Rozengurt, E. & Schiavo, G. (2000). Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem* **275**, 40048-56.

Iglesias, T., Waldron, R. T. & Rozengurt, E. (1998). Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem* **273**, 27662-7.

Jaggi, M., Rao, P. S., Smith, D. J., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hemstreet, G. P. & Balaji, K. C. (2005). E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res* **65**, 483-92.

Kim, J. S., Huang, T. Y. & Bokoch, G. M. (2009). Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. *Mol Biol Cell* **20**, 2650-60.

Kim, M., Jang, H. R., Kim, J. H., Noh, S. M., Song, K. S., Cho, J. S., Jeong, H. Y., Norman, J. C., Caswell, P. T., Kang, G. H., Kim, S. Y., Yoo, H. S. & Kim, Y. S. (2008). Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion. *Carcinogenesis* **29**, 629-37.

Kligys, K., Claiborne, J. N., DeBiase, P. J., Hopkinson, S. B., Wu, Y., Mizuno, K. & Jones, J. C. (2007). The slingshot family of phosphatases mediates Rac1 regulation of cofilin phosphorylation, laminin-332 organization, and motility behavior of keratinocytes. *J Biol Chem* **282**, 32520-8.

Kligys, K., Yao, J., Yu, D. & Jones, J. C. (2009). 14-3-3zeta/tau heterodimers regulate Slingshot activity in migrating keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **383**, 450-4.

Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K. & Mizuno, K. (2006). MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *Embo J* **25**, 713-26.

Kölsch, V., Charest, P. G. & Firtel, R. A. (2008). The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci* **121**, 551-9.

Kostelecky, B., Saurin, A. T., Purkiss, A., Parker, P. J. & McDonald, N. Q. (2009). Recognition of an intra-chain tandem 14-3-3 binding site within PKCepsilon. *EMBO Rep* **10**, 983-9.

Kurita, S., Gunji, E., Ohashi, K. & Mizuno, K. (2007). Actin filaments-stabilizing and -bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *Genes Cells* **12**, 663-76.

Lavalle, C. R., Bravo-Altamirano, K., Giridhar, K. V., Chen, J., Sharlow, E., Lazo, J. S., Wipf, P. & Wang, Q. J. Novel protein kinase D inhibitors cause potent arrest in prostate cancer cell growth and motility. *BMC Chem Biol* **10**, 5.

Lee, S. H. & Dominguez, R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. (2010). *Mol Cells.*

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. & Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-8.

Matthews, S. A., Liu, P., Spitaler, M., Olson, E. N., McKinsey, T. A., Cantrell, D. A. & Scharenberg, A. M. (2006). Essential role for protein kinase D family kinases in the regulation of class II histone deacetylases in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* **26**, 1569-77.

Mercurio, A. M., Rabinovitz, I. & Shaw, L. M. (2001). The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 541-5.

Misra, U. K., Deedwania, R. & Pizzo, S. V. (2005). Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem* **280**, 26278-86.

Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuma, K., Miyata, T. & Nakamura, T. (1994). Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* **9**, 1605-12.

Mosadegh, B., Saadi, W., Wang, S. J. & Jeon, N. L. (2008). Epidermal growth factor promotes breast cancer cell chemotaxis in CXCL12 gradients. *Biotechnol Bioeng* **100**, 1205-13.

Mouneimne, G., DesMarais, V., Sidani, M., Scemes, E., Wang, W., Song, X., Eddy, R. & Condeelis, J. (2006). Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. *Curr Biol* **16**, 2193-205.

Mouneimne, G., Soon, L., DesMarais, V., Sidani, M., Song, X., Yip, S. C., Ghosh, M., Eddy, R., Backer, J. M. & Condeelis, J. (2004). Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation. *J Cell Biol* **166**, 697-708.

Mullin, M. J., Lightfoot, K., Marklund, U. & Cantrell, D. A. (2006). Differential requirement for RhoA GTPase depending on the cellular localization of protein kinase D. *J Biol Chem* **281**, 25089-96.

Murphy, T. R., Legere, H. J., 3rd & Katz, H. R. (2007). Activation of protein kinase D1 in mast cells in response to innate, adaptive, and growth factor signals. *J Immunol* **179**, 7876-82.

Nagata, K., Ohashi, K., Yang, N. & Mizuno, K. (1999). The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem J* **343** Pt 1, 99-105.

Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Goto, K., Chiba, S., Mori, R., Nishita, M., Ohashi, K., Kousaka, K., Iwamatsu, A., Niwa, R., Uemura, T. & Mizuno, K. (2004). A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol* **165**, 465-71.

Narumiya, S., Tanji, M. & Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 65-76.

Newton, A. C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* **101**, 2353-64.

Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F. J., Songyang, Z. & Cantley, L. C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem* **272**, 952-60.

Nishino, T. G., Miyazaki, M., Hoshino, H., Miwa, Y., Horinouchi, S. & Yoshida, M. (2008). 14-3-3 regulates the nuclear import of class IIa histone deacetylases. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 852-6.

Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K. & Mizuno, K. (2005). Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J Cell Biol* **171**, 349-59.

Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T. & Mizuno, K. (2004). Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J Biol Chem* **279**, 7193-8.

Nishiya, N., Sabe, H., Nose, K. & Shibanuma, M. (1998). The LIM domains of hic-5 protein recognize specific DNA fragments in a zinc-dependent manner in vitro. *Nucleic Acids Res* **26**, 4267-73.

Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. & Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**, 233-46.

Nunoue, K., Ohashi, K., Okano, I. & Mizuno, K. (1995). LIMK-1 and LIMK-2, two members of a LIM motif-containing protein kinase family. *Oncogene* **11**, 701-10.

Obsilova, V., Nedbalkova, E., Silhan, J., Boura, E., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J., Dyda, F. & Obsil, T. (2008). The 14-3-3 protein affects the conformation of the regulatory domain of human tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **47**, 1768-77.

Ohta, Y., Kousaka, K., Nagata-Ohashi, K., Ohashi, K., Muramoto, A., Shima, Y., Niwa, R., Uemura, T. & Mizuno, K. (2003). Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells* **8**, 811-24.

Oleinik, N. V., Krupenko, N. I. & Krupenko, S. A. ALDH1L1 inhibits cell motility via dephosphorylation of cofilin by PP1 and PP2A. *Oncogene*.

Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C. C., Bravo-Cordero, J. J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A. J. & Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *J Cell Biol* **186**, 571-87.

Parsons, J. T., Horwitz, A. R. & Schwartz, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 633-43.

Paunola, E., Mattila, P. K. & Lappalainen, P. (2002). WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett* **513**, 92-7.

Pollard, T. D. (2002). Cellular motility powered by actin filament assembly and disassembly. *Harvey Lect* **98**, 1-17.

Pollard, T. D., Blanchoin, L. & Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 545-76.

Pollard, T. D. & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-65.

Pollard, T. D. & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**, 1208-12.

Pope, B. J., Zierler-Gould, K. M., Kuhne, R., Weeds, A. G. & Ball, L. J. (2004). Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J Biol Chem* **279**, 4840-8.

Po'uha, S. T., Shum, M. S., Goebel, A., Bernard, O. & Kavallaris, M. LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* **29**, 597-607.

Pritchard, C. A., Hayes, L., Wojnowski, L., Zimmer, A., Marais, R. M. & Norman, J. C. (2004). B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Mol Cell Biol* **24**, 5937-52.

Qiang, Y. W., Yao, L., Tosato, G. & Rudikoff, S. (2004). Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood* **103**, 301-8.

Raftopoulou, M. & Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**, 23-32.

Ren, G., Crampton, M. S. & Yap, A. S. (2009). Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 865-73.

Riol-Blanco, L., Iglesias, T., Sanchez-Sanchez, N., de la Rosa, G., Sanchez-Ruiloba, L., Cabrera-Poch, N., Torres, A., Longo, I., Garcia-Bordas, J., Longo, N., Tejedor, A., Sanchez-Mateos, P. & Rodriguez-Fernandez, J. L. (2004). The neuronal protein Kidins220 localizes in a raft compartment at the leading edge of motile immature dendritic cells. *Eur J Immunol* **34**, 108-18.

Ristich, V. L., Bowman, P. H., Dodd, M. E. & Bollag, W. B. (2006). Protein kinase D distribution in normal human epidermis, basal cell carcinoma and psoriasis. *Br J Dermatol* **154**, 586-93.

Rohatgi, R., Ho, H. Y. & Kirschner, M. W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* **150**, 1299-310.

Rosok, O., Pedeutour, F., Ree, A. H. & Aasheim, H. C. (1999). Identification and characterization of TESK2, a novel member of the LIMK/TESK family of protein kinases, predominantly expressed in testis. *Genomics* **61**, 44-54.

Rozengurt, E., Rey, O. & Waldron, R. T. (2005). Protein kinase D signaling. *J Biol Chem* **280**, 13205-8.

Sacchetti, P., Carpentier, R., Segard, P., Olive-Cren, C. & Lefebvre, P. (2006). Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res* **34**, 5515-27.

San Martin, A., Lee, M. Y., Williams, H. C., Mizuno, K., Lassegue, B. & Griendling, K. K. (2008). Dual regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot-1L phosphatase controls platelet-derived growth factor-induced migration of human aortic smooth muscle cells. *Circ Res* **102**, 432-8.

Scholz, R. P., Regner, J., Theil, A., Erlmann, P., Holeiter, G., Jahne, R., Schmid, S., Hausser, A. & Olayioye, M. A. (2009). DLC1 interacts with 14-3-3 proteins to inhibit RhoGAP activity and block nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* **122**, 92-102.

Schonichen, A. & Geyer, M. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 152-63.

Scott, R. W. & Olson, M. F. (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med* **85**, 555-68.

Sehgal, B. U., DeBiase, P. J., Matzno, S., Chew, T. L., Claiborne, J. N., Hopkinson, S. B., Russell, A., Marinkovich, M. P. & Jones, J. C. (2006). Integrin beta4 regulates migratory behavior of keratinocytes by determining laminin-332 organization. *J Biol Chem* **281**, 35487-98.

Shea, K. F., Wells, C. M., Garner, A. P. & Jones, G. E. (2008). ROCK1 and LIMK2 interact in spread but not blebbing cancer cells. *PLoS One* **3**, e3398.

Sidani, M., Wessels, D., Mouneimne, G., Ghosh, M., Goswami, S., Sarmiento, C., Wang, W., Kuhl, S., El-Sibai, M., Backer, J. M., Eddy, R., Soll, D. & Condeelis, J. (2007). Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *J Cell Biol* **179**, 777-91.

Sinnett-Smith, J., Jacamo, R., Kui, R., Wang, Y. M., Young, S. H., Rey, O., Waldron, R. T. & Rozengurt, E. (2009). Protein kinase D mediates mitogenic signaling by Gq-coupled receptors through protein kinase C-independent regulation of activation loop Ser744 and Ser748 phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 13434-45.

Smolich, B., Vo, M., Buckley, S., Plowman, G. & Papkoff, J. (1997). Cloning and biochemical characterization of LIMK-2, a protein kinase containing two LIM domains. *J Biochem* **121**, 382-8.

Song, X., Chen, X., Yamaguchi, H., Mouneimne, G., Condeelis, J. S. & Eddy, R. J. (2006). Initiation of cofilin activity in response to EGF is uncoupled from cofilin phosphorylation and dephosphorylation in carcinoma cells. *J Cell Sci* **119**, 2871-81.

Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamburg, J. R. & Bernard, O. (2005). Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *Embo J* **24**, 473-86.

Stanyon, C. A. & Bernard, O. (1999). LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 389-94.

Storz, P. (2007). Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol* **17**, 13-8.

Storz, P., Doppler, H., Johannes, F. J. & Toker, A. (2003). Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. *J Biol Chem* **278**, 17969-76.

Storz, P., Doppler, H. & Toker, A. (2005). Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell Biol* **25**, 8520-30.

Sturany, S., Van Lint, J., Muller, F., Wilda, M., Hameister, H., Hocker, M., Brey, A., Gern, U., Vandenheede, J., Gress, T., Adler, G. & Seufferlein, T. (2001). Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. *J Biol Chem* **276**, 3310-8.

Sumi, T., Hashigasako, A., Matsumoto, K. & Nakamura, T. (2006). Different activity regulation and subcellular localization of LIMK1 and LIMK2 during cell cycle transition. *Exp Cell Res* **312**, 1021-30.

Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. & Nakamura, T. (1999). Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J Cell Biol* **147**, 1519-32.

Suyama, E., Wadhwa, R., Kawasaki, H., Yaguchi, T., Kaul, S. C., Nakajima, M. & Taira, K. (2004). LIM kinase-2 targeting as a possible anti-metastasis therapy. *J Gene Med* **6**, 357-63.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 442-54.

Torres-Marquez, E., Sinnett-Smith, J., Guha, S., Kui, R., Waldron, R. T., Rey, O. & Rozengurt, E. CID755673 enhances mitogenic signaling by phorbol esters, bombesin and EGF through a protein kinase D-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 63-8.

Ulrich, F. & Heisenberg, C. P. (2009). Trafficking and cell migration. *Traffic* **10**, 811-8.

Valverde, A. M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J. & Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8572-6.

Van Lint, J., Ni, Y., Valius, M., Merlevede, W. & Vandenheede, J. R. (1998). Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of phospholipase Cgamma and protein kinase C. *J Biol Chem* **273**, 7038-43.

van Rheenen, J., Condeelis, J. & Glogauer, M. (2009). A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells. *J Cell Sci* **122**, 305-11.

van Rheenen, J., Song, X., van Roosmalen, W., Cammer, M., Chen, X., Desmarais, V., Yip, S. C., Backer, J. M., Eddy, R. J. & Condeelis, J. S. (2007). EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J Cell Biol* **179**, 1247-59.

Vardouli, L., Moustakas, A. & Stournaras, C. (2005). LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **280**, 11448-57.

Vega, R. B., Harrison, B. C., Meadows, E., Roberts, C. R., Papst, P. J., Olson, E. N. & McKinsey, T. A. (2004). Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* **24**, 8374-85.

Vielkind, S., Gallagher-Gambarelli, M., Gomez, M., Hinton, H. J. & Cantrell, D. A. (2005). Integrin regulation by RhoA in thymocytes. *J Immunol* **175**, 350-7.

Vignjevic, D. & Montagnac, G. (2008). Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin Cancer Biol* **18**, 12-22.

Vlecken, D. H. & Bagowski, C. P. (2009). LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Zebrafish* **6**, 433-9.

Waldron, R. T. & Rozengurt, E. (2003). Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* **278**, 154-63.

Wang, W., Eddy, R. & Condeelis, J. (2007). The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* **7**, 429-40.

Wang, W., Goswami, S., Lapidus, K., Wells, A. L., Wyckoff, J. B., Sahai, E., Singer, R. H., Segall, J. E. & Condeelis, J. S. (2004). Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* **64**, 8585-94.

Wang, W., Mouneimne, G., Sidani, M., Wyckoff, J., Chen, X., Makris, A., Goswami, S., Bresnick, A. R. & Condeelis, J. S. (2006). The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. *J Cell Biol* **173**, 395-404.

Wang, Y., Shibasaki, F. & Mizuno, K. (2005). Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem* **280**, 12683-9.

Watkins, J. L., Lewandowski, K. T., Meek, S. E., Storz, P., Toker, A. & Piwnica-Worms, H. (2008). Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18378-83.

Weaver, A. M. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis* **23**, 97-105.

Windhorst, S., Fliegert, R., Blechner, C., Mollmann, K., Hosseini, Z., Gunther, T., Eiben, M., Chang, L., Lin, H. Y., Fanick, W., Schumacher, U., Brandt, B. & Mayr, G. W. Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase-A is a new cell motility-promoting protein that increases the metastatic potential of tumor cells by two functional activities. *J Biol Chem* **285**, 5541-54.

Wong, C. & Jin, Z. G. (2005). Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **280**, 33262-9.

Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* **19**, 156-72.

Yamaguchi, H. & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 642-52.

Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T. & Condeelis, J. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol* **168**, 441-52.

Yamaguchi, H., Pixley, F. & Condeelis, J. (2006). Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol* **85**, 213-8.

Yan, S. R., Joseph, R. R., Rosen, K., Reginato, M. J., Jackson, A., Allaire, N., Brugge, J. S., Jobin, C. & Stadnyk, A. W. (2005). Activation of NF-kappaB following detachment delays apoptosis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* **24**, 6482-91.

Yang, E. J., Yoon, J. H., Min, D. S. & Chung, K. C. (2004). LIM kinase 1 activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* **279**, 8903-10.

Yokoo, T., Toyoshima, H., Miura, M., Wang, Y., Iida, K. T., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Gotoda, T., Nishimori, S., Tanaka, K. & Yamada, N. (2003). p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J Biol Chem* **278**, 52919-23.

Yoo, Y., Ho, H. J., Wang, C. & Guan, J. L. Tyrosine phosphorylation of cofilin at Y68 by v-Src leads to its degradation through ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* **29**, 263-72.

Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O. & Itoh, K. (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7247-52.

Zhukova, E., Sinnett-Smith, J. & Rozengurt, E. (2001). Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* **276**, 40298-305.

Zugaza, J. L., Waldron, R. T., Sinnett-Smith, J. & Rozengurt, E. (1997). Bombesin, vasopressin, endothelin, bradykinin, and platelet-derived growth factor rapidly activate protein kinase D through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *J Biol Chem* **272**, 23952-60.

Danksagung

Zum Abschluss der Doktorarbeit möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben:

- Mein Dank gilt vor Allem Herrn Prof. Dr. Pfizenmaier, der es mir ermöglicht hat, am Institut für Zellbiologie und Immunologie meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen sowie seiner beratenden Gespräche.
- Herrn Professor Scheurich für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens.
- Frau Dr. Angelika Hausser als meine Betreuerin in den vergangenen drei Jahren, die für mich stets in fachlichen Fragen ein offenes Ohr hatte, allzeit Verständnis für meine Probleme zeigte und die mir durch ihr Projekt neue wissenschaftliche Möglichkeiten eröffnet hat.

Alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „PKD“ haben mein uneingeschränktes Lob und meinen aufrichtigen Dank verdient. Ich habe mich gefreut, mit euch zusammen arbeiten zu dürfen:

Christine für ihre offene und stets hilfsbereite Art und für die spontanen Fahrten zu IKEA (u.a. zwecks Erwerb eines rückenfreundlichen Sitzmöbels)

Gisela für die technischen Ratschläge und der Unterstützung bei der Durchführung der Versuche (u.a. bei zeitlichen Engpässen !!)

Jana für ihre stets sonnige Gemütslage und ihr Engagement bei der btS

Kornelia für die guten Ratschläge, ihren Optimismus, die fachlichen Diskussionen und ihre Hilfe bei vielen formellen Fragen

Nina für ihr freundliches Wesen und ihre Hilfsbereitschaft

Sandra für ihre Aufmunterungen und die gelegentliche unkonventionelle Hilfe bei plötzlichen „hypoglykämischen Zuständen“

Stephan für die fachlichen Diskussionen, die netten privaten Gespräche außerhalb der Arbeitszeit und die gemeinsamen Trainingsstunden beim Ju Jitsu

Thomas H. für seine Hilfsbereitschaft in fachlichen und persönlichen Fragen

Thomas W. für die Unterstützung und Übernahme sowie Weiterführung des Projekts (auch für die Zukunft viel Erfolg, Thomas!)

Darüber hinaus danke ich:

Frau Dr. Johanna Hering für die freundliche Unterstützung bei Versuchen mit MCF7 Zellen

Herrn Dr. Rolf Scholz für die intensiven fachlichen Gespräche und die gemeinsamen Organisationen

Herrn Dr. Felix Neugart für die tatkräftige Hilfe bei der Mikroskopie.

Herrn Dr. Roland Stork für die gemeinsamen Unternehmungen (geistige Zerstreuungen) nach der Arbeit und die gemeinsamen Fahrten zu btS Veranstaltungen.

Herrn Dr. Olaf Meyer und Roman für die fachlichen Diskussionen und die gemeinsamen Konzertbesuche

Allen Mitgliedern der btS Stuttgart: Bettina und Annabell für die Übernahme der Vorsitze, sowie Sanja, Jana, Volker, Julia, Rolf und Monika - Es war eine großartige Zeit und wir haben gemeinsam tolle Aktionen auf die Beine gestellt, die ohne uns nie stattgefunden hätten!

Auch in meinem privaten Umfeld schulde ich einigen Leuten Dank:

Meiner Freundin Patricia, für deine tatkräftige Unterstützung und deine sprichwörtliche Engelsgeduld in den letzten Monaten - Es ist schön, dass es dich gibt!

Herrn Pfr. Matthias Haas für die geistige und geistliche Unterstützung in den letzten drei Jahren und den vielen tief schürfenden Gesprächen in der KHG, bei denen mir erneut bewusst wurde, dass Naturwissenschaft und Religion keine Gegensätze darstellen müssen.

Meinen Freunden aus dem privaten Umfeld:

Arne für unsere schon so lange bestehende Freundschaft und unser unerwartetes Wiedersehen in Stuttgart – einmal verschlägt´s jeden ins Ländle!

Ela für ihr sonniges Wesen, unsere vielen gemeinsamen Gespräche und die Planung unserer schriftstellerischen Vorhaben

Christina für die freundschaftliche Beziehung und unsere gemeinsamen Unternehmungen in Stuttgart

Jasmin für ihre unkomplizierte fröhliche Art und die gelegentliche nachbarschaftliche Hilfeleistung

Insgesamt bin ich froh, dass ich Stuttgart und Umgebung habe kennen lernen dürfen und dass ich als Nordeuropäer (Westfale) jetzt weiß, wie Butterbrezeln schmecken, was ein Kruschdlädle ist und dass man hier die Kehrwoche einzuhalten hat!

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Großmutter, die stets ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte während meines Studiums und meiner Promotionszeit gehabt haben. Ich bin euch dankbar, dass ihr meinen wissenschaftlichen Werdegang bis hierhin stets unterstützt habt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Philipp Peterburs
Geburtsdatum:	28.01.1981 in Gütersloh
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1987 – 1991	kath. Grundschule Overberg, Gütersloh
1991 -- 2000	ev. Stift. Gymnasium, Gütersloh Abschluss: allg. Hochschulreife mit 2,5

Zivildienst

08 / 2000 – 04 / 2001	Zivildienst bei der Caritas Sozialstation Gütersloh mit Erhalt des Zertifikats zur Pflegehilfskraft

Hochschulstudium

10 / 2001 – 02 / 2007	Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms - Universität (WWU) Münster Abschluss als Diplom-Biologe mit Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer: Zoologie (Zellbiologie), Physikalische Chemie Abschlussnote: 1,4
03 / 2006 – 01 / 2007	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut Dortmund zum Thema „Biochemische Charakterisierung von Uhrenproteinen“ bei Frau Dr. E. Wolf in der Abteilung für strukturelle Biologie von Prof. Dr. A. Wittinghofer

Promotion

07 / 2007 – 10 / 2010	Doktorarbeit am Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart zum Thema „Duale Regulation von Cofilin durch PKD vermittelte Phosphorylierung der Phosphatase SSH1L und der LIM-Kinase 2“ in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. A. Hausser

Praktika

02 / 2003 – 03 / 2003	Praktikum am Max-Planck-Institut Dortmund in der Abteilung für physikalische Biochemie bei Herrn Dr. M. Geyer Aufgabenbereich: Charakterisierung des HIV-Proteins Nef
09 / 2004	Praktikum am Biozentrum Basel in der Abteilung für Biochemie bei Herrn Dr. Jenö Aufgabenbereich: Isolation und biochemische Reinigung von Hefekinasen

Publikationen

06 / 2009	Peterburs, P; Heering, J; Link, G; Pfizenmaier, K; Olayioye, M.A.;Hausser, A (2009). Protein Kinase D Regulates Cell Migration by Direct Phosphorylation of the Cofilin Phosphatase Slingshot 1 Like. Cancer Res 2009; 69(14):5634–8.