

Universitätsklinikum Ulm  
Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Innere Medizin I  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. G. Adler

# Die Rolle der Zytokeratine 8 und 18 für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur und das Adhäsionsverhalten epithelialer Tumorzellen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
Julia Jansen  
aus Düsseldorf  
2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Armin Imhof

Tag der Promotion: 25.06.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Zytoskelett . . . . .	1
1.1.1 Mikrofilamente (Aktinfilamente) . . . . .	1
1.1.1.1 Fokale Adhäsionen . . . . .	2
1.1.1.2 Lamellipodien und Filopodien . . . . .	3
1.1.1.3 Stressfasern . . . . .	4
1.1.1.4 Rho-GTPasen . . . . .	5
1.1.1.5 Adhäsionsverbindungen . . . . .	5
1.1.2 Intermediärfilamente . . . . .	5
1.1.2.1 Zytokeratine . . . . .	6
1.1.3 Mikrotubuli . . . . .	8
1.2 Zielsetzung . . . . .	9
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Zellbiologie . . . . .	10
2.2 Transfektion . . . . .	10
2.2.1 small interfering RNA (siRNA) . . . . .	10
2.2.2 Keratin-cDNA-Konstrukte . . . . .	11
2.2.2.1 Transfektion der HeLa-Zellen mit Fugene HD . . . . .	12
2.2.2.2 Transfektion der Panc-1-Zellen mit Metafectene . . . . .	12
2.3 RNA-Extraktion . . . . .	13
2.4 Quantitative one step real-time PCR . . . . .	13
2.5 Zytokeratin-Extraktion . . . . .	13
2.6 SDS-PAGE und Western Blot . . . . .	14
2.7 Immunfluoreszenz . . . . .	15
2.7.1 Panzytokeratin-Immunfluoreszenz . . . . .	16
2.7.2 Aktin-Immunfluoreszenz . . . . .	16
2.7.3 Paxillin-Immunfluoreszenz . . . . .	16
2.8 Adhäsionsversuche . . . . .	16
2.9 Soft-Agar-Assays . . . . .	17
2.10 Statistik . . . . .	18

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
3.1	Etablierung der Zytokeratin 8 und 18 spezifischen siRNA Oligonukleotide mittels RT-PCR . . . . .	19
3.2	Effekt der Zytokeratin 8 und 18 spezifischen siRNA Oligonukleotide auf die Proteinexpression von K8 und K18 . . . . .	24
3.3	Die Zytokeratine 8 und 18 in ihrer Bedeutung für die Morphologie der Panc-1- und HeLa-Zellen . . . . .	27
3.4	Die Rolle der Zytokeratine 8 und 18 für das Adhäsionsverhalten von Panc-1- und HeLa-Zellen . . . . .	35
	3.4.1 Adhäsionsverhalten unter Depletion der Zytokeratine . . . . .	35
	3.4.2 Adhäsionsverhalten nach posttranslationaler Modifikation . . . . .	40
3.5	Die Auswirkungen der Zytokeratin-Depletion auf das Aktinskelett der Panc-1- und HeLa-Zellen . . . . .	43
3.6	Die Fokalen Adhäsionen in Panc-1- und HeLa-Zellen unter Zytokeratin 8 und 18-Depletion . . . . .	49
3.7	Der Einfluss der Zytokeratine 8 und 18 auf das Adhäsions-unabhängige Wachstumsverhalten der Panc-1- und HeLa-Zellen . . . . .	52
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Möglichkeiten zur Modulation des Zytokeratinskeletts . . . . .	57
4.2	Interaktionen zwischen den Intermediärfilamenten, den Mikrofilamenten und deren Rolle für die Adhäsion epithelialer Tumorzellen . . . . .	59
4.3	Das Adhäsionsverhalten epithelialer Tumorzellen . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
<i>Abb.</i>	Abbildung
<i>ADP</i>	Adenosindiphosphat
<i>AK</i>	Antikörper
<i>ATP</i>	Adenosintriphosphat
<i>BSA</i>	Rinderserumalbumin
<i>bzw.</i>	beziehungsweise
<i>ca.</i>	circa
<i>CaM – Kinase</i>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase
<i>cdc2</i>	cell division cycle 2
<i>cDNA</i>	mRNA komplementäre DNA
<i>CK</i>	Zytokeratin
<i>d.h.</i>	das heißt
<i>DMEM</i>	Dulbecco's modified Eagles medium
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGF</i>	epithelial growth factor
<i>EZM</i>	Extrazellulärmatrrix
<i>FCS</i>	Fötales Kälberserum
<i>FRET</i>	Fluorescence resonance energy transfer
<i>g</i>	Gramm

<i>GDP</i>	Guanindiphosphat
<i>GFP</i>	green fluorescent protein
<i>GTP</i>	Guanintriphosphat
<i>h</i>	Stunde(n)
<i>HCl</i>	Salzsäurelösung
<i>HEPES</i>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>Ig</i>	Immunglobulin
<i>K</i>	Keratin
<i>KCl</i>	Kaliumchloridlösung
<i>kDa</i>	Kilo-Dalton
<i>l</i>	Liter
<i>M</i>	Molar
<i>MAP – Kinase</i>	mitogen activated protein kinase
<i>Mg</i>	Magnesium
<i>mg</i>	Milligramm
<i>min</i>	Minute(n)
<i>mM</i>	Millimolar
<i>mm</i>	Millimeter
<i>mRNA</i>	messenger RNA
<i>NaCl</i>	Natriumchlorid
<i>PBS</i>	phosphatgepufferte Salzlösung
<i>PCR</i>	Polymerasekettenreaktion
<i>PKC</i>	protein kinase C
<i>PMSF</i>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>PVDF</i>	Polyvinylidenfluorid
<i>RISC</i>	RNA-induced silencing complex
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure

<i>RNAi</i>	RNA interference
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>RT – PCR</i>	Real-time-Polymerasekettenreaktion
<i>s.</i>	siehe
<i>SDS – PAGE</i>	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
<i>Ser</i>	Serin
<i>si18</i>	siCK18, siRNA gerichtet gegen Zytokeratin 18
<i>si8</i>	siCK8, siRNA gerichtet gegen Zytokeratin 8
<i>siRNA</i>	small interfering RNA
<i>SPC</i>	Sphingosylphosphorylcholin
<i>Tris</i>	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
<i>u.a.</i>	unter anderem
<i>YFP</i>	yellow fluorescent protein
<i>z.B.</i>	zum Beispiel
$\mu g$	Mikrogramm
$\mu l$	Mikroliter

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Das Zytoskelett

Alle Arten von Säugetierzellen beinhalten ein komplexes intrazelluläres Zytoskelettsystem, bestehend aus drei strukturellen Einheiten: Mikrofilamente (entsprechen den Aktinfilamenten), Intermediärfilamente und Mikrotubuli und deren assoziierten Proteinen [4]. Diese Strukturelemente spielen eine entscheidende Rolle in verschiedensten zellulären Prozessen, z.B. Ausbildung der Zellform, Organisation des Zytoplasmas, Zellteilung, Zellbewegungen oder -differenzierung [6, 31].

#### 1.1.1 Mikrofilamente (Aktinfilamente)

Das Strukturprotein Aktin ist eines der fünf häufigsten Proteine in eukaryotischen Zellen (Abb.1). Der Mensch besitzt 6 verschiedene Isoformen des Aktins. Es existieren ein  $\alpha$ -Skelettmuskel-, ein  $\alpha$ -Herzmuskel-, ein  $\alpha$ - und ein  $\gamma$ -Glattmuskulatur-, sowie ein  $\beta$ - und ein  $\gamma$ -Nichtmuskel-Aktin. Das monomere Molekül wird als G-Aktin, also globuläres Aktin bezeichnet und ist ca. 42 kDa groß. G-Aktin kann über Phosphorylierungsvorgänge polymerisiert werden. Dadurch entsteht die filamentöse Form des Aktins, das F-Aktin, welches aus einer Helix zweier polymerisierter G-Aktin-Stränge besteht. F-Aktin hat einen Durchmesser von ca. 7nm, daher die Bezeichnung Mikrofilament [23].

Die Bildung von F-Aktin unterliegt einem ständigen Wechsel von Polymerisations- und Abbau-Vorgängen. Das Aktinfilament besitzt ein (+)- und ein (-)-Ende; aktiviertes G-Aktin bindet bevorzugt an das (+)-Ende und führt dort zu einem Wachstum des Filaments. Im Verlauf kommt es dann zur Hydrolyse des gebundenen Phosphatrestes, die Bindungsstärke des Aktins nimmt ab. Am (-)-Ende überwiegt schließlich die Hydrolyse

und damit die Abspaltung von Aktinmonomeren der Neuanlagerung von G-Aktin; es kommt zu einer Verkürzung des Filaments. Diese Fähigkeit zu einem schnellen Umbau führt dazu, dass die Aktinfilamente für die Stabilisation der Zellform, intrazelluläre Transporte und in Muskelzellen wesentlich für die Kontraktion zuständig sind [24, 48]. F-Aktin und G-Aktin liegen in der Zelle in einem Gleichgewicht vor, wobei das G-Aktin hauptsächlich in Komplexen mit Aktin-bindenden Proteinen vorkommt.

Die Polymerisations- und Abbauvorgänge werden zusätzlich durch verschiedene Begleitproteine beeinflusst; z.B. fördert das Protein Cofilin am (-)-Ende des Aktins die Dissoziation, andererseits führt das Protein Profilin am (+)-Ende zu einer weiteren Polymerisation. Des Weiteren führen posttranslationale Modifikationen (z.B. Arginylierung) zu einer Veränderung der Stabilität des Aktinfilaments [9, 32].

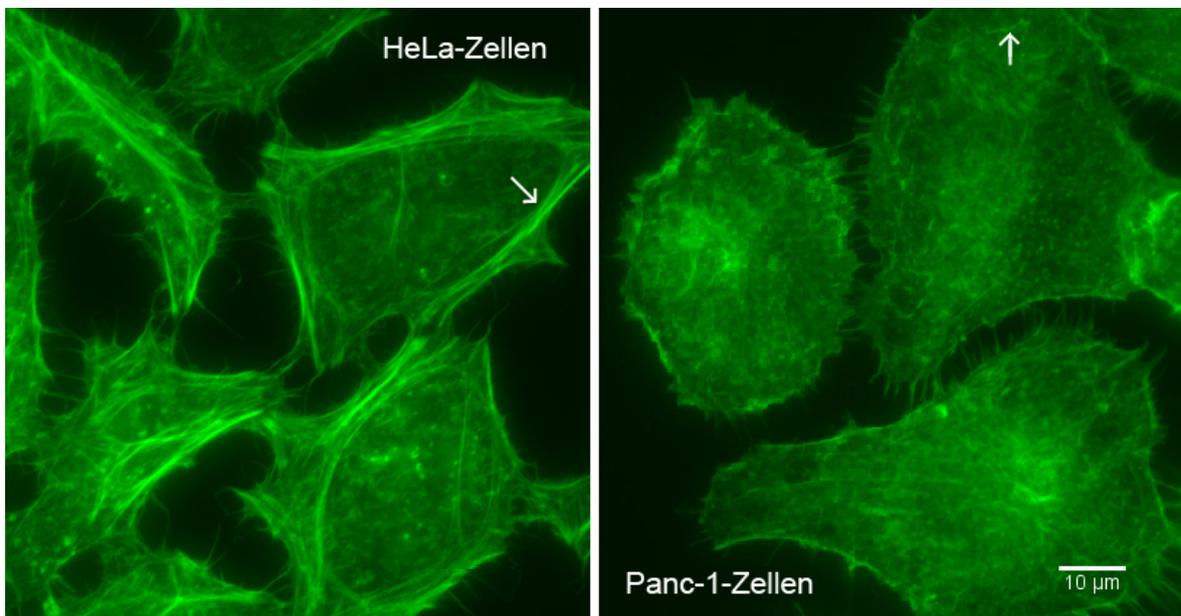


Abbildung 1: **Aktinskelett in HeLa- und Panc-1-Zellen (Pfeilmarkierung)**. Links: HeLa-Zellen mit Aktinmarkierung durch fluoreszenzmarkiertes Alexa-Phalloidin(1:250) nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur. Rechts: Panc-1-Zellen mit Aktinmarkierung durch fluoreszenzmarkiertes Alexa-Phalloidin (1:250) nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur.

#### 1.1.1.1 Fokale Adhäsionen

An „Fokale Adhäsionen“ steht das Aktinzytoskelett einer Zelle mit der extrazellulären Matrix (EZM) in Verbindung. Die Verbindung zwischen der Zelle und der EZM kommt in Bereichen zustande, an denen der Abstand zwischen der EZM und der Zelle weniger als 15 nm beträgt [78, 79].

Diese Fokalen Adhäsionen haben zahlreiche Funktionen; neben der Verankerung der Zelle dienen sie vor allem auch der Signalübertragung, außerdem können sie als Mechanorezeptoren fungieren [57]. An der Ausbildung dieser Adhäsionen mit der EZM sind je nach Funktion bis zu 50 verschiedene Proteine beteiligt. Hauptsächlich sind dies transmembranäre Integrine, die an Proteine mit spezifischen Aminosäuresequenzen (z.B. Fibronectin, Laminin, Vitronectin oder Kollagen) in der EZM binden. Diese Integrine sind Heterodimere und bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die je nach Isoform die Bindungsfähigkeit zur EZM beeinflussen [11, 26]. Auf der intrazellulären Seite ist die  $\beta$ -Untereinheit über Adapterproteine (z.B.  $\alpha$ -Actinin, Filamin, Talin und Vinculin) mit den Aktinfilamenten der Zelle verbunden.

Neben den strukturgebenden Integrinen findet man in den Fokalen Adhäsionen außerdem noch signalübertragende Proteinkinasen, wie z.B. die Tyrosinkinase c-Src und die *focal adhesion kinase (FAK)* [17, 79].

Während der Bewegung der Zelle wandert diese über die Fokalen Adhäsionen hinweg, so dass die eigentliche Position dieser Kontaktstellen nahezu unverändert bleibt. Beim Erreichen des Zellendes werden die Fokalen Adhäsionen über einen komplexen Mechanismus, das „*rear detachment*“, wieder gelöst. Prinzipiell sind hier sowohl rein mechanische, als auch biochemische Vorgänge als Ursache anzusehen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die Hemmung von Calpain Proteasen zur Stabilisierung von Fokalen Adhäsionen führt und die Substratablösung verringert. Da zu den Substraten von Calpain einige Proteine der Fokalen Adhäsionen gehören, scheint es, dass diese im Zuge des „*rear detachment*“ gezielt abgebaut werden [25].

#### **1.1.1.2 Lamellipodien und Filopodien**

Für die Zellmigration ist die Dynamik der Fokalen Adhäsionen von entscheidender Bedeutung. Bei migrierenden Zellen ändert sich die Proteinzusammensetzung und Morphologie der Fokalkontakte im Laufe der Bewegung. Lamellipodien und Filopodien gehören neben den Stressfasern zu den Aktinstrukturen, die eine entscheidende Rolle in der Zellmigration spielen [24].

Lamellipodien bestehen aus einem Netzwerk kurzer, verzweigter Aktinfilamente im Bereich der Zellspitze und dienen so dem mechanischen Vorschub der Zelle [56]. Die Formierung des Aktinnetzwerkes an der Zellspitze erfolgt über seitliche Anlagerung neuer Aktinfilamente an bereits existierende Filamente, wodurch die Bildung eines weit verzweigten Netzwerkes gewährleistet ist [46, 64]. Die Ausbildung neuer Filamente wird schließlich durch *Capping*-Proteine inhibiert; auf diese Weise kommt es einerseits zu

einer Festigung des bestehenden Netzwerkes, andererseits zu einer Konzentration der Polymerisation ausschließlich auf die Protrusionsregion an der Zellmembran [48, 53].

Die Ausbildung von Lamellipodien wird über aktiviertes Rac, ein Mitglied der Proteinfamilie der Rho-GTPasen gesteuert [27, 40]. Frühe Adhäsionen entstehen beim Vorschub des Lamellipodiums nahe der Zellfront und werden Fokalkomplexe genannt. Sie sind klein ( $0,25 \mu\text{m}^2$ ) und enthalten neben einem Integrin auch andere Proteine wie Talin, Paxillin und weitere tyrosinphosphorylierte Proteine. Die meisten Fokalkomplexe lösen sich während der Retraktion des Lamellipodiums, bzw. Filopodiums wieder auf. Andere vergrößern sich und bilden stabile Fokale Adhäsionen aus, indem sie weitere Proteine hinzuziehen.

Filopodien hingegen sind dünne intrazelluläre Gebilde, bestehend aus langen, parallel angeordneten Aktinfilamenten. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Entstehung der Filopodien von den Ausläufern des Lamellipodien-Netzwerkes ausgeht; die Wirkung der *Capping*-Proteine wird aufgehoben und es kommt zu einer nachträglichen Elongation der bestehenden Filamente [65]. Proteine der Ena/VASP-Familie und Formine spielen in diesem Prozess eine wichtige Rolle [1, 58], des Weiteren ist Cdc42 als ein weiteres Protein der Rho-GTPasen an der Filopodienbildung beteiligt [27, 40].

### 1.1.1.3 Stressfasern

Stressfasern bilden eine weitere Aktinfilamentformation, die eine entscheidende Rolle in der Zellmigration und -adhäsion an die EZM besitzt. Diese Aktinfilamente sind insbesondere für die Retraktion des Zellpols während des Migrationsvorganges zuständig. Stressfasern bestehen aus kurzen Aktinfilamenten mit wechselnder Polarität, welche über Querverbindungen durch  $\alpha$ -Actinin und andere aktinbindende Proteine verbunden sind [5, 54].  $\alpha$ -Actinin und Myosin sind in periodischen Abständen entlang des Aktinnetzwerkes angeordnet.

Es existieren 3 verschiedene Arten der Stressfasern: ventrale, transversale und dorsale Stressfasern. Die ventralen Stressfasern sind typischerweise durch beide Enden mit den Fokalen Adhäsionen verbunden. Sie sind, wie der Name sagt, im ventralen Bereich der Zelle lokalisiert und beeinflussen dort die Zelladhäsion und -kontraktion. Transversale Stressfasern sind gewundene Actomyosinbündel, die nicht direkt mit den Fokalen Adhäsionen verbunden sind, sondern sich frei in der Zelle bewegen und dabei einer Ausrichtung von der Zellperipherie Richtung Zellinnerem folgen. Dorsale Stressfasern sind an der ventralen Seite mit den Fokalen Adhäsionen verbunden und ziehen meist bis zum dorsalen Anteil der Zelle [20, 24, 62].

#### 1.1.1.4 Rho-GTPasen

Die Ausbildung von Stressfasern wird über die Familie der kleinen Rho-GTPasen reguliert [55, 76]. GTPasen sind Proteine von 20-40 kDa, die über alternierende GTP- bzw. GDP-Bindung in Signaltransduktionsketten fungieren. Die Rho-GTPasen lassen sich in 5 Unterfamilien einteilen: Rho, Rac, Cdc42, Rnd und RhoBTB. Für die Formierung des Aktinzytoskeletts sind vor allem Rho, Rac und Cdc42 zuständig.

Die Formierung und Kontraktion von Stressfasern erfolgt über die Rho-Aktivierung, indem GTP-gebundenes Rho die Rho-assoziierte Kinase aktiviert. Diese wiederum inhibiert die Aktinfilament-Depolymerisation über eine Inaktivierung der depolymerisierenden Faktoren; z.B. werden die Cofiline mittels Phosphorylierung durch die LIM-Kinase inhibiert. Die Kontraktion der Stressfasern wird über die Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten reguliert. Des Weiteren führt Rho direkt zu einer Aktivierung der Formine und somit zu einer weiteren Formierung von Aktinfilamenten während der Stressfaser-Bildung [27].

#### 1.1.1.5 Adhäsionsverbindungen

Aktinfilamente sind außerdem an der Bildung verschiedener interzellulärer Kontakte beteiligt. In den Adhäsionsverbindungen (Desmosomen) stehen die Aktinfilamente zweier benachbarter Zellen in Kontakt. An der Bildung dieser Kontakte sind außerdem Cadherine (Transmembranproteine) und verschiedene Ankerproteine, u.a. Catenine, Vinculin und  $\alpha$ -Actinin, beteiligt [14].

### 1.1.2 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind zytoplasmatische Strukturproteine. Sie haben einen Durchmesser von ca. 10 nm und werden aus monomeren Untereinheiten von ca. 48 nm Länge zusammengesetzt. Jedes Monomer besitzt beidseitig endständige globuläre Domänen, die für den jeweiligen Intermediärfilament-Typ spezifisch sind. Über eine *Coiled-Coil*-Dimer-Bildung und anschließende Tetramerbildung entsteht das charakteristische Intermediärfilament; bestehend aus einem Tetramer im Zentrum und sieben darum gewickelten Tetrameren [15, 77].

Unterteilt werden die Intermediärfilamente in 5 verschiedene Typen: saure und basische Keratine, Desmine (z.B. Desmin und Vimentin, welche in Muskelzellen und mesenchymalen Zellen vorkommen), Neurofilamente und Lamine (Vorkommen im Zellkern).

### 1.1.2.1 Zytokeratine

In epithelialen Zellen bilden die Zytokeratine mit ca. 5 % den größten Anteil des Gesamtproteins. Die Zytokeratine lassen sich in 2 Subklassen unterteilen, wobei Keratin I die Subtypen K9-K20 und Keratin II die Subtypen K1-K8 enthält. In der Zelle organisieren sich die Zytokeratine als Heteropolymere, bestehend aus einem Subtyp der Klasse I und einem Subtyp der Klasse II [2, 12, 19, 49, 73]. Die Keratine der Subklassen I und II werden über 2 Genfamilien bestehend aus über 50 verschiedenen Genen kodiert. Die meisten epithelialen Zellen exprimieren über 10 verschiedene Keratine [22, 44, 59]. Über transkriptionale Genregulation und die spezifischen Eigenschaften der über 50 verschiedenen Proteinsequenzen ergeben sich für die unterschiedlichen epithelialen Gewebetypen ganz spezifische Keratinfunktionen und -regulationsmechanismen [52]. Die Keratine dienen in den epithelialen Zellen als Proteingerüst und haben somit entscheidenden Einfluss auf die Zellarchitektur, -größe und -proliferation. Sie spielen aber wahrscheinlich keine Rolle in der Differenzierung der jeweiligen Epithelien [16, 21, 50].

Keratinfilamente (s. Abb.2) zeichnen sich durch eine hohe Viskoelastizität und Flexibilität aus, gleichzeitig zeigen sie aber auch eine hohe Stabilität bei Deformation der Zelle. Das gesamte Keratingerüst ist in der Lage Deformationen nachzugeben, ohne dabei zerstört zu werden, und reorganisiert sich am Ende des Deformationsstress in kürzester Zeit wieder in seine Ausgangssituation. Diese Fähigkeit beruht auf der Tatsache, dass sich die Keratinuntereinheiten axial aneinander entlang bewegen und so ihre eigentliche Position im Gesamtgefüge behalten können [28, 43, 44]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich Keratine durch eine hohe Formstabilität auszeichnen, diese aber in Anwesenheit von Phospholipiden verloren geht [73, 74]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sich das Keratinnetzwerk in einem ständigen dynamischen Umbau befindet, in der Zellperipherie werden kontinuierlich neue Filamente gebildet, welche sich dann wiederum in einer ständigen Bewegung Richtung Zellkern befinden [70, 71, 72, 75].

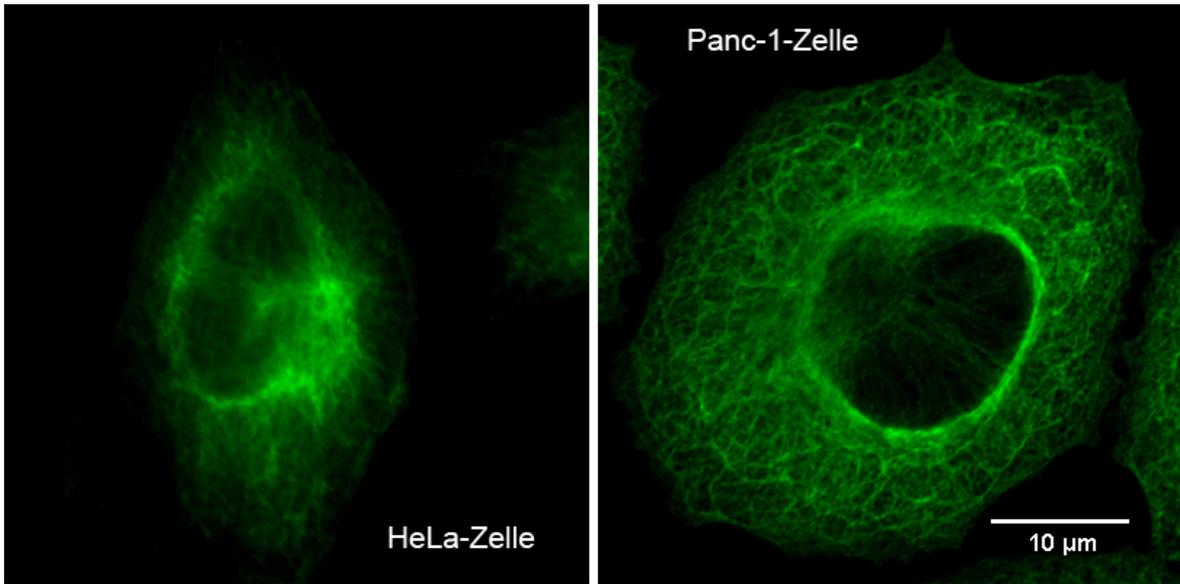


Abbildung 2: **Zytokeratinskelett in HeLa- und Panc-1-Zellen (Pfeilmarkierung)**. Links: Die HeLa-Zellen wurden für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Rechts: Panc-1-Zellen (die Immunfluoreszenz entsprach der Methode bei den HeLa-Zellen).

Zytokeratin 8 (K8) und 18 (K18) sind die vorherrschenden Intermediärfilamente in einfachen Epithelien, ebenso wie in Karzinomen, die aus diesen Epithelien hervorgehen [2, 37, 51, 42]. Die Expression der Keratine in Tumorzellen, die von diesen Epithelien abstammen, hat dazu geführt, dass der Nachweis dieser Zytokeratine mittels monoklonaler Antikörper heutzutage zur Identifikation von Karzinomen verwendet wird.

Eine wichtige Form der posttranslationalen Modifikation der Zytokeratine stellt die Phosphorylierung dar; diese führt zu einer Reorganisation des Zytokeratinskeletts. Im Keratin 8 ist die Aminosäure Serin an der Position 431 (Ser431) der Hauptphosphorylierungsort, im Keratin 18 ist dies Serin 52 (Ser52) [2, 49]. Eine Phosphorylierung des Ser431 im Keratin 8 wird durch die Kinasen cdc2 und MAP-Kinase beeinflusst und erfolgt u.a. bei Stimulation mit EGF, bei hyperosmotischem Stress und während eines Zellzyklus-Arrestes [7, 8, 34, 35, 66]. Im Keratin 18 erfolgt die Phosphorylierung des Ser52 durch mehrere verschiedene Kinasen (PKC, S6-Kinase, CaM-Kinase) und wird während der Mitose und durch verschiedene Formen des Zellstress ausgelöst [36, 41, 45]. Außerdem führt die Behandlung von epithelialen Tumorzellen mit SPC zu einer Reorganisation des Keratinskeletts und im Rahmen dessen zu einer Phosphorylierung des Ser431 im Keratin 8 und des Ser52 im Keratin 18 [2, 29, 30, 33].

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Auswirkungen der Phosphorylierung

cDNA-Plasmide des Wildtyps des Keratin 8 und 18 und die Keratinkonstrukte K8-S431-E / K18-S52-E und K8-S431-A / K18-S52-A verwendet. Es handelt sich beim Wildtyp des Keratin 8 und 18 um cDNA-Plasmide, die mit K8-eCFP und K18-eYFP getagged wurden. Die Keratin-Konstrukte K8-S431-E und K18-S52-E sind phosphomimetische Mutanten; hier wurde die Aminosäure Serin an Position 431, bzw. 52 durch Glutaminsäure ersetzt. K8-S431-E führt nach Transfektion zu einer perinukleären Organisation des Keratins mit Zunahme der Filamente um den Kern und einer Abnahme in der Peripherie des Keratinnetzwerkes. In den Konstrukten K8-S431-A / K18-S52-A erfolgte ein Austausch des Serins Ser431, bzw. Ser52 gegen Alanin. Dadurch sind die Keratin-Konstrukte nicht mehr in der Lage phosphoryliert zu werden. Eine Reorganisation und perinukleäre Anordnung des Keratins kann unter Behandlung mit SPC, einem Stimulus zur Phosphorylierung, nur bei dem Keratin-Konstrukt K18-S52-A erfolgen [2], [Busch, T. unveröffentlichte Befunde].

Während der Apoptose kommt es zu Protease-vermittelten Strukturveränderungen der Zellen. Diese Proteasen gehören zur Familie der Caspasen. Das Zytokeratin 18 reorganisiert sich in diesem Prozess zu einer granulären Struktur, angereichert mit Zytokeratin 18, das am Serin 53 phosphoryliert ist. Zytokeratin 18 wird durch die Caspase-6 in ein NH-terminales 26-kD-Fragment und ein COOH-terminales 22-kD Fragment gespalten, die Caspasen 3 und 7 spalten das 22-kD Fragment zu einem 19-kD Fragment. Während Zytokeratin 18 durch die Caspasen gespalten wird, ist Zytokeratin 8 resistent gegenüber einer Spaltung durch diese Proteasen. Da aber Zytokeratin 8 und 18 ein Heteropolymer bilden, hat sich gezeigt, dass sobald eines der beiden im Übermaß in der Zelle vorhanden ist, dieses abgebaut wird [3].

Onkogene der AP-1-Familie wie *jun* und *fos* und ETS-Transkriptionsfaktoren, die Ras-GTPasen aktivieren, stimulieren die Zytokeratin 18-Expression [67]. Der Vergleich der Transkriptionskontrollmechanismen der K18-Expression in gesunden und pathologischen Geweben führt zu der Annahme, dass die ständige K8- und K18-Expression einen direkten Zusammenhang mit der Aktivität multipler Onkogene hat, die im Nukleus auf eine begrenzte Anzahl an Transkriptionsfaktoren treffen und die Expression verschiedenster Gene (inklusive der Gene der Zytokeratine) beeinflussen [51].

### 1.1.3 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinfilamente und bilden zusammen mit den Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten das Zytoskelett. Sie bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, welches in helicaler Anordnung polymerisiert. Zur Ausbildung einer Drehung

werden 13 - 14 Tubulindimere benötigt, die Durchmesser solcher Mikrotubuli variieren zwischen 15 und 25 nm. Polymerisiertes und depolymerisiertes Tubulin liegen im Zytoplasma im Gleichgewicht vor, es herrscht ein ständiger dynamischer Umbau der Filamente. Die Dynamik der Mikrotubuli wird durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine gewährleistet (Motorproteine wie Dynein und Kinesin, MAP, u.a.). Des Weiteren sind die Mikrotubuli für die Ausbildung der Zentriolen verantwortlich. Diese kommen in der Regel paarweise vor und verdoppeln sich bei der Zellteilung. Zusammen mit dem perizentriolären Körper werden sie als Zentrosom bezeichnet.

Eine weitere Funktion der Mikrotubuli ist der intrazelluläre Transport von Vesikeln und Granula; außerdem bilden sie während der Zellteilung den Spindelapparat aus, über den die Chromatiden zu den Polen der Zelle gezogen werden [31, 38].

## 1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen der einzelnen Elemente des Zytoskeletts zu untersuchen. Während die Rolle der Aktinfilamente für die Zellstruktur und -adhäsion bereits weitreichend beschrieben ist, ist die Funktion der Zytokeratine, deren Interaktionen mit den anderen Zytoskelett-Elementen und ihr Einfluss auf die Zellstruktur wenig geklärt.

Zu diesem Zweck wurden mit Panc-1- und HeLa-Zellen zwei verschiedene epitheliale Tumorzellmodelle aus dem Pankreas-Karzinom und dem Zervix-Karzinom verwendet, deren Zytokeratin-Gehalt nahezu ausschließlich aus den Keratinen 8 und 18 besteht.

Die wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit lauteten wie folgt:

- Welche Auswirkungen hat die Zytokeratin-Depletion auf die Morphologie der Zelle?
- Welche Rolle spielen die Zytokeratine 8 und 18 für das Adhäsionsverhalten der epithelialen Tumorzellen?
- Wie reagieren andere Zytoskelett-Elemente auf die Depletion der Zytokeratine?
- Gibt es einen Unterschied in der Reaktion auf die Zytokeratin-Depletion bei Panc-1- und HeLa-Zellen?

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Zellbiologie

Dulbecco´s modified Eagles Medium (DMEM), PBS (phosphat buffered saline) und Trypsin und wurden von GIBCO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Das fötale Kälberserum (FCS) stammt von Sigma (Saint Louis, Missouri, USA).

Die Versuche wurden mit Panc-1-Zellen (European Collection of Cell Culture, United Kingdom), dies sind epitheliale Pankreaskarzinomzellen humaner Herkunft, und mit HeLa-Zellen (European Collection of Cell Culture, United Kingdom), hierbei handelt es sich um humane Zervixkarzinomzellen, durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% passagiert.

### 2.2 Transfektion

Das Transfektionsreagenz HiPerFect stammt von Qiagen (Hilden, Deutschland), Fugene HD von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) und Metafectene vom Biontex (Martinsried, Deutschland). Das Medium Optimem wurde von GIBCO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

#### 2.2.1 small interfering RNA (siRNA)

SiRNA ist ein Spaltprodukt längerer Doppelstrang-RNA und wird durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen oder beidseitige Transkription eines Gens hergestellt. Die siRNA aktiviert den RNAi-(RNA interference) Komplex und führt so zu einer Inaktivierung

der entsprechenden mRNA.

Die Transfektion der siRNA in HeLa- und Panc-1-Zellen erfolgte mit dem Reagenz HiPerFect (Qiagen, Hilden, Deutschland). Das Transfektionsreagenz besteht aus einer Mischung aus kationischen und neutralen Lipiden und führt so über die Bildung von Liposomen zu einer Endozytose der siRNA und Abgabe dieser in die Zellen. Verwendet wurden die Keratin 8 siRNA (siCK8) und die non-silencing siRNA der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland), außerdem die Keratin 18 siRNA (siCK18) der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland).

24h vor der Transfektion mit der siRNA wurden die HeLa- und Panc-1-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in 35mm-Schalen mit oder ohne sterile 22mm-Deckgläschen ausplattiert. Für die Transfektion wurden 6  $\mu$ l einer 2mM Verdünnung der jeweiligen siRNA in 100  $\mu$ l Optimem verdünnt und anschließend 12  $\mu$ l HiPerFect zugegeben. Bei einem Endvolumen von 2 ml je 35mm-Schale lag somit die Endkonzentration der siRNA, die zur Transfektion eingesetzt wurde, bei 5 nM. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurde der siRNA/HiPerFect-Komplex tropfenweise zu den jeweiligen Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin gegeben. 24h nach Zugabe des Transfektions-Komplexes erfolgte ein Mediumwechsel mit 2 ml DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Für die Experimente zur Untersuchung des Zytoskeletts wurden, soweit nicht gesondert beschrieben, die Zellen 72h nach Beginn der Transfektion verwendet, da hier nach den Experimenten zur Etablierung der siRNA siCK8 und siCK18 das Maximum des Knockdowns lag.

### **2.2.2 Keratin-cDNA-Konstrukte**

Die verwendeten Keratin-cDNA-Konstrukte wurden von Tobias Busch (AG Prof. Seufferlein, Innere Medizin I, Universitätsklinik Ulm) mit dem Quickchange Site Direct mutagenesis kit (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) kloniert.

Es handelt sich beim Wildtyp des Keratin 8 und 18 um cDNA-Plasmide, die mit K8-eCFP und K18-eYFP getagged wurden. Die Keratin-Konstrukte K8-S431-E und K18-S52-E sind phosphomimetische Mutanten; hier wurde die Aminosäure Serin an Position 431, bzw. 52 durch Glutaminsäure ersetzt. Umgekehrt sind die Keratin-Konstrukte K8-S431-A und K18-S52-A nicht mehr in der Lage phosphoryliert zu werden. In diesen Konstrukten erfolgte ein Austausch des Serins Ser431, bzw. Ser52 gegen Alanin.

### **2.2.2.1 Transfektion der HeLa-Zellen mit Fugene HD**

Die Transfektion der Keratin-cDNA-Konstrukte in die HeLa-Zellen erfolgte mit dem Reagenz Fugene HD (Roche, Mannheim, Deutschland).

Bei der Transfektion mit Fugene HD handelt es sich um einen Liposomen-vermittelten Gentransfer. Die zu transfizierende cDNA wird von polykationischen Lipiden komplexiert und in dieser Form durch Verschmelzung mit der Zellmembran oder über Endozytose in die eukaryontischen Zellen aufgenommen.

24h vor der Transfektion mit cDNA der Keratin-Konstrukte wurden die HeLa-Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in 35mm-Schalen ausplattiert. Es wurden immer simultan entweder die K8-S431-E- und K18-S52-E-Konstrukte oder die K8-S431-A- und K18-S52-A-Konstrukte verwendet. Für die Transfektion wurden je 0,5 µg der jeweiligen cDNA für Keratin 8 und Keratin 18 in 100 µl Optimem verdünnt und dann 6 µl Fugene HD zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei RT. Dann wurde der cDNA/Fugene HD-Komplex tropfenweise zu die HeLa-Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin gegeben. Für die Experimente wurden die Zellen 24h nach der Transfektion verwendet, da nach dieser Zeit die Expression der transfizierten Konstrukte das Maximum erreicht hatte.

### **2.2.2.2 Transfektion der Panc-1-Zellen mit Metafectene**

Die Transfektion der Keratin-cDNA-Konstrukte in die Panc-1-Zellen erfolgte mit dem Reagenz Metafectene (Biontex, Martinsried, Deutschland).

Es handelt sich hierbei um ein polykationisches Transfektionsreagenz, welches in Kombination mit einem neutralen Kolipid in liposomaler Form vorliegt. Die verwendete cDNA wird komplexiert und gelangt Liposomen-vermittelt in die Zelle.

Die Panc-1-Zellen wurden 24h vor der Transfektion in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in 35mm-Schalen ausgesät. Auch hier wurden immer entweder die K8-S431-E- und K18-S52-E-Konstrukte oder die K8-S431-A- und K18-S52-A-Konstrukte zusammen verwendet. Zur Transfektion wurden je 0,5 µg der jeweiligen cDNA für Keratin 8 und Keratin 18 in 50 µl Optimem verdünnt, ebenso wurden 4 µl Metafectene in weitere 50 µl Optimem gegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden diese beiden Ansätze miteinander gemischt und nach weiteren 15 min Inkubation bei RT erfolgte die tropfenweise Zugabe zu den Panc-1-Zellen in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Für die Experimente wurden die Zellen 24h nach der Transfektion verwendet, da nach dieser Zeit die Expression der transfizierten Konstrukte das Maximum erreicht hatte.

## 2.3 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland).

## 2.4 Quantitative one step real-time PCR

Der quantitative Nachweis einer Reduktion der Zytokeratine 8 und 18 auf mRNA-Ebene erfolgte mittels one-step real-time PCR am Lightcycler der Firma Roche (Mannheim, Deutschland).

Die quantitative Real-Time-PCR (RT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren entsprechend der herkömmlichen PCR mit einer zusätzlichen Quantifizierungsmöglichkeit. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Am Ende eines Laufs, bestehend aus mehreren Zyklen, wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Am Lightcycler erfolgt die Fluoreszenzmarkierung und -messung über sogenannte FRET-Sonden (Fluorescence resonance energy transfer). Zwei verschiedene, jeweils mit einem FRET-Donor bzw. FRET-Akzeptor markierte Oligonukleotide, die nebeneinander an die Ziel-Sequenz binden und damit die Fluorochrome in eine für den FRET ausreichende Nähe bringen, werden als Sonden für die Quantifizierung eingesetzt. Die Messung findet am Ende der Annealing-Phase in jedem Zyklus statt (*real-time*). Anschließend kann dann eine Schmelzkurvenanalyse erfolgen.

## 2.5 Zytokeratin-Extraktion

Die Extraktion des Zytokeratins aus Panc-1- und HeLa-Zellen erfolgte mittels 8M Harnstoff. Nach erfolgter Transfektion wurde die Zellyse mit 250µl (je 35mm Schale) Triton high Salt Lysis Buffer (20mM Tris-HCl pH 7,4, 600mM KCl, 1% TritonX-100, 1 Tablette Proteinaseinhibitor cocktail der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) je 10 ml) durchgeführt. Die Zellen wurden nach Zugabe des Lysepuffers 20min bei 4°C auf Eis geschüttelt. Nach Zentrifugation (20min bei 10.000rpm) des Lysats bei 4°C erfolgte eine erneute Zugabe von 1ml Lysepuffer zum Pellet. Anschließend wurde der Ansatz

für ca. 45min auf Eis inkubiert und in regelmäßigen Abständen geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 10.000rpm wurden nun 200µl 8M Harnstoff (Verdünnung mit H<sub>2</sub>O) zum Pellet gegeben. Dann wurden die Proben mit 1400rpm für ca. 45min bei 37°C geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 50µl 5x SDS-Page-Probenpuffer und eine 10minütige Inkubation bei 99°C. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western Blot.

## 2.6 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erfolgte in einem diskontinuierlichen SDS-Elektrophoresesystem nach Lämmli [39] in einem Sammelgel (Sammelgelpuffer: 0,5M TrisHCl; pH 6,8 mit 4% Acrylamid) und wurde in einem anschließenden Trenngel (Trenngelpuffer: 1,5M TrisHCl; pH 8,8 mit 10% Acrylamid) aufgetrennt. Als Proteingrößenstandard wurde der BENCHMARK prestained protein ladder (enthält 10 Proteine von 10 bis 200 kDa, Life Technologies, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Trispuffer (0,1% SDS, 384 mM Glycin, 50 mM Tris) eingesetzt.

Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer (4h bei 400 mA) auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach, Deutschland) transferiert (Transferpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20% Methanol). Die Zytokeratine wurden mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper (Immunotech/Coulter Beckman, Krefeld, Deutschland) markiert. Dieser Antikörper bindet an alle vorhandenen Zytokeratine, unabhängig davon welcher Subtyp vorliegt. Die Immundetektion des Zytokeratins erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Sekundärantikörpern. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zum Blocken der freien Bindungsstellen für 1h bei RT in PBS mit 5% BSA inkubiert. Dann wurde die Membran mindestens 24h mit entsprechend in PBS mit 5% BSA 1:1000 verdünntem Antikörper geschwenkt. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,05% PBS/Tween20 erfolgte eine einstündige Inkubation mit Anti-Maus-spezifischen Peroxidase gekoppelten IgG (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Konjugate wurden in PBS/0,05% Tween20 verdünnt. Zur Visualisierung der Immunkomplexe wurde die Membran mehrmals mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen und mit Substratlösung (Super Signal Pico Stable Peroxide Solution/Super Signal West Pico Luminol Enhancer Solution (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland)) für die Peroxidase 1 min inkubiert und im Belichter (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) für 5-10 min exponiert und

über das Programm Image analysis (ChemiSmart System von peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) ausgewertet.

## 2.7 Immunfluoreszenz

Der monoklonale Panzytokeratin-Antikörper stammt von Immunotech (Coulter Beckman, Krefeld, Deutschland), der monoklonale Paxillin-Antikörper von Biomol (BD Transductions, Hamburg, Deutschland) und das Alexa-Phalloidin für die Aktin-Immunfluoreszenz von Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm und 568nm) stammen von Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Das Triton X-100 und die Fischhautgelatine kamen von Sigma (Saint Louis, Missouri, USA), das Aqueos Mounting Medium von Immunotech (Coulter Beckman, Krefeld, Deutschland).

Das Triton X-100 und die Fischhautgelatine wurden in PBS verdünnt. Die Bild Darstellung der Versuche erfolgte am IX-1-Mikroskop der Firma Olympus (Hamburg, Deutschland) bei 600facher Vergrößerung (Plan APO Objektiv mit Öl). Die Aufnahmen der Paxillin-Immunfluoreszenz wurden am konfokalen Lasermikroskop der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland), das mit einem 25 mW Krypton-Argon-Laser und einem 63x-Objektiv ausgestattet ist, erstellt.

72h nach Transfektion wurde die Fixierung der Zellen nach Absaugen des Mediums durch Zugabe von 3,5% Formalin (Verdünnung mit PBS) für 10 min durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen in PBS folgte dann eine 10-minütige Inkubation mit 50 mM Ammoniumchlorid. Diese Inkubation verhindert eine weitere Wirkung des Formalins auf die Zellen. Anschließend wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und für 15 Minuten in 0,6% Triton X-100 permeabilisiert. Es folgte eine 15-minütige Behandlung mit 0,3% Fischhautgelatine, wobei auch hier zuvor 2 Waschschrte zu je 2min mit PBS durchgeführt wurden. Durch die Behandlung mit Fischhautgelatine werden unspezifische Bindungen geblockt, ohne die für die Antikörperbindung wichtigen Epitope zu beeinflussen.

### **2.7.1 Panzytokeratin-Immunfluoreszenz**

Nun wurden die Zellen für mindestens 16h bei 4°C mit dem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert. Dieser wurde 1:200 in 0,6% Triton X-100 und 0,3% Fischhautgelatine in PBS verdünnt. Anschließend erfolgten 3 Waschstschritte mit PBS und die Inkubation (1h bei Raumtemperatur) mit einem fluorochrommarkierten Sekundärantikörper, der ebenfalls in 0,6% Triton X-100 und 0,3% Fischhautgelatine in PBS verdünnt wurde. Abschließend wurden die Zellen noch dreimal für 2min in PBS gewaschen und mit Aquaeos Mounting Medium von Immunotech (Coulter Beckman, Krefeld, Deutschland) auf Objektträgern fixiert.

### **2.7.2 Aktin-Immunfluoreszenz**

Zur Immunfluoreszenz des Aktins wurde Alexa-Phalloidin 1:250 in 0,6% Triton X-100 und 0,3% Fischhautgelatine in PBS verdünnt und parallel mit dem Sekundärantikörper der Panzytokeratin-Immunfluoreszenz für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

### **2.7.3 Paxillin-Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz des Paxillins erfolgte entsprechend der Panzytokeratin-Immunfluoreszenz, allerdings wurde der monoklonale Paxillin-Antikörper 1:1000 verdünnt. Alle weiteren Arbeitsschritte entsprachen der Panzytokeratin-Immunfluoreszenz.

## **2.8 Adhäsionsversuche**

Die Adhäsionsmedien wurden von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. Es wurden Collagen-1 (rat tail) für die Panc-1-Zellen und Fibronectin für die HeLa-Zellen verwendet. In Vorversuchen wurden diese Adhäsionsmedien für die verschiedenen Zellreihen bestimmt (s. Kapitel 3.4). Das Rinderserumalbumin (BSA) stammt von Serva (Heidelberg, Deutschland).

Zur Vorbereitung wurden 12mm-Deckgläser für 1h bei 37°C mit 0,05 mg/ml Fibronectin, bzw. 0,1 mg/ml Collagen-1 inkubiert. Die HeLa-Zellen wurden 48h, die Panc-1-Zellen 72h nach Transfektion mit siRNA, bzw. 24h nach Transfektion mit den Keratin-Konstrukten und dem Keratin-Wildtyp verwendet. Zunächst wurden die Zellen in DMEM mit 0,5% BSA überführt und ebenfalls für 1h bei 37°C inkubiert. Diese Inkubation dient der Reorganisation des fokalen Adhäsionskomplexes.

Für die Adhäsionsversuche wurden jeweils  $3 \times 10^4$  Zellen pro 24-Well verwendet. Nach der Inkubation wurde zeitgleich die entsprechende Menge Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin auf die präparierten Deckgläser in einem 24-Well gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C. 15 min, bzw. 60 min nach Zellzugabe erfolgte ein Waschschriff mit PBS und anschließend eine Fixierung mit 3,5% Formalin für 10 min. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit PBS wurde 10 min mit 50 mM Ammoniumchlorid inkubiert und dann folgte die Fixierung auf Objektträgern mit Aqueous Mounting Medium von Immunotech (Coulter Beckman, Krefeld, Deutschland).

Ausgewertet wurde am Axiophot-Mikroskop der Firma Zeiss (Göttingen, Deutschland) in 400facher Vergrößerung. Es wurden hierbei je Ansatz 15 Gesichtsfelder ausgezählt.

## 2.9 Soft-Agar-Assays

Der Bacto-Agar stammt von DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, USA).

Zur Vorbereitung wurde flüssiger 5%iger Bacto-Agar 1:10 in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin verdünnt und auf 37°C temperiert. Jeweils 2 ml dieses 0,5%igen Bacto-Agars wurden in eine 35mm-Schale gegeben und 30 min bei RT polymerisiert. Als nächstes wurden die Panc-1- und HeLa-Zellen (24h nach Transfektion) auf eine Konzentration von  $12 \times 10^4$  Zellen/ml in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin verdünnt und anschließend 1:3 mit 0,5%igem Bacto-Agar vermischt. 750 µl dieser Verdünnung wurden auf die polymersierte Bacto-Agar-Fläche in der 35mm-Schale gegeben. Es ergab sich somit eine endgültige Zellkonzentration von 30.000 Zellen pro 35mm-Schale. Die Polymerisation dieses Zell-Agar-Gemisches erfolgte für ca. 1h bei 37°C. Abschließend wurde der Ansatz mit 1 ml DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin überschichtet. Je siRNA und Kontrolle wurde ein 3facher Ansatz durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte 96h nach Transfektion bei 200facher Vergrößerung am Axiovert 135-Mikroskop der Firma Zeiss (Göttingen, Deutschland), die Bilder der Zellkolonien wurden bei 400facher Vergrößerung aufgenommen. Hierbei wurden je Ansatz 12 Bilder aufgenommen, bei einem 3fachen Ansatz ergaben sich somit 36 Bilder je siRNA, auf denen alle Zellkolonien ausgezählt wurden.

## 2.10 Statistik

In den Experimenten zur Etablierung der Zytokeratin 8 und 18 spezifischen siRNA Oligonukleotide mittels RT-PCR erfolgt eine prozentuale Darstellung des Zytokeratingehaltes nach Depletion durch siRNA im Vergleich zu einer non-silencing-siRNA (si control).

In den Versuchen zum Adhäsionsverhalten und zum Zellkoloniewachstum unter Zytokeratindepletion wird der Mittelwert der jeweiligen Auszählungen inklusive der Standardabweichungen dargestellt. Auch hier erfolgt eine prozentuale Darstellung im Vergleich zu einer non-silencing-siRNA (si control), beziehungsweise beim Adhäsionsverhalten nach posttranslationaler Modifikation im Vergleich zum Keratin-Wildtyp.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der Zytokeratin 8 und 18 spezifischen siRNA Oligonukleotide mittels RT-PCR

Die Transfektion mit siCK8 und siCK18 führte sowohl in Panc-1-, als auch in HeLa-Zellen zu einer deutlichen Verminderung der mRNA für Zytokeratin 8 und 18. Die mRNA für Zytokeratin 8 in Panc-1-Zellen zeigte im zeitlichen Verlauf bereits 24h nach Transfektion mit siCK8 einen deutlichen Rückgang mit einem Maximum von mindestens 95% nach 48-72h (s. gelbe Balken, Abb.3).

Da Zytokeratin 8 und 18 ein Heteropolymer bilden, wurde zusätzlich eine Messung des mRNA-Gehalts für Zytokeratin 8 bei Transfektion von siCK18 durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Depletion des Zytokeratins 18 keinen Einfluss auf den mRNA-Gehalt für Zytokeratin 8 hat (Daten nicht graphisch dargestellt).

Die mRNA des Zytokeratins 18 zeigte wie beim Zytokeratin 8 beginnend bereits 24h nach Transfektion mit siCK18 eine Abnahme um mehr als 95%, das Maximum war ebenfalls nach ca. 48-72h erreicht (rote Balken, Abb.4). Hier wurden zur Kontrolle ebenfalls Messungen des Zytokeratin 18-mRNA-Gehaltes unter siCK8-Transfektion durchgeführt. Es ließ sich nachweisen, dass auch die Verminderung der Zytokeratin 8-mRNA keinen Einfluss auf die Zytokeratin 18-mRNA hat (Daten nicht graphisch dargestellt).

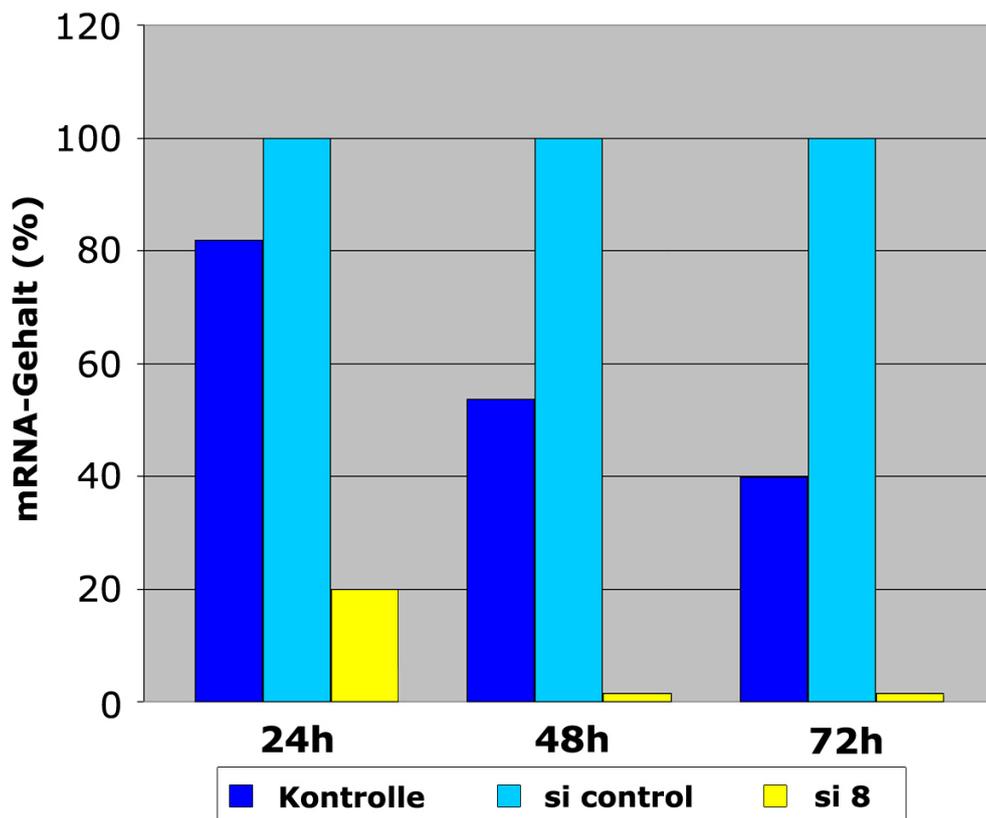


Abbildung 3: CK8 mRNA-Gehalt in Panc-1-Zellen nach Transfektion mit siCK8 und si control. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und si control in die Panc-1-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect. Nach 24h, 48h und 72h wurde die RNA-Extraktion mit dem RNeasy Kit durchgeführt, die Messung der mRNA erfolgte mittels one-step real-time-PCR am Lightcycler. Die Kontrolle bezeichnet untransfizierte Zellen. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Ergebnisse der non-silencing-siRNA. Dargestellt sind hier repräsentative Ergebnisse aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Messungen. (RNA = Ribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA, si = small interfering RNA, CK8 = Zytokeratin 8, si control = non-silencing-siRNA, PCR = Polymerasekettenreaktion)

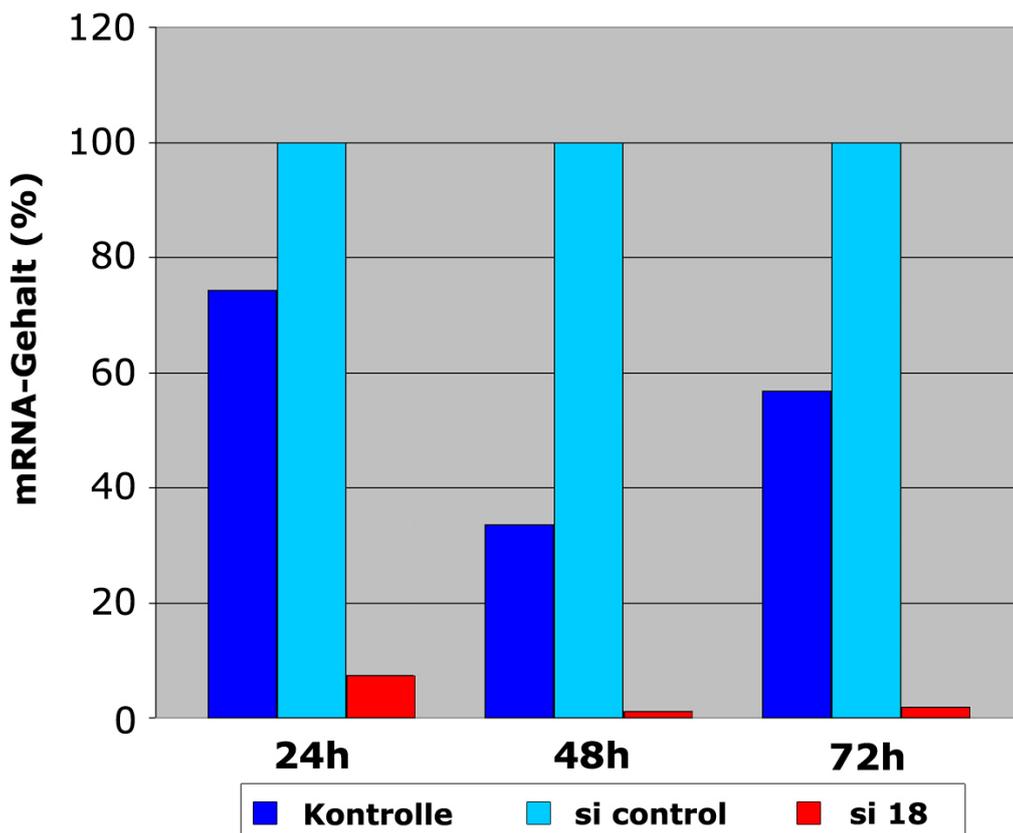


Abbildung 4: **CK18 mRNA-Gehalt in Panc-1-Zellen nach Transfektion mit siCK18 und si control.** Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK18 und si control in die Panc-1-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect. Nach 24h, 48h und 72h wurde die RNA-Extraktion mit dem RNeasy Kit durchgeführt, die Messung der mRNA erfolgte mittels one-step real-time-PCR am Lightcycler. Die Kontrolle bezeichnet untransfizierte Zellen. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Ergebnisse der non-silencing-siRNA. Dargestellt sind hier repräsentative Ergebnisse aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Messungen. (RNA = Ribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA, si = small interfering RNA, CK18 = Zytokeratin 18, si control = non-silencing-siRNA, PCR = Polymerasekettenreaktion)

Bei den in diesen Experimenten verwendeten HeLa-Zellen kam es nach 48-72h zu einem erheblichen Verlust adhärenter Zellen, was einerseits auf die Toxizität der Transfektion, andererseits aber auch im Vergleich zur si control-Transfektion auf einen Adhäsionsverlust CK8/18 depletierter Zellen zurückzuführen war (s. Kapitel 3.4). Daher werden hier nur die Ergebnisse nach 24h und 48h dargestellt. Insgesamt führte die Transfektion mit siCK8 zu einen Rückgang der mRNA für Zytokeratin 8 auf bis zu 25%, das Maximum lag hier bereits bei 24-48h (gelbe Balken, Abb.5).

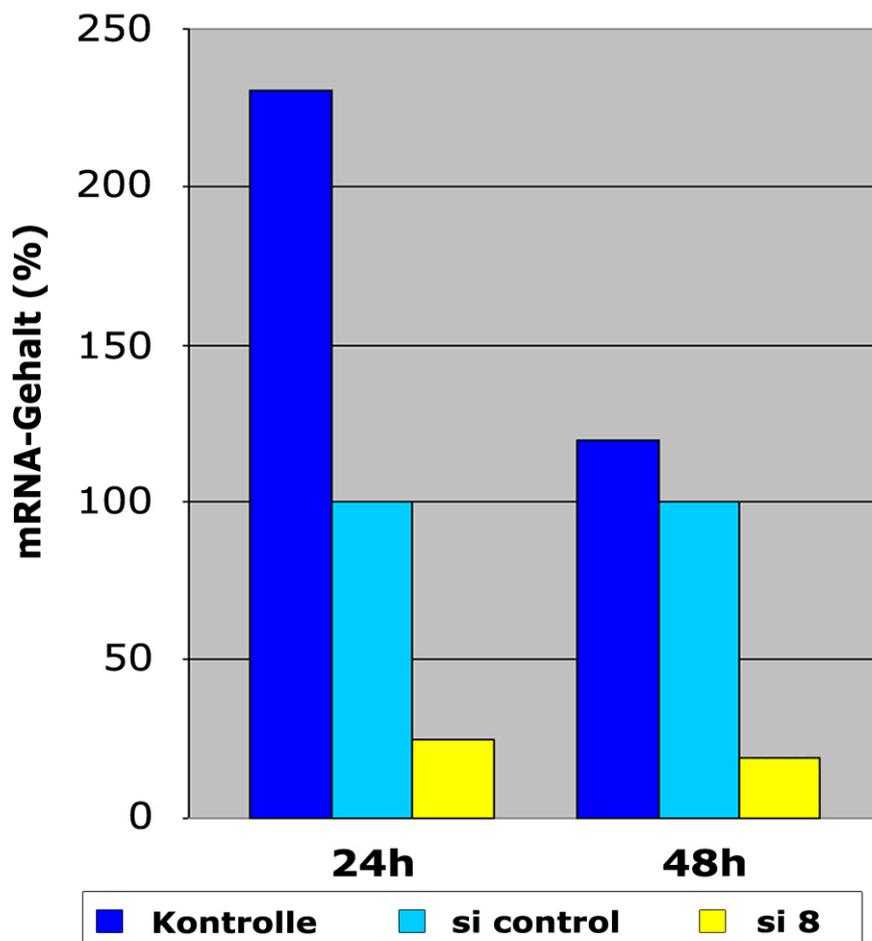


Abbildung 5: CK8 mRNA-Gehalt in HeLa-Zellen nach Transfektion mit siCK8 und si control. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und si control in die HeLa-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect. Nach 24h und 48h wurde die RNA-Extraktion mit dem RNeasy Kit durchgeführt, die Messung der mRNA erfolgte mittels one-step real-time-PCR am Lightcycler. Die Kontrolle bezeichnet untransfizierte Zellen. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Ergebnisse der non-silencing-siRNA. Dargestellt sind hier repräsentative Ergebnisse aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Messungen. (RNA = Ribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA, si = small interfering RNA, CK8 = Zytokeratin 8, si control = non-silencing-siRNA, PCR = Polymerasekettenreaktion)

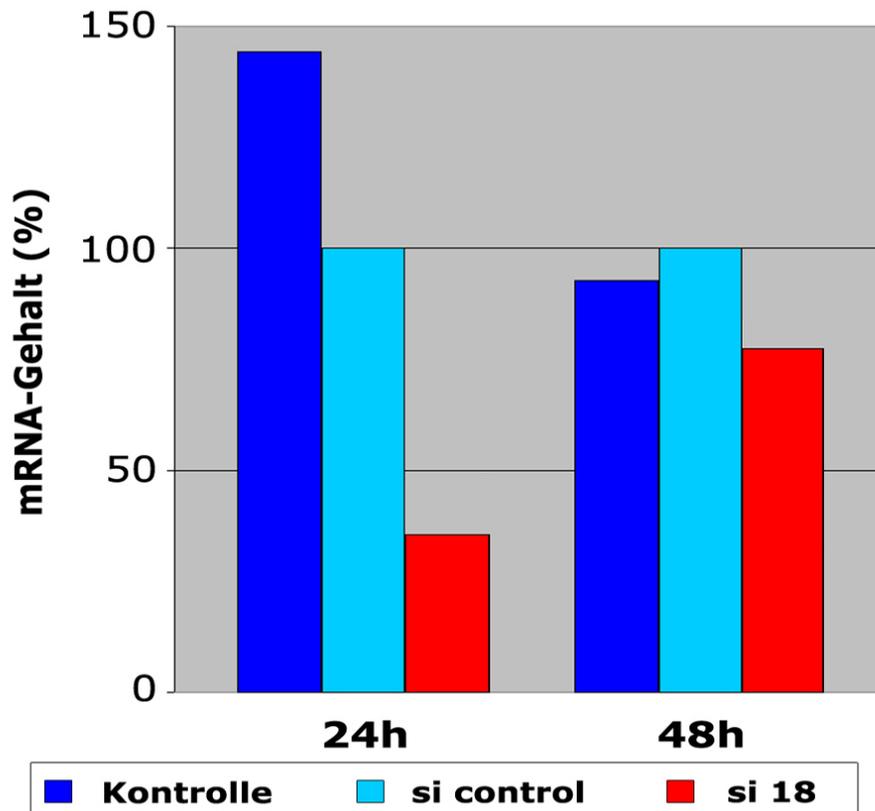


Abbildung 6: **CK18 mRNA-Gehalt in HeLa-Zellen nach Transfektion mit siCK18 und si control.** Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK18 und si control in die HeLa-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect. Nach 24h und 48h wurde die RNA-Extraktion mit dem RNeasy Kit durchgeführt, die Messung der mRNA erfolgte mittels one-step real-time-PCR am Lightcycler. Die Kontrolle bezeichnet untransfizierte Zellen. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf die Ergebnisse der non-silencing-siRNA. Dargestellt sind hier repräsentative Ergebnisse aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Messungen. (RNA = Ribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA, si = small interfering RNA, CK18 = Zytokeratin 18, si control = non-silencing-siRNA, PCR = Polymerasekettenreaktion)

Die Depletion der Zytokeratin 18-mRNA ist bei HeLa-Zellen im Vergleich zum Zytokeratin 8 weniger effektiv. Nach 24h ergab sich ein Rückgang auf ca. 30%, nach 48h war dieser Rückgang nicht mehr eindeutig nachweisbar (roter Balken, Abb.6). Die Kontrolle der Zytokeratin 18-mRNA nach Transfektion mit siCK8 ergab auch hier keinen Einfluss der Zytokeratin 8-Depletion auf den Zytokeratin 18-mRNA-Gehalt (Daten nicht graphisch dargestellt). Bei den HeLa-Zellen wurde aufgrund der Heteropolymer-Bildung ebenfalls eine Kontroll-Messung des Zytokeratin 8-mRNA-Gehaltes unter Zytokeratin 18-Depletion durchgeführt. Entsprechend der Ergebnisse bei Panc-1-Zellen hat die Verminderung der Zytokeratin 18-mRNA keinen Einfluss auf die Zytokeratin 8-mRNA (Daten nicht graphisch dargestellt).

### 3.2 Effekt der Zytokeratin 8 und 18 spezifischen siRNA Oligonukleotide auf die Proteinexpression von K8 und K18

Die Effizienz der siRNA Oligonukleotide wurde zusätzlich auf Proteinexpressionsebene untersucht. Die Expression des Gesamtzytokeratins in den unbehandelten und den si control-transfizierten Panc-1-Zellen stellte sich gleich dar. Die Menge an Panzytokeratin in den Zellen, die mit siCK8, siCK18 und beiden siRNAs transfiziert wurden, lag im Vergleich deutlich unter den Kontrollzellen (Abb.7). Es zeigte sich also nach der Reduktion des mRNA-Gehaltes auch ein entsprechender Rückgang der Proteinmenge des Panzytokeratins.

Ein eindeutiger Unterschied zwischen den verschiedenen Transfektionen mit siCK8 und siCK18 alleine, bzw. der kombinierten Transfektion mit siCK8/siCK18 ließ sich, entsprechend der Ergebnisse der mRNA-Bestimmungen, hier nicht nachweisen.

Die HeLa-Zellen zeigten auch in diesem Experiment ein deutliches Zelldetachment, der Panzytokeratingehalt der nicht transfizierten Zellen lag deutlich über dem der mit siCK8, siCK18, siCK8/siCK18 und si control transfizierten Zellen. Dennoch war bei den siCK8 transfizierten Zellen und denen, die mit siCK8 und siCK18 gleichzeitig transfiziert wurden, eine eindeutig verringerte Panzytokeratinkonzentration im Vergleich zu den si control transfizierten Zellen nachweisbar (Abb.8).

Wie bereits in der mRNA-Bestimmung zeigte sich auch in der Proteinbestimmung, dass bei den HeLa-Zellen die Verringerung des Zytokeratins 18 durch siCK18 nicht so effektiv war wie beim siCK8. Es ließ sich kein klarer Unterschied im Panzytokeratingehalt zwischen den si control und den siCK18 transfizierten Zellen nachweisen (Abb.8).

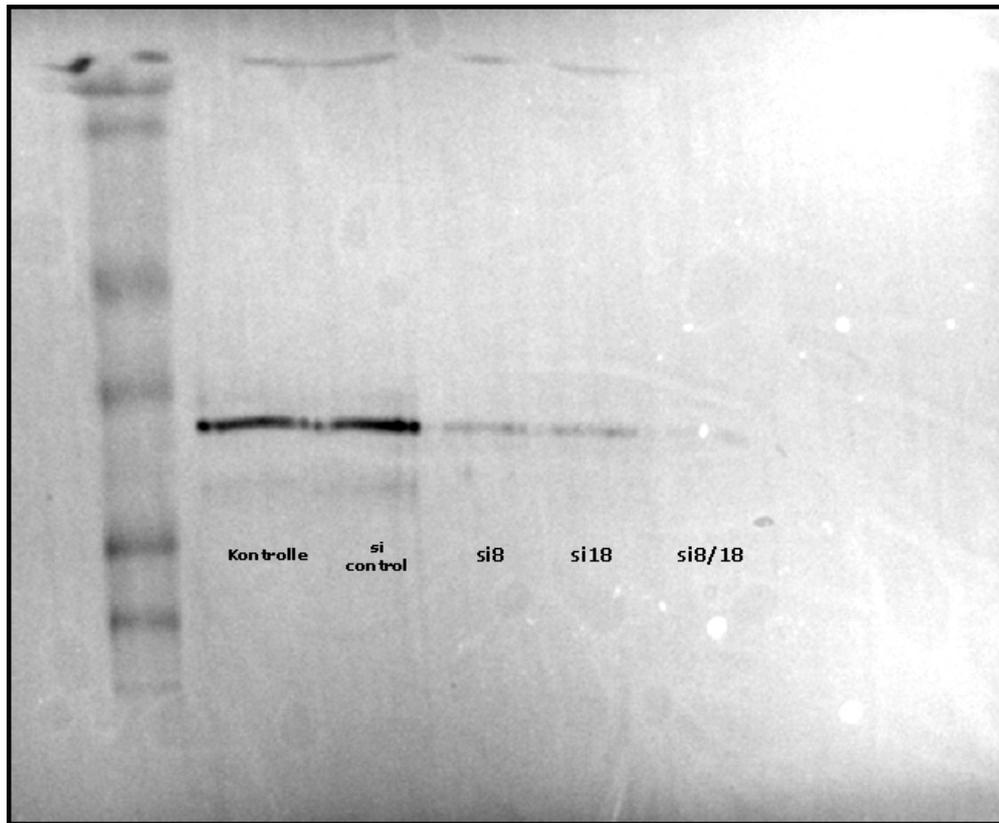


Abbildung 7: **Panzytokeratingehalt in Panc-1-Zellen nach Transfektion mit siCK8, siCK18 und si control.** Die Messung des Panzytokeratingehaltes erfolgte bei den Panc-1-Zellen 72h nach Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18, siCK8 und siCK18 kombiniert (si8/18) und si control mit HiPerFect. Die Extraktion des Zytokeratins wurde mittels 8Molar Harnstoff durchgeführt. Die Darstellung erfolgte im Westernblot nach erfolgter SDS-PAGE mit Markierung durch einen monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper und Immundetektion durch einen Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Sekundärantikörper. Als Marker diente der BenchMark Pre-Stained Protein Ladder von Invitrogen (6-180 kDa). (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA, SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

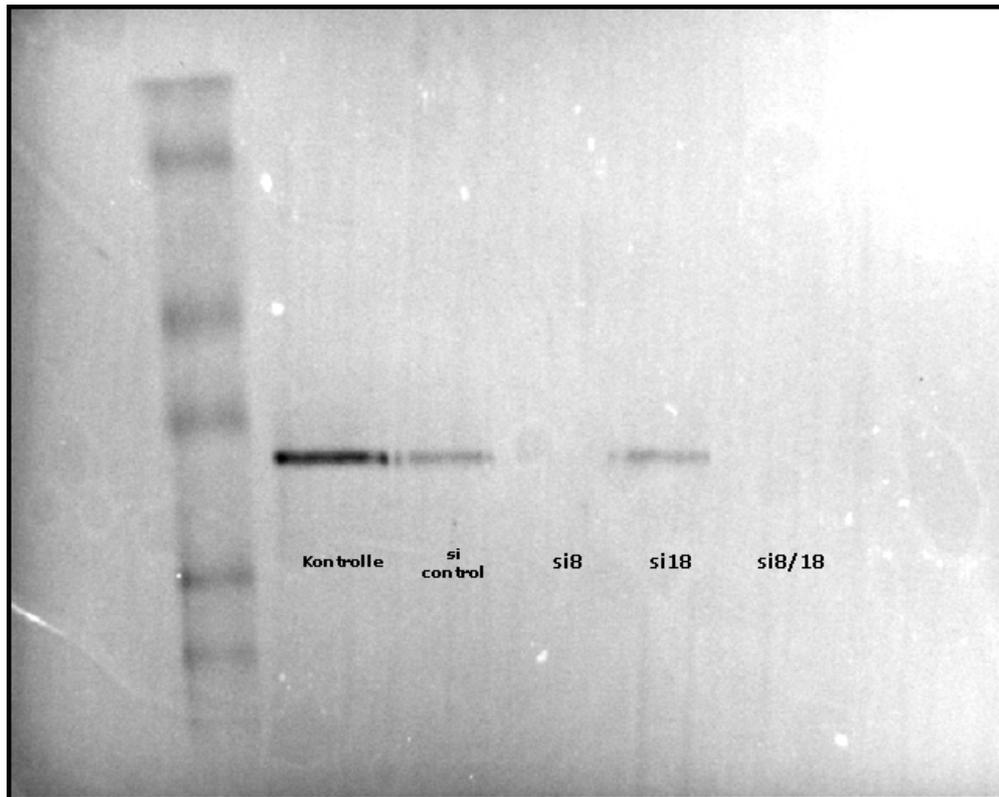


Abbildung 8: **Panzytokeratingehalt in HeLa-Zellen nach Transfektion mit siCK8, siCK18 und si control.** Die Messung des Panzytokeratingehaltes erfolgte bei den HeLa-Zellen 48h nach Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18, siCK8 und siCK18 kombiniert (si8/18) und si control mit HiPerFect. Die Extraktion des Zytokeratins wurde mittels 8Molar Harnstoff durchgeführt. Die Darstellung erfolgte im Westernblot nach erfolgter SDS-PAGE mit Markierung durch einen monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper und Immundetektion durch einen Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Sekundärantikörper. Als Marker diente der BenchMark Pre-Stained Protein Ladder von Invitrogen (6-180 kDa). (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA, SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

### 3.3 Die Zytokeratine 8 und 18 in ihrer Bedeutung für die Morphologie der Panc-1- und HeLa-Zellen

Um den Einfluss der Zytokeratine auf die Aufrechterhaltung der Zellstruktur zu untersuchen, wurden K8 und K18 mittels siRNA depletiert und die Morphologie der Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Sowohl in Panc-1-, als auch in HeLa-Zellen zeigten sich unter Zytokeratin-Depletion deutliche Veränderungen im Zytoskelett der Zellen. Während die mit si control transfizierten Zellen ein klar strukturiertes Zytokeratinskelett zeigten, kam es in den Zellen mit Zytokeratin-Depletion zu einer Verminderung des Zytokeratinskeletts. Die Zellen stellten sich rundlicher dar. Diese Morphologie zeigte sich gleichermaßen in Panc-1-Zellen (Abb.9, Abb.10) und in HeLa-Zellen (Abb.11, Abb.12).

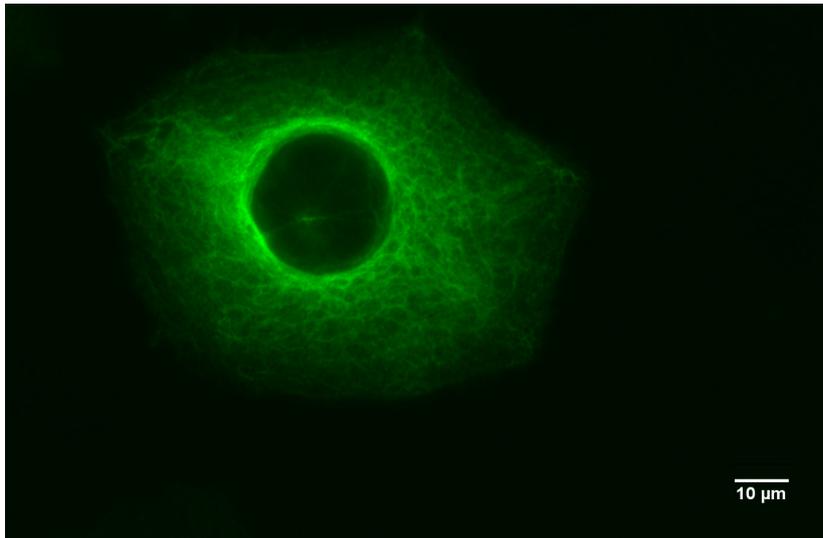


Abbildung 9: **Morphologie der Panc-1-Zellen nach Transfektion mit si control.** Die Transfektion des siRNA Oligonukleotids si control erfolgte mit HiPerFect. 72h nach der Transfektion wurden die Panc-1-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, si control = non-silencing-siRNA)

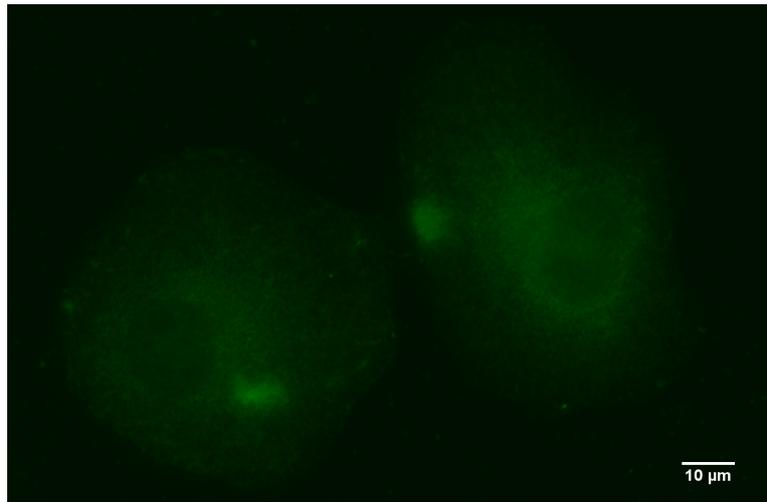


Abbildung 10: **Morphologie der Panc-1-Zellen nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18.** Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18 erfolgte durch das Transfektionsreagenz HiPerFect. 72h nach der Transfektion wurden die Panc-1-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin)

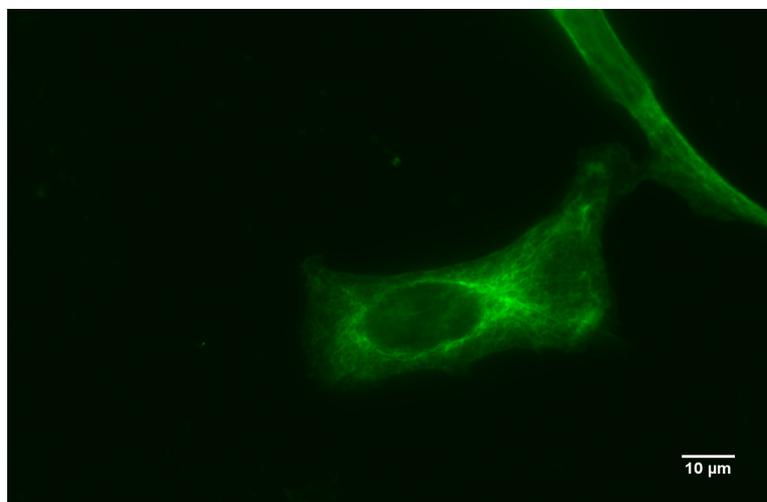
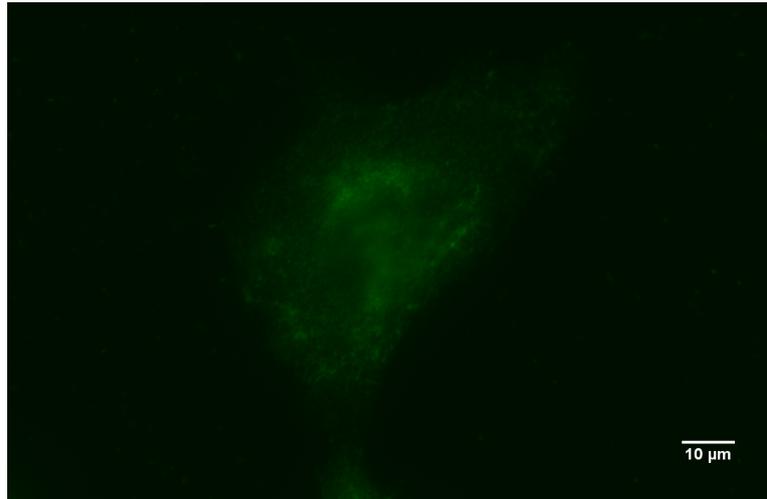


Abbildung 11: **Morphologie der HeLa-Zellen nach Transfektion mit si control.** Die Transfektion des siRNA Oligonukleotids si control erfolgte mit HiPerFect. 48h nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, si control = non-silencing-siRNA)



**Abbildung 12: Morphologie der HeLa-Zellen nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18.** Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18 erfolgte mit HiPerFect. 48h nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin)

Bei den Panc-1-Zellen sah man im zeitlichen Verlauf 24h nach Transfektion nahezu keine morphologischen Veränderungen, nach 48h kam es vermehrt zu einer perinukleären Ringbildung des Zytokeratins und einem Verlust der filamentösen Struktur des Zytokeratinskeletts; nach 72h war das Zytokeratin maximal depletiert, da nun die normale Zytokeratinstruktur vollständig verschwunden war. Insgesamt 96h nach Transfektion nahm die Zytokeratinimmunoreaktivität wieder zu, es traten vermehrt Zellen auf, die eine perinukleäre Ringbildung, bzw. wieder ein völlig normales Zytokeratinskelett zeigten (Abb.14). Dieses Phänomen lässt sich am ehesten mit einem Wirkverlust der transfizierten siRNA erklären.

Die Morphologie der Kontroll-Zellen (ohne Transfektion, Transfektion mit si control) hingegen veränderte sich im gesamten Zeitverlauf nicht (Abb.13).

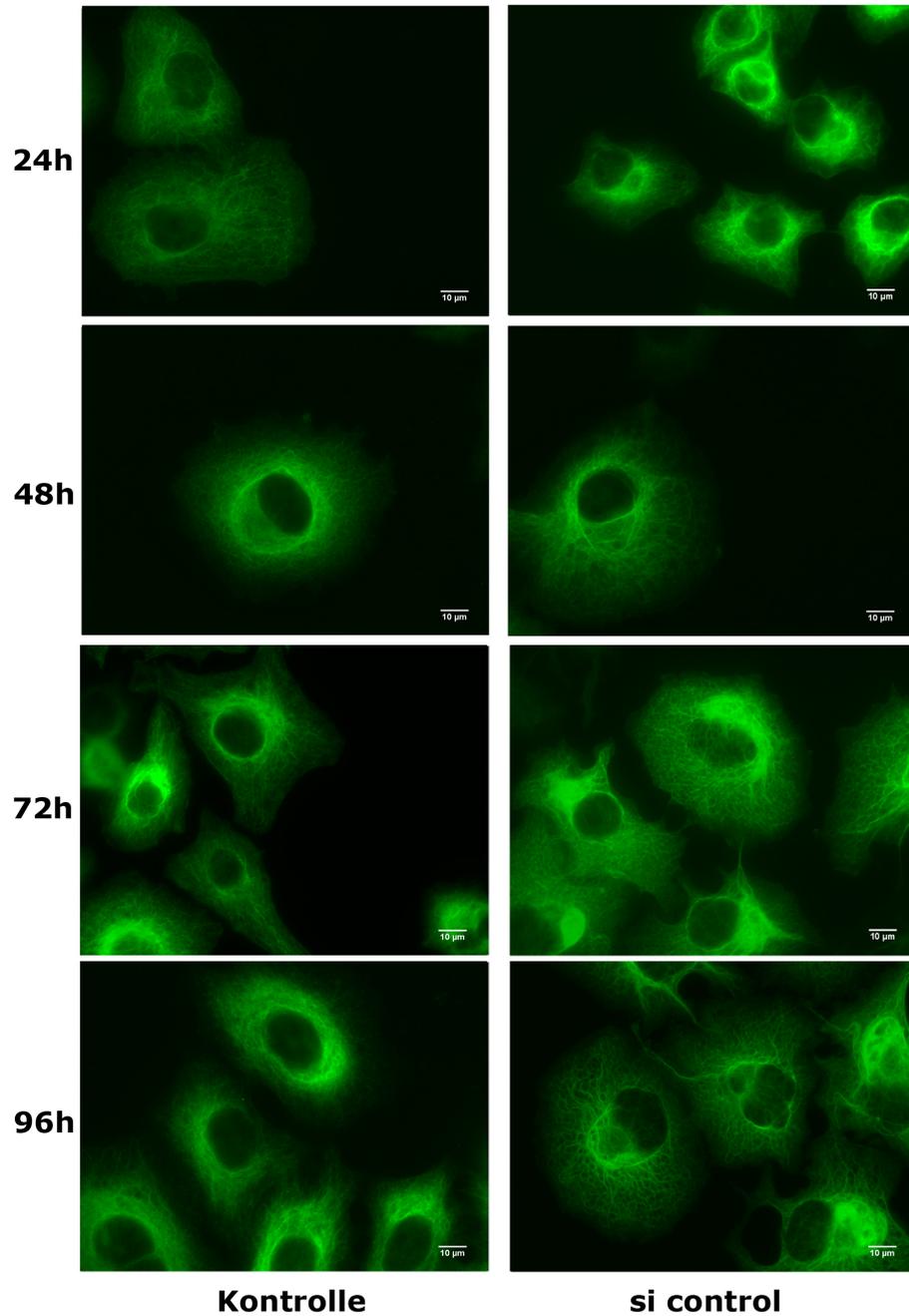


Abbildung 13: Die Morphologie der Panc-1-Zellen im zeitlichen Verlauf ohne Transfektion und nach Transfektion mit si control. Die Transfektion des siRNA Oligonukleotids si control erfolgte mit HiPerFect. 24h, 48h, 72h und 96h nach der Transfektion wurden die Panc-1-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, si control = non-silencing-siRNA)

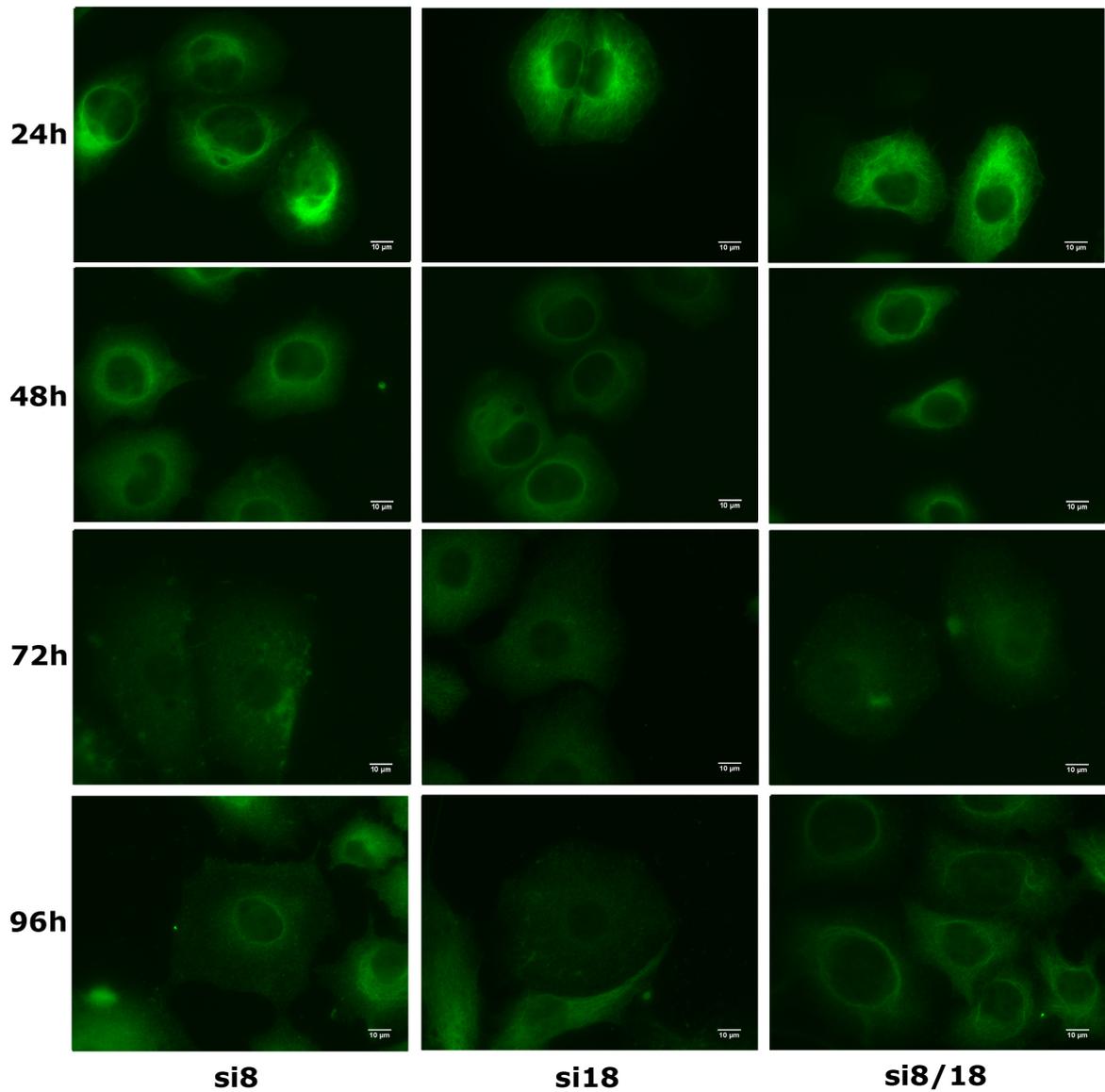


Abbildung 14: **Zeitlicher Verlauf der Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18 in Panc-1-Zellen.** Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18 erfolgte mit HiPerFect. 24h, 48h, 72h und 96h nach der Transfektion wurden die Panc-1-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin)

Die HeLa-Zellen zeigten ein ähnliches Verhalten im zeitlichen Verlauf. 24h nach Transfektion waren noch keine morphologischen Veränderungen zu sehen, bereits nach 48h zeigte sich hier aber schon ein deutlicher Strukturverlust des Zytokeratinskeletts, ansatzweise ließ sich hier ebenfalls eine Ringbildung nachweisen, allerdings deutlich geringer ausgeprägt als in Panc-1-Zellen. Nach 72h waren die meisten HeLa-Zellen mit Zytokeratin-Depletion nicht mehr adhärent (siehe Kapitel 3.4), die wenigen nachweisbaren Zellen zeigten einen völligen Verlust der Zytokeratinstruktur (Abb.16). Aufgrund dieses Zelldetachments und der Tatsache, dass das Maximum des Zytokeratin-Knockdowns bereits nach 24-48h erreicht ist (s. Kapitel 3.1), wurde bei den HeLa-Zellen auf den 96h-Ansatz verzichtet.

Die Kontroll-Zellen (ohne Transfektion, Transfektion mit si control) zeigten auch hier über den gesamten zeitlichen Verlauf keine wesentliche morphologische Veränderung, es war zu allen Zeitpunkten ein klar strukturiertes Zytokeratinskelett nachweisbar. Dieses war in HeLa-Zellen insgesamt etwas geringer ausgeprägt als in Panc-1-Zellen, was sich auf den geringeren Zytokeratingehalt in HeLa-Zellen im Vergleich zu Panc-1-Zellen zurückführen ließ (Abb.15).

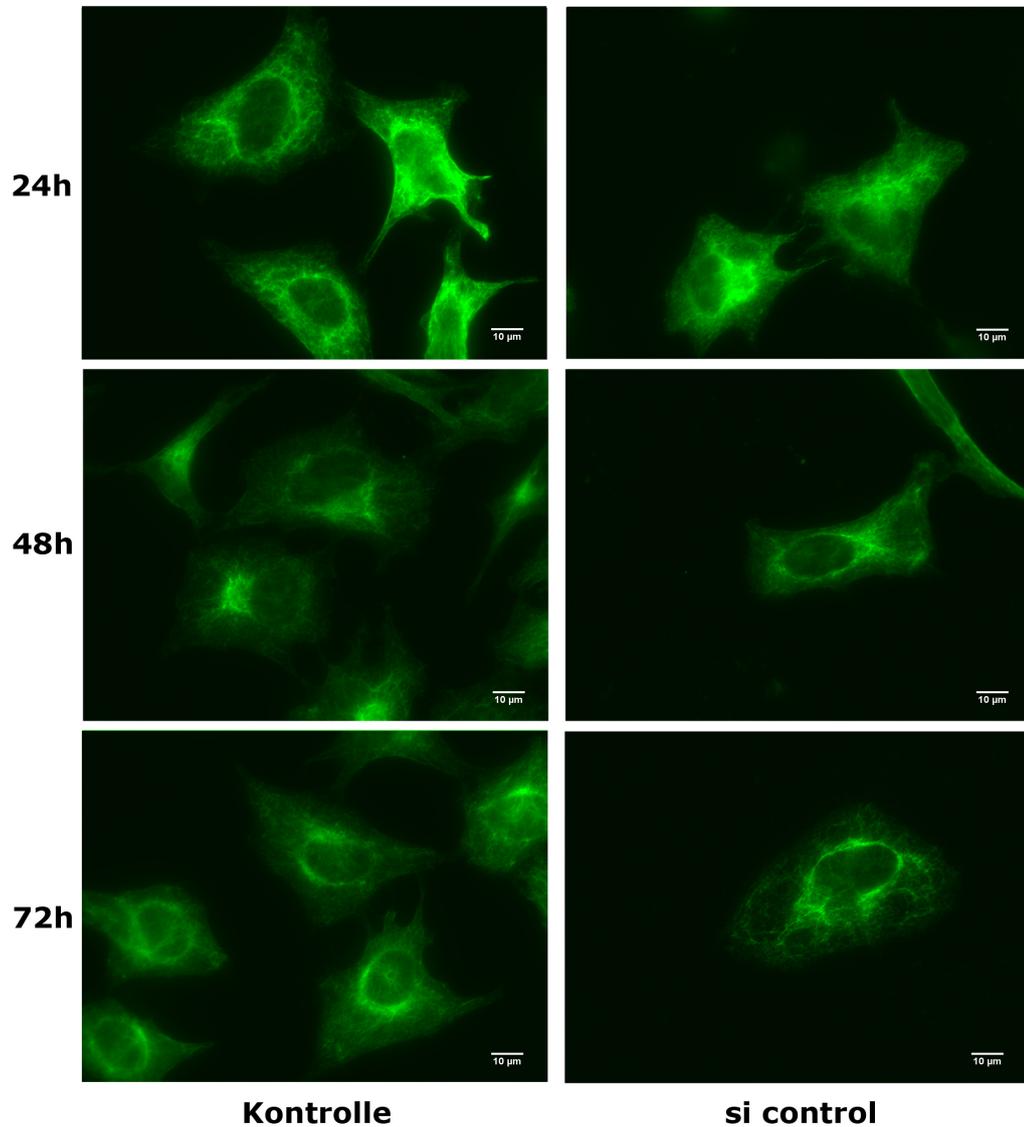


Abbildung 15: Die Morphologie der HeLa-Zellen im zeitlichen Verlauf ohne Transfektion und nach Transfektion mit si control. Die Transfektion des siRNA Oligonukleotids si control erfolgte mit HiPerFect. 24h, 48h und 72h nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, si control = non-silencing-siRNA)

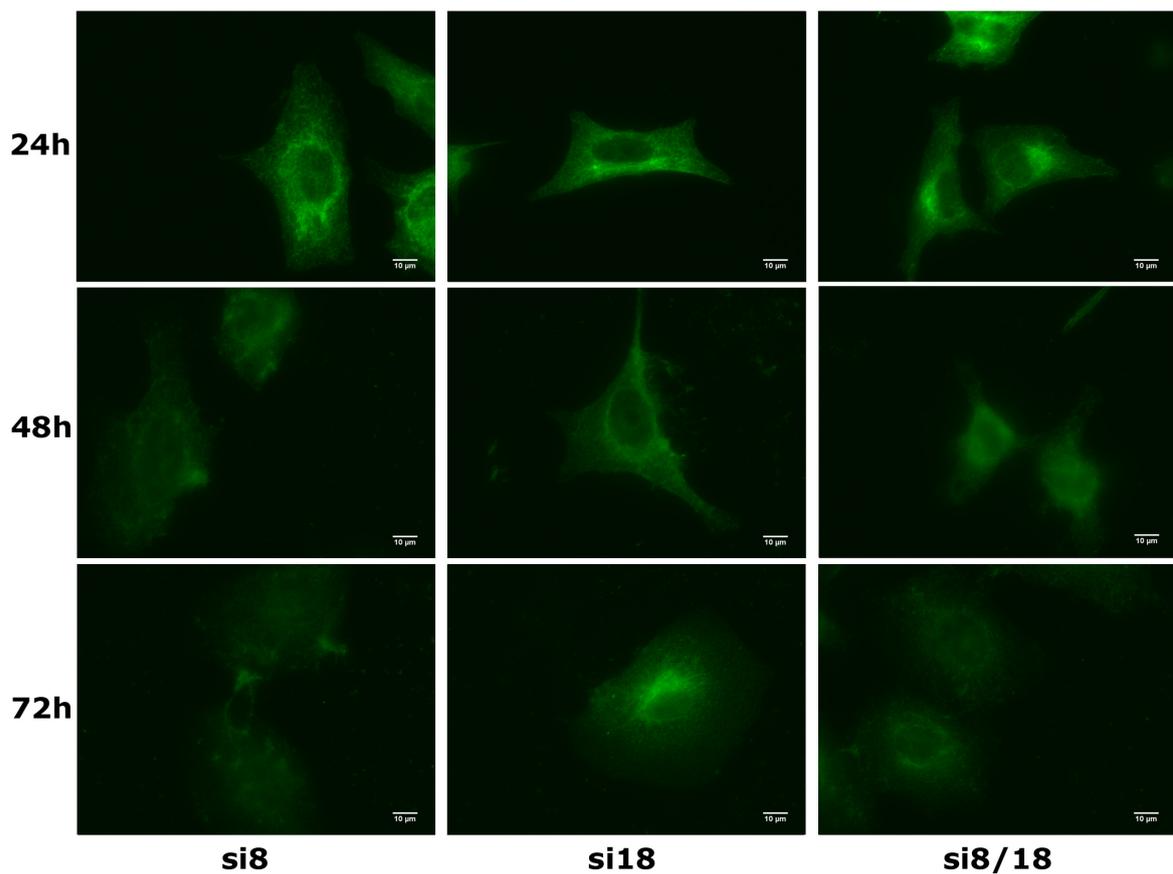


Abbildung 16: **Zeitlicher Verlauf der Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18 in HeLa-Zellen.** Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18 erfolgte mit HiPerFect. 24h, 48h und 72h nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). Die Abbildungen 9 - 16 zeigen identische Aufnahmebedingungen. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin)

## 3.4 Die Rolle der Zytokeratine 8 und 18 für das Adhäsionsverhalten von Panc-1- und HeLa-Zellen

### 3.4.1 Adhäsionsverhalten unter Depletion der Zytokeratine

Da die Depletion der Zytokeratinfilamentbildung zu einem vermehrten Zelldetachment bei HeLa-Zellen führte, wurde im Folgenden der Einfluss der Zytokeratin-Depletion auf die Adhäsionsfähigkeit untersucht.

In Vorversuchen wurden die geeignetsten Adhäsionsmedien für die verschiedenen Zellreihen bestimmt. Hierbei wurden Panc-1- und HeLa-Zellen auf Collagen-1, Fibronektin und Poly-L-Lysin ausgesät und die adhärenen Zellen im zeitlichen Verlauf bestimmt (17, 18).

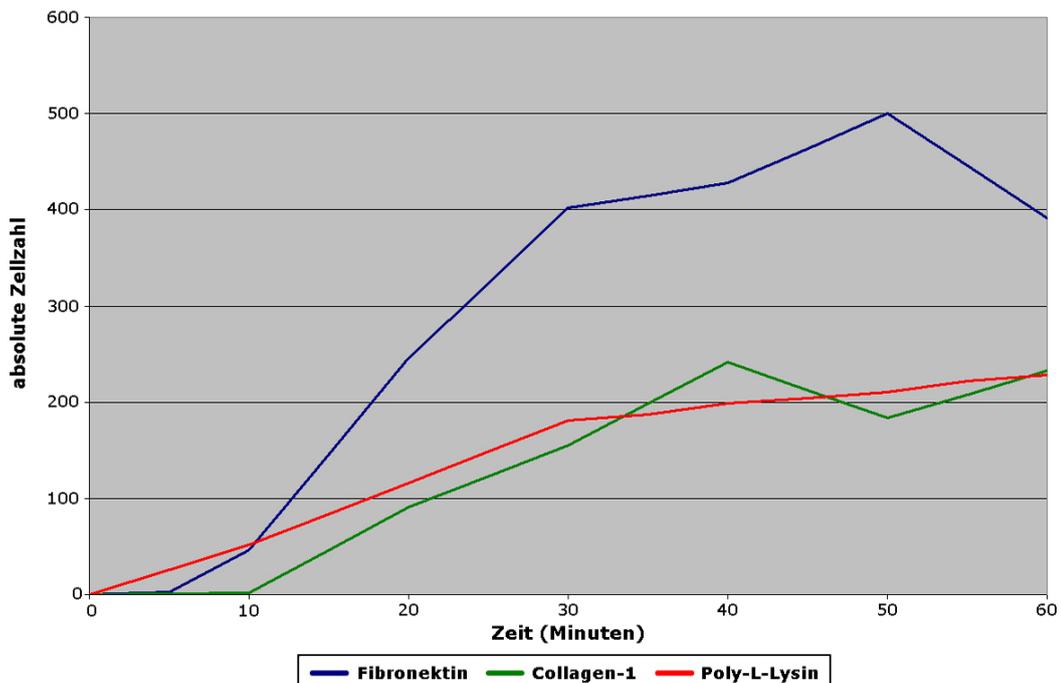


Abbildung 17: **Adhäsion von HeLa-Zellen auf verschiedenen Adhäsionsmedien im zeitlichen Verlauf.** Jeweils eine definierte Anzahl HeLa-Zellen ( $3 \times 10^4$  Zellen pro 24-Well) wurde zeitgleich auf die Adhäsionsmedien Fibronektin, Collagen 1 und Poly-L-Lysin ausgesät. Im Abstand von 5 Minuten erfolgte eine Fixierung der Zellen mittels Formalin. Insgesamt wurde eine Zeitspanne von 60 Minuten untersucht. Die absolute Zellzahl ist definiert als die Zellzahl pro 15 Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung und einer Aussaat von  $3 \times 10^4$  Zellen pro 24-Well, die nach der jeweiligen Zeit adhären waren. Da sich hier im Vergleich zu den anderen Adhäsionsmedien eine deutlich bessere Adhäsion der HeLa-Zellen auf Fibronektin zeigt, wurde in den nachfolgenden Experimenten Fibronektin als Adhäsionsmedium für die HeLa-Zellen verwendet.

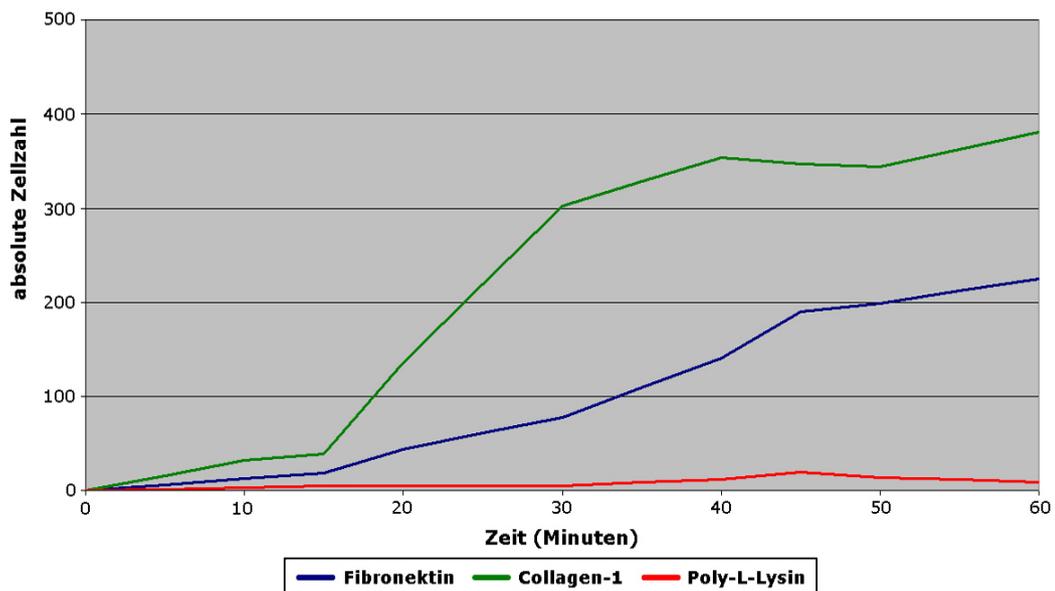


Abbildung 18: **Adhäsion von Panc-1-Zellen auf verschiedenen Adhäsionsmedien im zeitlichen Verlauf.** Jeweils eine definierte Anzahl Panc-1-Zellen ( $3 \times 10^4$  Zellen pro 24-Well) wurde zeitgleich auf die Adhäsionsmedien Fibronectin, Collagen 1 und Poly-L-Lysin ausgesät. Im Abstand von 5 Minuten erfolgte eine Fixierung der Zellen mittels Formalin. Insgesamt wurde eine Zeitspanne von 60 Minuten untersucht. Die absolute Zellzahl ist definiert als die Zellzahl pro 15 Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung und einer Aussaat von  $3 \times 10^4$  Zellen pro 24-Well, die nach der jeweiligen Zeit adhären waren. Da sich hier im Vergleich zu den anderen Adhäsionsmedien eine deutlich bessere Adhäsion der Panc-1-Zellen auf Collagen 1 zeigt, wurde in den nachfolgenden Experimenten Collagen 1 als Adhäsionsmedium für die Panc-1-Zellen verwendet.

In den Adhäsionsversuchen wurde eine definierte Menge HeLa-Zellen auf einem Fibronectin-überzogenen Objektträger ausgesät und nach genau 15 min, bzw. 60 min durch Formalin fixiert. Mittels Auszählung der adhärenen Zellen zu diesen Zeitpunkten wurde die Adhäsionsfähigkeit der siRNA-transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen (untransfiziert und Transfektion mit si control) beurteilt. Bei den Panc-1-Zellen wurde anstelle des Fibronectins Collagen 1 als Adhäsionsmedium verwendet.

Die Veränderungen des Zytokeratinskeletts in HeLa-Zellen korrelierten mit einer Veränderung des Adhäsionsverhaltens dieser Zellen. Es zeigte sich zu beiden Zeitpunkten (15 min und 60 min) eine deutliche Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der Zellen nach Zytokeratin-Depletion. Die nicht transfizierten Zellen und die Zellen, die mit si control transfiziert wurden, waren annähernd in gleicher Zahl adhären, ein Unterschied war nicht darstellbar. Die Zellen mit Zytokeratin-Depletion hingegen zeigten einen Rückgang der Adhäsionsfähigkeit um über 90% (Abb.19).

Zwischen der Adhäsion nach 15 min und nach 60 min war kein Unterschied zu erkennen (Abb.20). Bereits nach 15 min sah man eine deutlich schlechtere Adhäsion der HeLa-Zellen mit Zytokeratin-Depletion (nach Transfektion mit siCK8, siCK18 und siCK8/siCK18 kombiniert); während nun die Gesamtsumme der adhärenen Zellen in allen Ansätzen anstieg, blieb die prozentuale Differenz erhalten; sowohl nach 15 min, als auch nach 60 min erreichten die Zellen ohne Zytokeratin maximal 15-20% der Adhäsionsfähigkeit der Kontroll-Zellen.

Es zeigte sich kein Unterschied im Adhäsionsverhalten, wenn Zytokeratin 8, Zytokeratin 18 oder beide Zytokeratine gleichzeitig depletiert wurden.

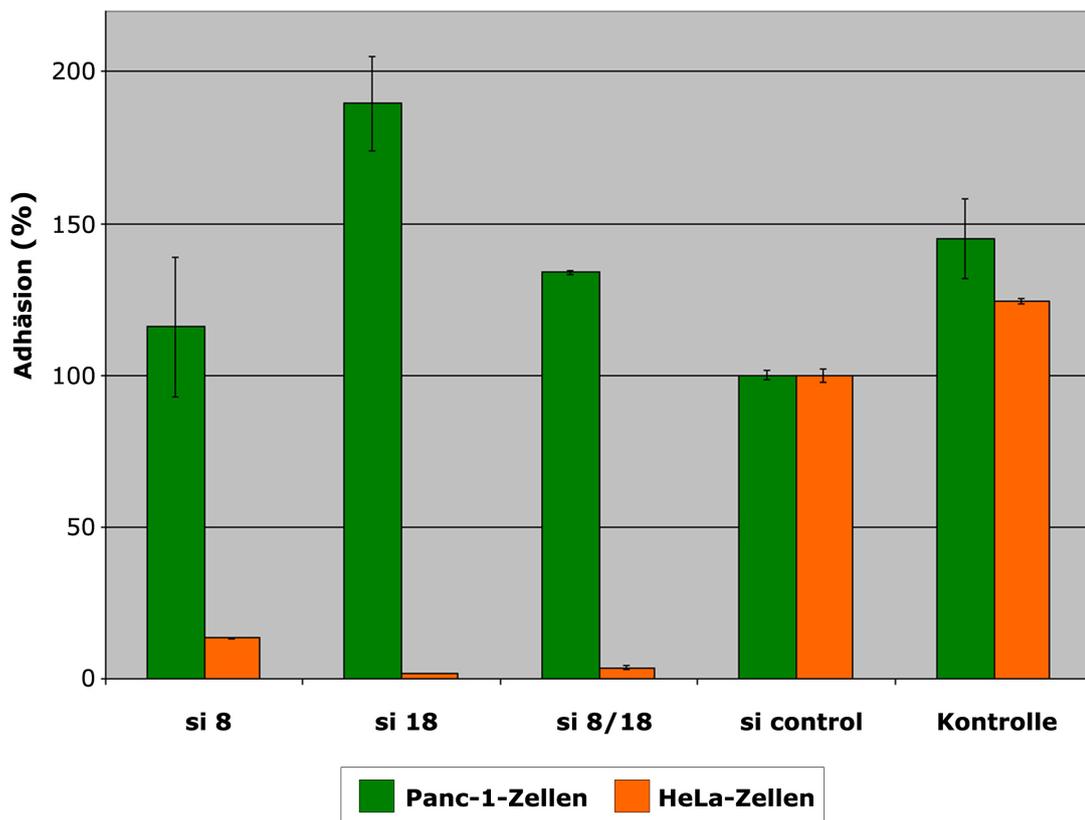


Abbildung 19: Das Adhäsionsverhalten (15 min) von Panc-1- und HeLa-Zellen nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18 und si control erfolgte mit HiPerFect. 72h (Panc-1-Zellen), bzw. 48h (HeLa-Zellen) nach der Transfektion erfolgte die Reorganisation des fokalen Adhäsionskomplexes mittels Inkubation in flüssigem Medium für 1h. Anschließend folgte die Aussaat der Panc-1-Zellen auf Collagen-1, der HeLa-Zellen auf Fibronectin. 15 Minuten nach dem Aussäen wurden die Zellen durch Formalin fixiert. Dargestellt sind hier relative Zahlen im Vergleich zu den Zellen, die mit si control transfiziert wurden. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA)

Die Panc-1-Zellen hingegen zeigten unter Zytokeratin-Depletion keine Veränderung in ihrem Adhäsionsverhalten. Weder nach 15 min, noch nach 60 min zeigten die Zellen mit Zytokeratin-Depletion einen Unterschied in ihrer Adhäsionsfähigkeit im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Abb.19, Abb.20).

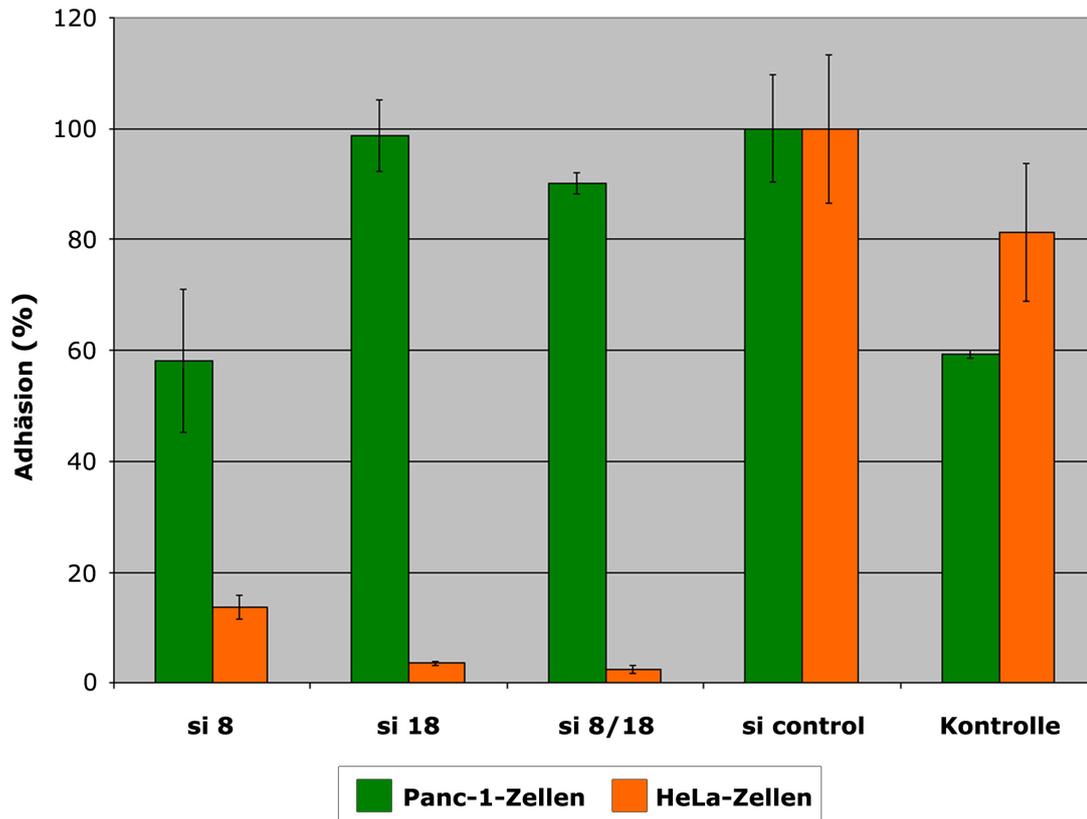


Abbildung 20: Das Adhäsionsverhalten (60 min) von Panc-1- und HeLa-Zellen nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18 und si control erfolgte mit HiPerFect. 72h (Panc-1-Zellen), bzw. 48h (HeLa-Zellen) nach der Transfektion erfolgte die Reorganisation des fokalen Adhäsionskomplexes mittels Inkubation in flüssigem Medium für 1h. Anschließend folgte die Aussaat der Panc-1-Zellen auf Collagen-1, der HeLa-Zellen auf Fibronectin. 60 Minuten nach dem Aussäen wurden die Zellen durch Formalin fixiert. Dargestellt sind hier relative Zahlen im Vergleich zu den Zellen, die mit si control transfiziert wurden. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA)

### 3.4.2 Adhäsionsverhalten nach posttranslationaler Modifikation

Die bisherigen Versuche wurden jeweils unter Depletion des Zytokeratins durchgeführt. Da eine Phosphorylierung von Keratinen an bestimmten Serinen einem Keratin-Knockdown funktionell gleichkommen kann [Busch, Jansen, Seufferlein, unveröffentlichte Daten], wurde in diesem Versuchsteil die Adhäsionsfähigkeit unter posttranslationaler Modifikation mittels Phosphorylierung des Zytokeratins untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Panc-1- und HeLa-Zellen mit cDNA des Wildtyps des Zytokeratins 8 und 18, die mit Expressionsplasmiden für fluoreszierende Proteine getagget wurden, sowie den Keratin-Konstrukten K8-S431-A / K18-S52-A und K8-S431-E / K18-S52-E transfiziert. Die Adhäsionsversuche wurden 60 min nach dem Aussäen der Zellen ausgewertet. Die prozentualen Angaben der Adhäsion beziehen sich auf die Adhäsionsfähigkeit des Keratin-Wildtyps.

Bei den Panc-1-Zellen zeigte sich entsprechend der Ergebnisse unter Zytokeratin-Depletion auch durch die posttranslationale Modifikation kein eindeutiger Unterschied im Adhäsionsverhalten der Zellen. Sowohl die Zellen mit den Keratin-Konstrukten K8-S431-A / K18-S52-A, bei denen keine Phosphorylierung mehr möglich ist, als auch die Zellen mit den Keratin-Konstrukten K8-S431-E / K18-S52-E, den phosphomimetischen Mutanten, bewiesen das gleiche Adhäsionsverhalten wie die Zellen mit dem exogen zugeführten Keratin-Wildtyp (Abb.21). Die Adhäsion der Panc-1-Zellen ist also unabhängig von der Zytoskelettorganisation.

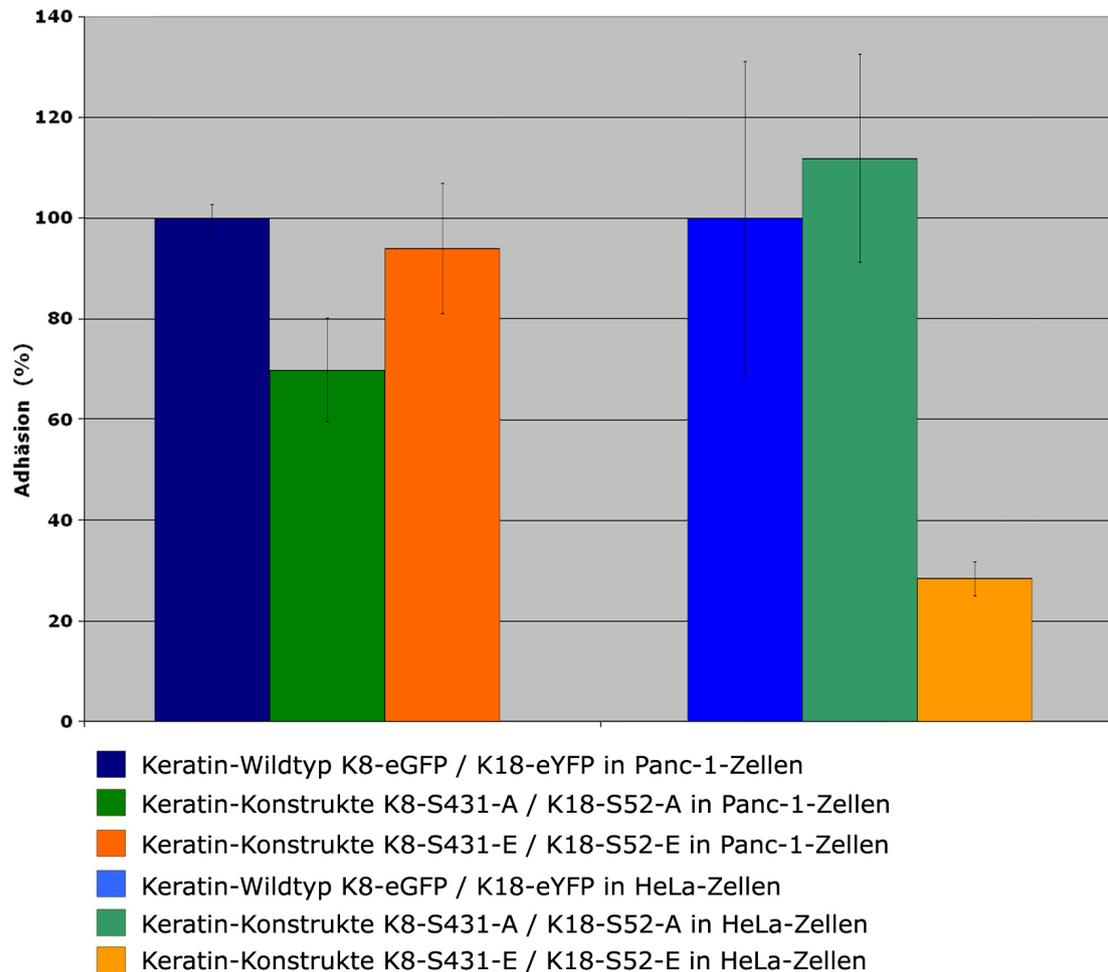


Abbildung 21: **Adhäsionsverhalten von Panc-1- und HeLa-Zellen nach posttranslationaler Modifikation des Zytokeratins.** Die Transfektion der K8-eGFP und K18-eYFP markierten cDNA-Plasmide, der K8-S431-E-/K18-S52-E-Konstrukte und der K8-S431-A-/K18-S52-A-Konstrukte in die Panc-1-Zellen erfolgte mit Metafectene, in die HeLa-Zellen durch Fugene HD. 24h nach der Transfektion wurde die Reorganisation des fokalen Adhäsionskomplexes mittels einstündiger Inkubation in flüssigem Medium durchgeführt. Anschließend folgte die Aussaat der Panc-1-Zellen auf Collagen-1, der HeLa-Zellen auf Fibronectin. 60 Minuten nach dem Aussäen wurden die Zellen durch Formalin fixiert. Dargestellt sind hier relative Zahlen im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Keratin-Wildtyp transfiziert wurden. (GFP = green fluorescent protein, YFP = yellow fluorescent protein, K = Keratin, RNA = Ribonukleinsäure, DNA = Desoxyribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA, cDNA = mRNA komplementäre DNA, S = Serin)

Die HeLa-Zellen zeigten bei Transfektion mit dem Keratin-Wildtyp und dem Keratin-Konstrukt K8-S431-A / K18-S52-A ein ähnliches Adhäsionsverhalten. Also konnte man auch hier feststellen, dass das Fehlen der Phosphorylierungsfähigkeit der Keratin-Konstrukte K8-S431-A / K18-S52-A keine Auswirkung auf die Adhäsion der HeLa-Zellen hat.

Bei den Keratin-Konstrukten K8-S431-E / K18-S52-E hingegen sah man einen deutlichen Verlust der Adhäsionsfähigkeit; es waren 60 min nach dem Aussäen wesentlich weniger Zellen adhärenent als beim Keratin-Wildtyp (Abb.21). Die Phosphorylierung und damit Reorganisation und perinukleäre Anordnung des Zytokeratins (Abb.22), welche durch die Keratin-Konstrukte K8-S431-E / K18-S52-E verursacht wird, führt somit zu einer Verminderung der Adhäsionsfähigkeit der HeLa-Zellen. Die Adhäsion der HeLa-Zellen wird also von der Organisation des Keratin-Zytoskeletts beeinflusst. Somit unterscheiden sich die einzelnen Tumorzellen offensichtlich bei der Adhäsion hinsichtlich ihrer Anforderungen an das Zytoskelett.

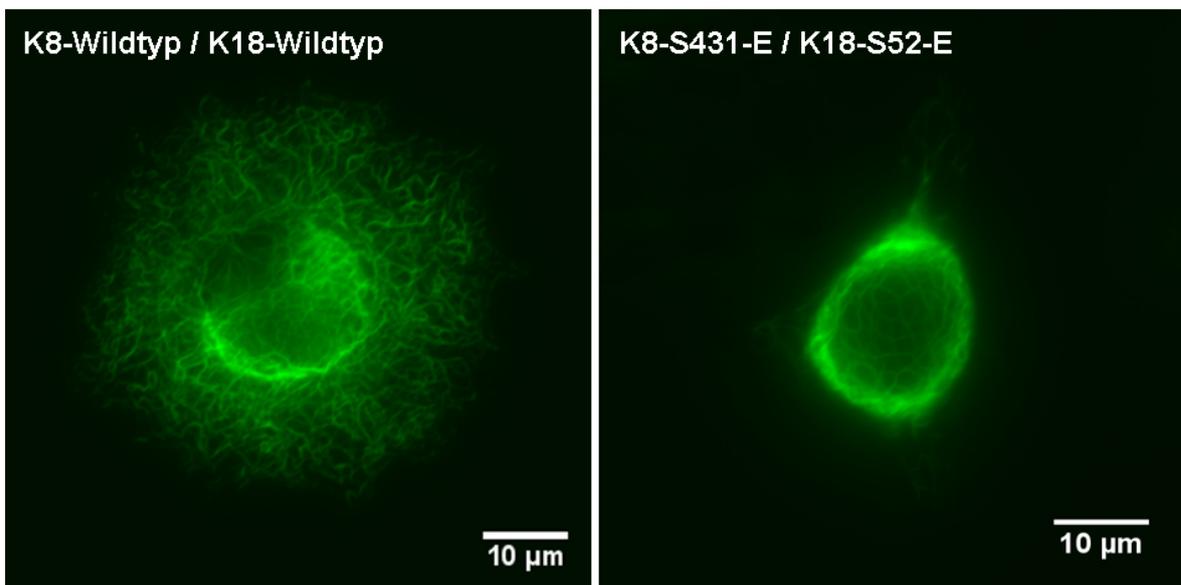


Abbildung 22: **Morphologie des Keratin 8/18-Wildtypes und des K8-S431-E-/K18-S52-E-Konstruktes in HeLa-Zellen.** Die Transfektion der K8-eGFP und K18-eYFP markierten cDNA-Plasmide und der K8-S431-E-/K18-S52-E-Konstrukte in die HeLa-Zellen erfolgte durch Fugene HD. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Formalin fixiert. (GFP = green fluorescent protein, YFP = yellow fluorescent protein, K = Keratin, RNA = Ribonukleinsäure, DNA = Desoxyribonukleinsäure, mRNA = messenger RNA, cDNA = mRNA komplementäre DNA, S = Serin)

### 3.5 Die Auswirkungen der Zytokeratin-Depletion auf das Aktinskelett der Panc-1- und HeLa-Zellen

Nach den Resultaten der Adhäsionsversuche bestand die Annahme, dass eine Depletion des Zytokeratins ebenfalls Auswirkungen auf das Aktinskelett der Zellen hat, da dieses wesentlich an der Bildung der Fokalen Adhäsionen beteiligt ist. Daher wurde in diesem Versuchsteil die Wirkung der Zytokeratin-Depletion auf das Aktinskelett mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Panc-1-Zellen zeigten untransfiziert und nach Transfektion mit si control ein gering ausgeprägtes, unregelmäßiges Aktinmuster, welches größtenteils aus corticalem Aktin bestand. Nur vereinzelt ließ sich filamentöses Aktin nachweisen, diese befanden sich hauptsächlich in der Zellperipherie (Abb.23). Eine besondere Ausrichtung dieser Filamente war nicht erkennbar.

Nach Depletion des Zytokeratins durch Transfektion mit siCK8, siCK18 und der Kombination aus siCK8 und siCK18 kam es zu einer Veränderung des Aktinskeletts. Die Aktinfilamente sahen nun dichter aus, es kam zur Ausbildung von Stressfasern. Diese Fasern folgten einer eindeutigen Ausrichtung, die Anordnung erfolgte strahlenförmig in Richtung Zellperipherie (Abb.24). Meistens war der Bereich um den Zellkern weitgehend ausgespart, außerdem zeigte sich teilweise ein Saum aus Stressfasern im Bereich der Zellmembran (s. Abb.24, si18).

Zwischen den untransfizierten Zellen und den Zellen, die mit si control transfiziert wurden, ließ sich kein Unterschied im Aktinskelett nachweisen (Abb.23).

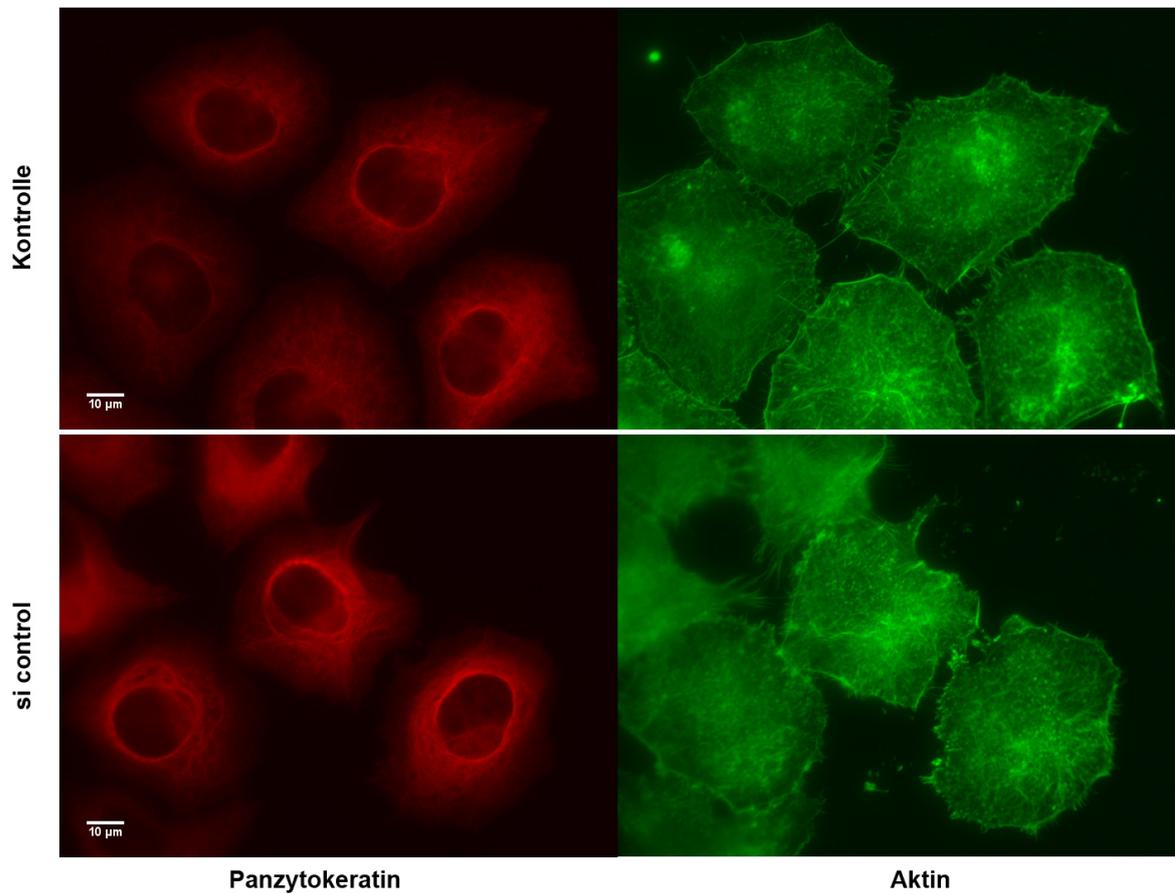


Abbildung 23: Vergleich des Zytokeratin- und Aktinskeletts in Panc-1-Zellen ohne Transfektion und nach Transfektion mit si control. Die Transfektion des siRNA Oligonukleotids si control erfolgte mit HiPerFect. 72h nach der Transfektion wurden die Panc-1-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm); parallel zum Sekundär-Antikörper wurde das Aktinskelett mittels fluoreszenzmarkiertem Alexa-Phalloidin markiert. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, si control = non-silencing-siRNA)

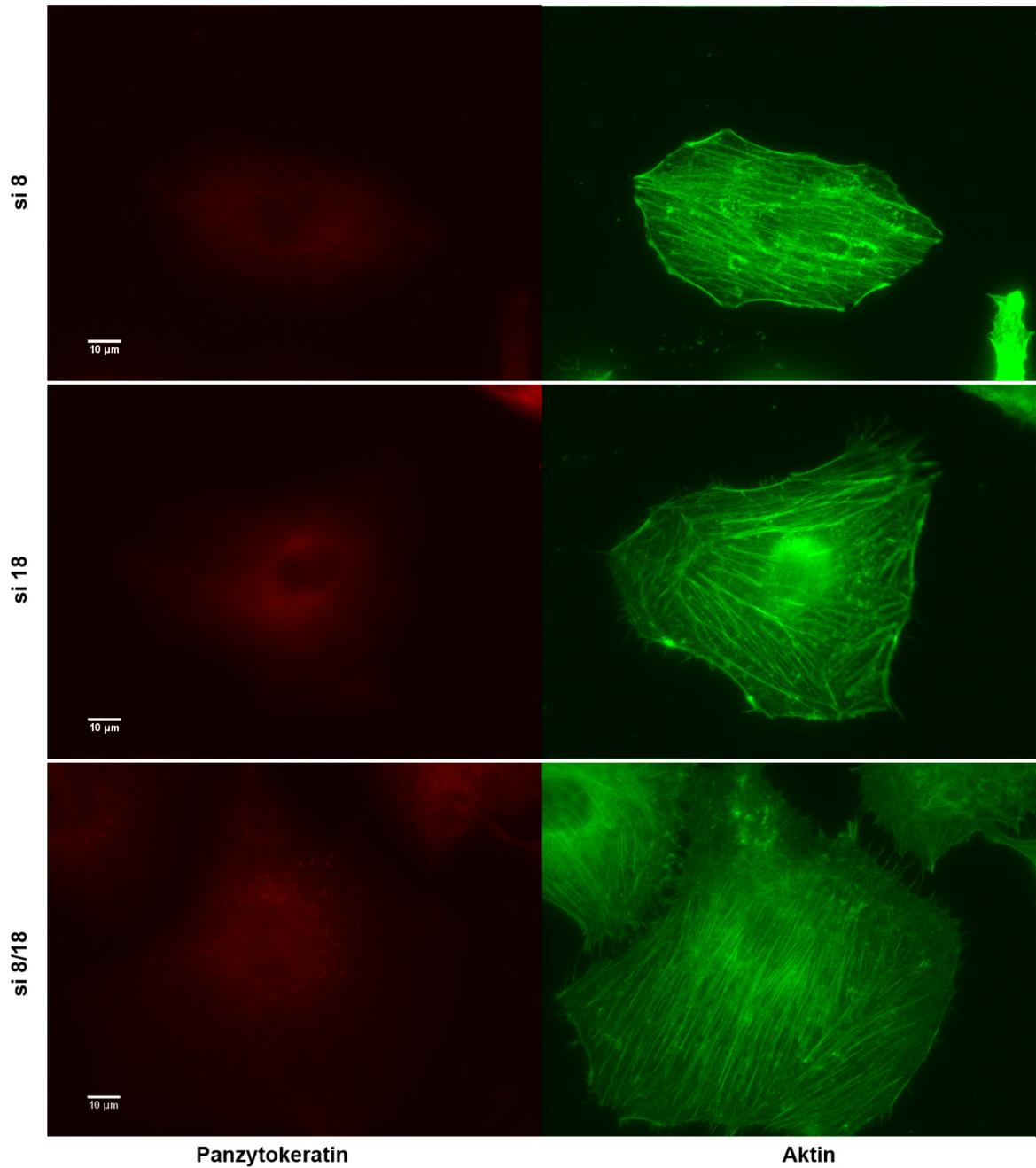


Abbildung 24: Vergleich des Zytokeratin- und Aktinskeletts in Panc-1-Zellen unter Zytokeratin-Depletion durch die siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18 erfolgte mit HiPerFect. 72h nach der Transfektion wurden die Panc-1-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm); parallel zum Sekundär-Antikörper wurde das Aktinskelett mittels fluoreszenzmarkiertem Alexa-Phalloidin markiert. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin)

In HeLa-Zellen waren ohne Transfektion, bzw. mit Transfektion von si control Aktinfilamente darstellbar, deren Struktur deutlicher erkennbar war als in Panc-1-Zellen. Es war filamentöses Aktin zu erkennen, die einzelnen Filamente waren klar abgrenzbar, zeigten allerdings keine Ausrichtung, wie sie bei der Stressfaserbildung zu erwarten wäre (Abb.25).

Die Zytokeratin-Depletion in HeLa-Zellen geht nicht mit einer Veränderung des Aktinskeletts einher (Abb.26). Die Filamentmenge wirkte im Ansatz mit Zytokeratin-Depletion im Vergleich zum si control und untransfizierten Ansatz unverändert. Die Ausrichtung der Filamente wirkte immer noch ungeordnet, häufig zeigte sich allerdings eine vermehrte Ansammlung der Filamente in der Zellperipherie (s. Abb.26, si8/18).

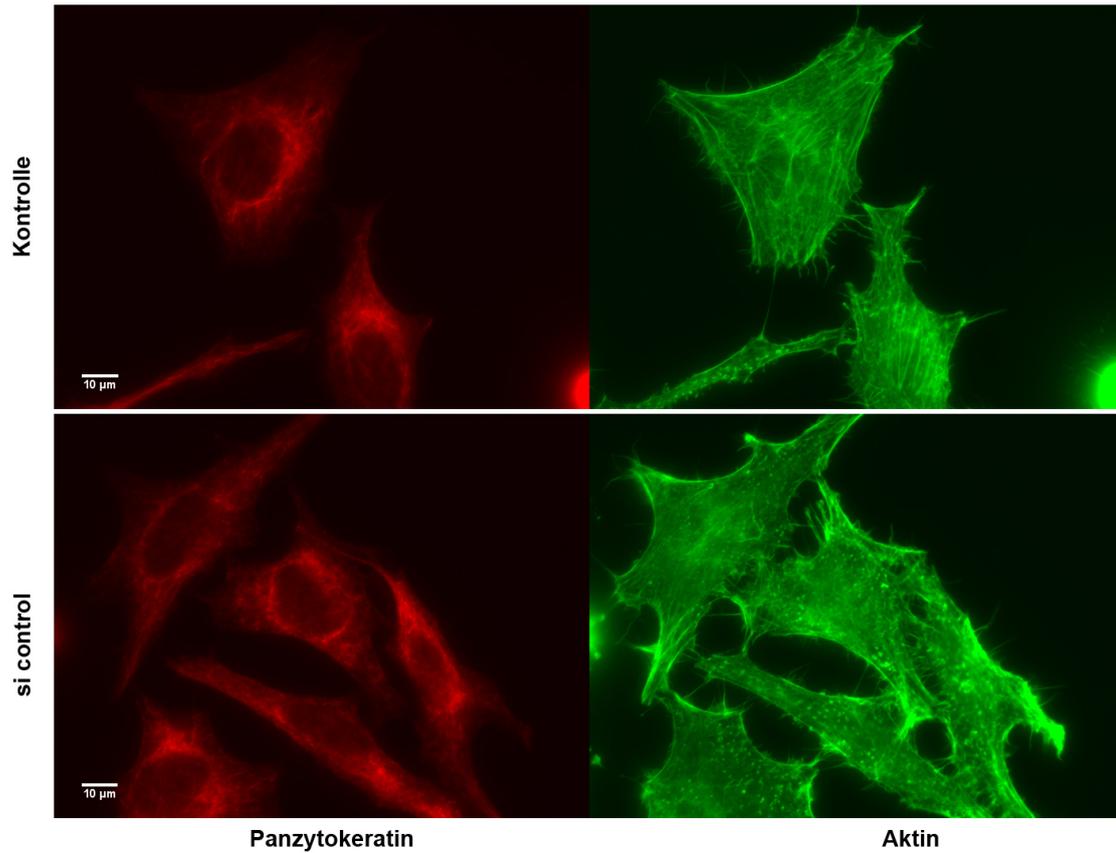


Abbildung 25: Vergleich des Zytokeratin- und Aktinskeletts in HeLa-Zellen ohne Transfektion und nach Transfektion mit si control. Die Transfektion des siRNA Oligonukleotids si control erfolgte mit HiPerFect. 48h nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm); parallel zum Sekundär-Antikörper wurde das Aktinskelett mittels fluoreszenzmarkiertem Alexa-Phalloidin markiert. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, si control = non-silencing-siRNA)

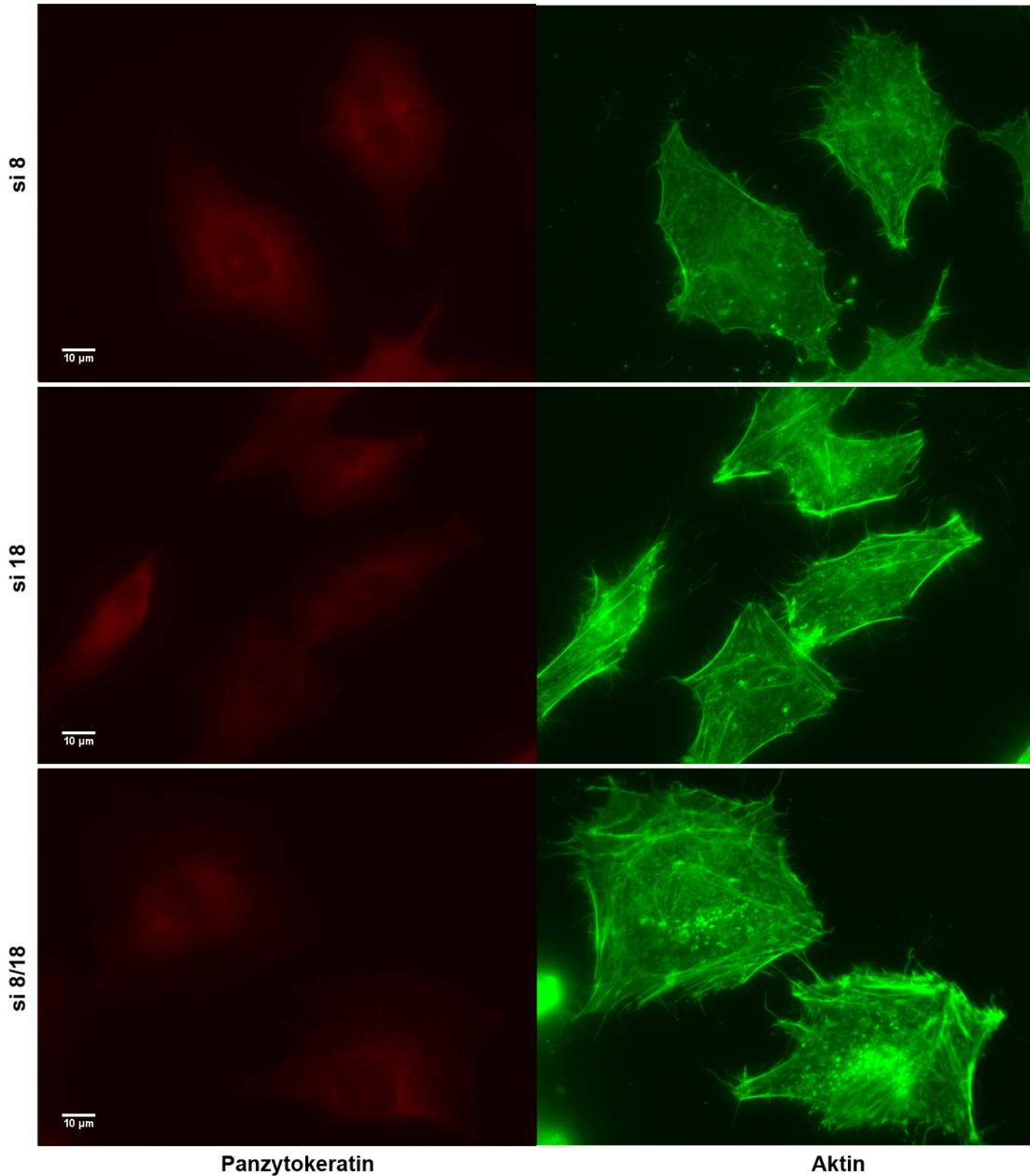


Abbildung 26: Vergleich des Zytokeratin- und Aktinskeletts in HeLa-Zellen unter Zytokeratin-Depletion durch die siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8 und siCK18 erfolgte durch das Transfektionsreagenz HiPerFect. 72h nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Panzytokeratin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm); parallel zum Sekundär-Antikörper wurde das Aktinskelett mittels fluoreszenzmarkiertem Alexa-Phalloidin-Antikörper markiert. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin)

### 3.6 Die Fokalen Adhäsionen in Panc-1- und HeLa-Zellen unter Zytokeratin 8 und 18-Depletion

Nachdem es in Panc-1-Zellen unter Zytokeratin-Depletion zu einer Vermehrung und Ausrichtung des Aktinskeletts kam und das Aktinskelett direkten Einfluss auf die Fokalen Adhäsionen hat, folgte nun die Darstellung der Fokalen Adhäsionen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Fokalen Adhäsionen wurden anhand des Proteins Paxillin als Marker der Fokalkomplexe beurteilt.

In Panc-1-Zellen ließ sich eine deutliche Veränderung der Fokalen Adhäsionen nachweisen (Abb.27). Paxillin zeigte sich in den untransfizierten Zellen und den si control transfizierten Zellen in vereinzelt, kleinen Komplexen, welche hauptsächlich in der Zellperipherie angeordnet waren. Unter Zytokeratin-Depletion mittels siCK8- und siCK18-Oligonukleotiden kam es zu einer Vermehrung der Fokalkomplexe. Das nachgewiesene Paxillin zeigte eine Vergrößerung der einzelnen Komplexe, außerdem erfolgte eine Ausrichtung der Fokalen Adhäsionen entlang der Stressfasern vom Zellkern aus Richtung Zellperipherie. Der Saum entlang der Zellmembran, welcher sich auch schon in den Kontrollansätzen nachweisen ließ, stellte sich auch hier eindeutig dar.

Bei den HeLa-Zellen zeigten sich in den Kontrollzellen unterschiedlich große Fokalkomplexe, die sich bündelartig vor allem in den Zellausläufern anordneten und entlang der gesamten Zellmembran nachzuweisen waren. Im Bereich des Zellkerns kam es ebenfalls zu einer Ansammlung von Paxillin (Abb.28).

Unter Zytokeratin-Depletion zeigte sich bei den HeLa-Zellen nun eine Reduktion der Fokalkomplexe. Im Bereich des Zellkerns ließ sich noch vereinzelt Paxillin nachweisen, auch die Komplexe entlang der Zellmembran wirkten kleiner als in den Kontrollansätzen. Da sich HeLa-Zellen unter Zytokeratin-Depletion rundlich darstellten, fehlte außerdem die bündelartige Anordnung in den Zellausläufern, selten war sie noch in Ansätzen zu erkennen (Abb.28, si8/18).

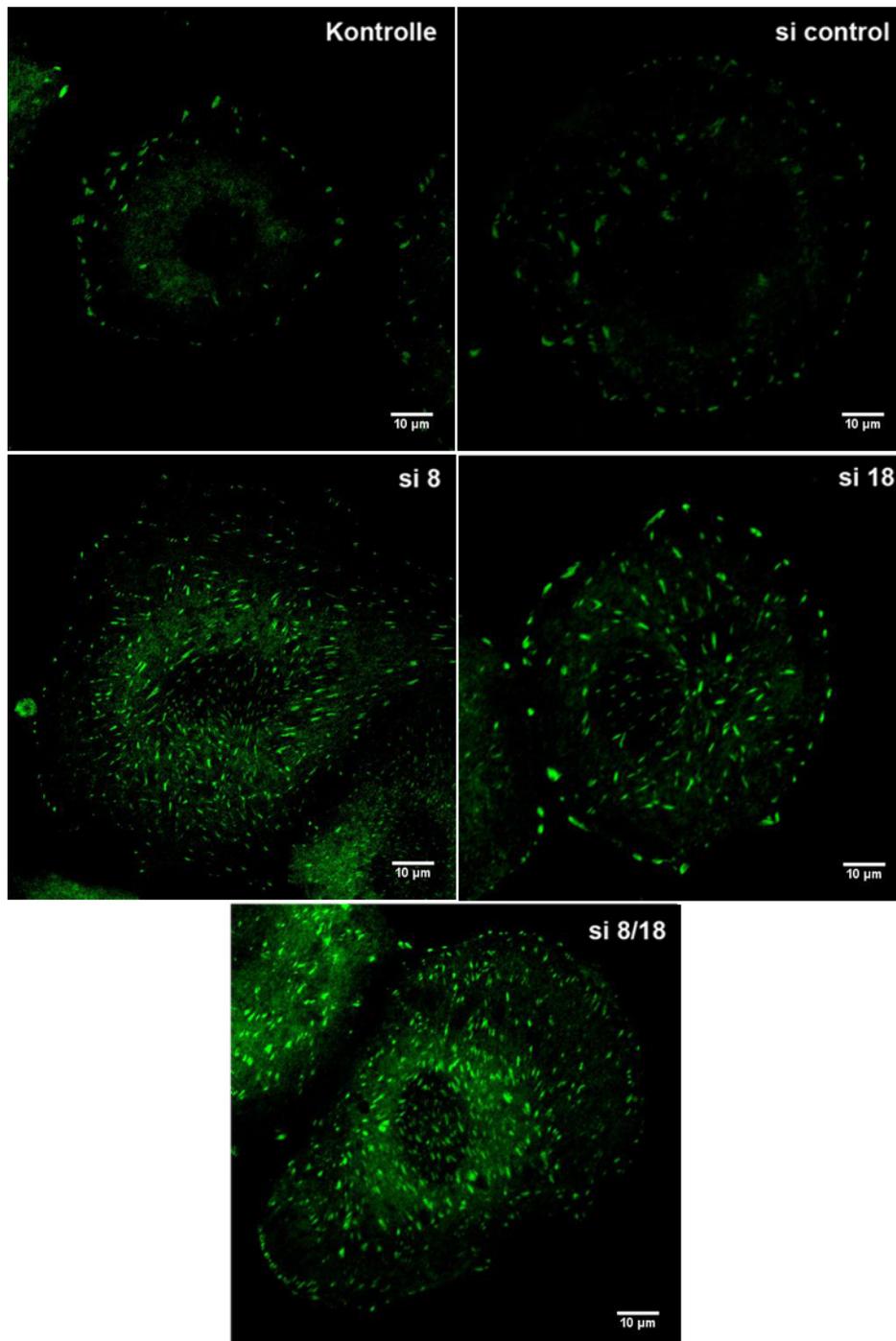


Abbildung 27: Paxillin als Marker für Fokalkomplexe in Panc-1-Zellen nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18 und si control erfolgte mit Hi-PerFect. 72h nach der Transfektion wurden die Panc-1-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Paxillin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA)

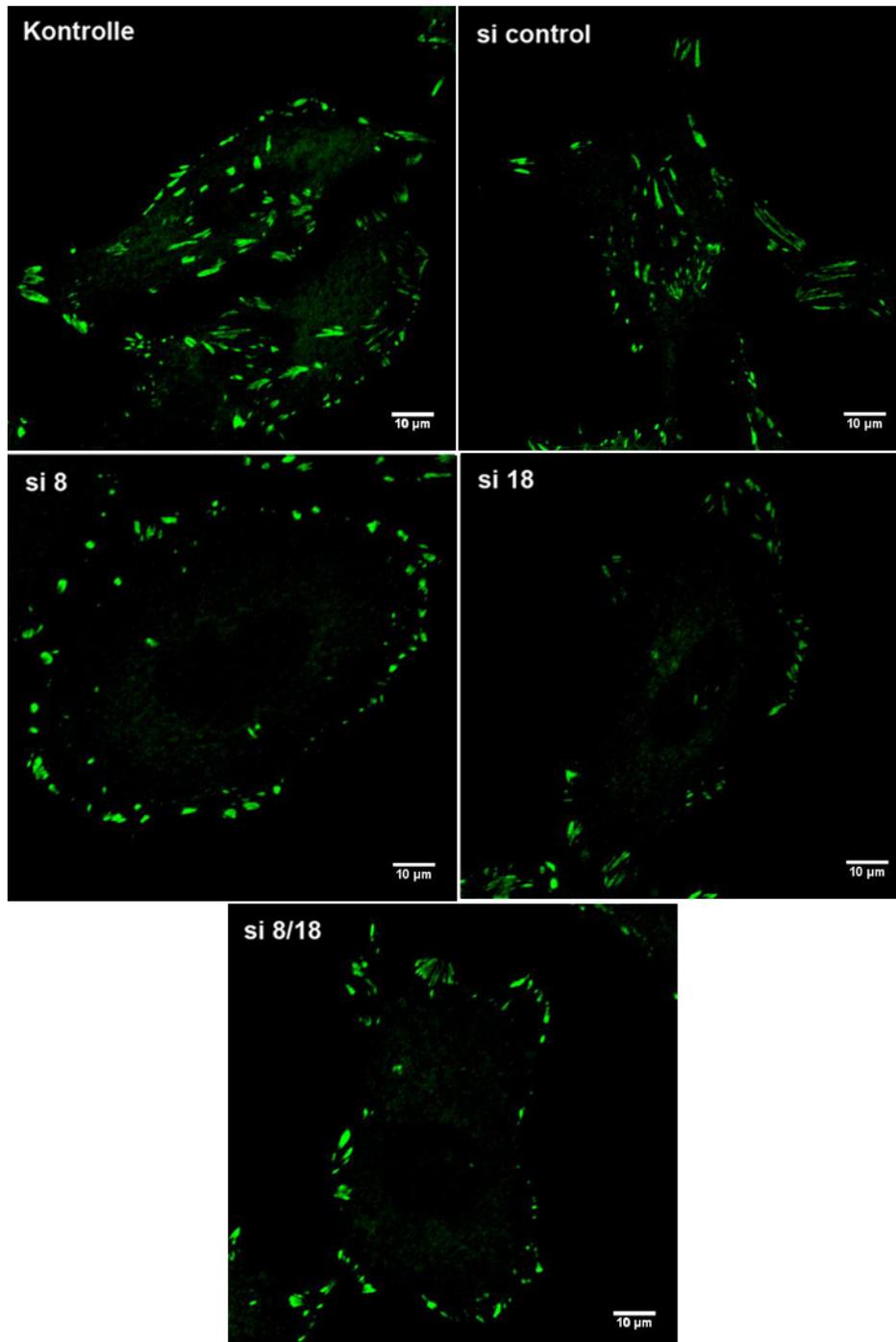


Abbildung 28: Paxillin als Marker für Fokalkomplexe in HeLa-Zellen nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18 und si control erfolgte mit Hi-PerFect. 72h nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen für 16h bei 4°C mit einem monoklonalen Paxillin-Antikörper inkubiert, die Fluoreszenzmarkierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Alexa-Fluor anti-mouse (488nm). (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA)

### 3.7 Der Einfluss der Zytokeratine 8 und 18 auf das Adhäsions-unabhängige Wachstumsverhalten der Panc-1- und HeLa-Zellen

Da in den Adhäsionsversuchen nur die Adhäsion an eine Extrazellulärmatrrix untersucht wurde, wurde im Folgenden das substratunabhängige dreidimensionale Wachstumsverhalten der Zellen in Softagar beurteilt.

Wie bei den Adhäsionsversuchen zeigte sich auch hier, dass die Veränderung des Zytokeratinskeletts Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von HeLa-Zellen hat. 96h nach der Aussaat war die Anzahl an Zellkolonien der Knock-down-Zellen deutlich geringer. Unter siCK8-Transfektion kam es zu einer Reduktion auf ca. 40%, die Zytokeratin 18-Depletion führte zu einem Rückgang auf ca. 25% und bei der Kombination aus siCK8 und siCK18 zeigten sich im Vergleich zu den si control-transfizierten Zellen noch ca. 30% der Zellkolonien (Abb.29).

Es ließen sich keine Unterschiede im Wachstumsverhalten der HeLa-Zellen nach Depletion der unterschiedlichen Keratin-Isoformen (siCK8, siCK18 und die Kombination aus siCK8 und siCK18) nachweisen.

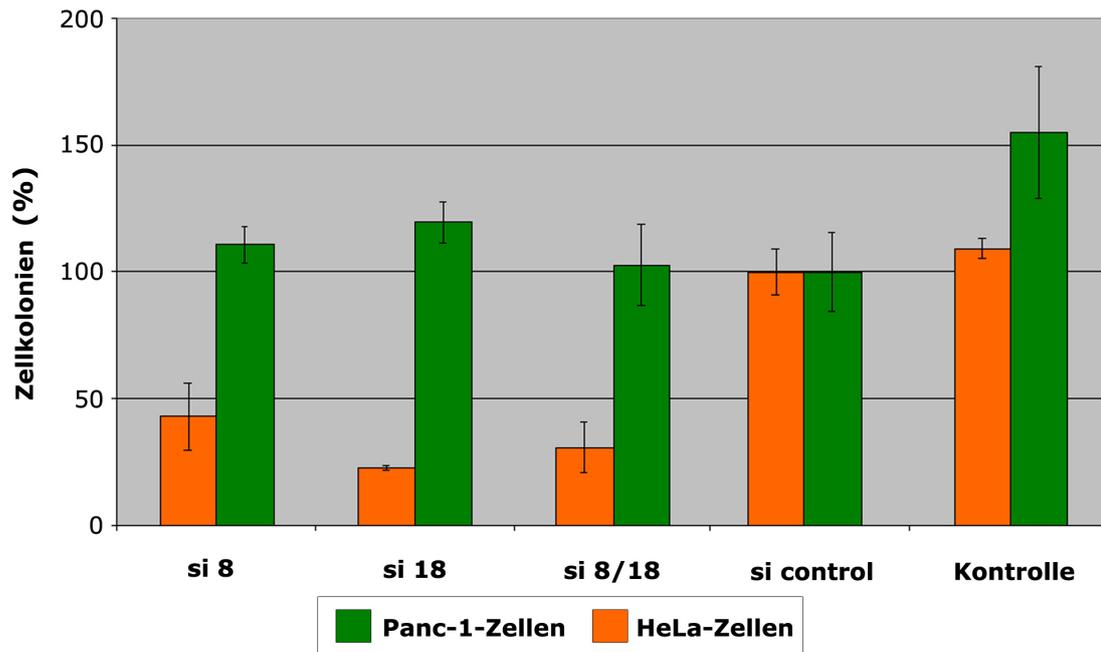


Abbildung 29: Das Zellkoloniewachstum von Panc-1- und HeLa-Zellen nach Zytokeratindepletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18 und si control erfolgte mit Hi-PerFect. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konzentration von 30.000 Zellen pro 35mm-Schale in halbfestes Medium gegeben. Die Auswertung erfolgte 96h nach Transfektion bei 200facher Vergrößerung am Axiovert 135-Mikroskop der Firma Zeiss. Hierbei wurden je Ansatz 12 Bilder aufgenommen, bei einem 3fachen Ansatz ergaben sich somit 36 Bilder je siRNA, auf denen alle Zellkolonien ausgezählt wurden. Als Zellkolonie wurden alle zusammenhängenden Zellkonglomerate unabhängig ihrer Größe gezählt (s. Abb.30, 31). Dargestellt sind hier relative Zahlen im Vergleich zum Zellkoloniewachstum der Zellen, die mit si control transfiziert wurden. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA)

Abbildung 30 zeigt, dass es nicht nur zu einer Reduktion der HeLa-Zellkolonien unter Zytokeratin-Depletion kam, sondern auch zu einer Veränderung in der Morphologie. Sowohl die untransfizierten Zellen als auch die si control-transfizierten Zellen zeigten große Zellkolonien, zumeist bestehend aus 10 und mehr Einzelzellen. Die einzelnen Zellen sahen rund und gleichmäßig aus und ließen sich gut voneinander abgrenzen. Bei den Zellen mit Zytokeratin-Depletion stellten sich größtenteils keine klaren Zellkolonien dar. Die Zellen sahen unregelmäßig aus, vielfach schienen Zellfragmente vorhanden zu sein. Außerdem ließen sich einzelne Zellen nur schwer erkennen, die Zellkolonien bestanden aus wesentlich weniger Einzelzellen als in den Kontrollansätzen.

Die Panc-1-Zellen zeigten im Gegensatz zu den HeLa-Zellen keine Veränderung in ihrem Wachstumsverhalten oder der Zellmorphologie in Softagar. In Abb. 29 sieht man, dass sich kein Unterschied im Kolonienwachstum der Panc-1-Zellen mit Zytokeratin-Depletion im Vergleich zu den si control-transfizierten Zellen nachweisen ließ. Lediglich die untransfizierten Zellen zeigten ein etwas stärkeres Wachstumsverhalten als die transfizierten; dies ließ sich allerdings am ehesten auf die Transfektion selbst zurückführen.

In der Morphologie zeigten sich in allen Ansätzen (Transfektion mit siCK8, siCK18, Kombination aus siCK8 und siCK18, si control und untransfizierte Zellen) große Zellkolonien, die Zellen sahen rund und gleichmäßig aus, Einzelzellen waren in den Kolonien gut voneinander abgrenzbar. Es ließ sich kein Unterschied zwischen Zytokeratin-depletierten Zellen und den Kontrollansätzen erkennen (Abb. 31).

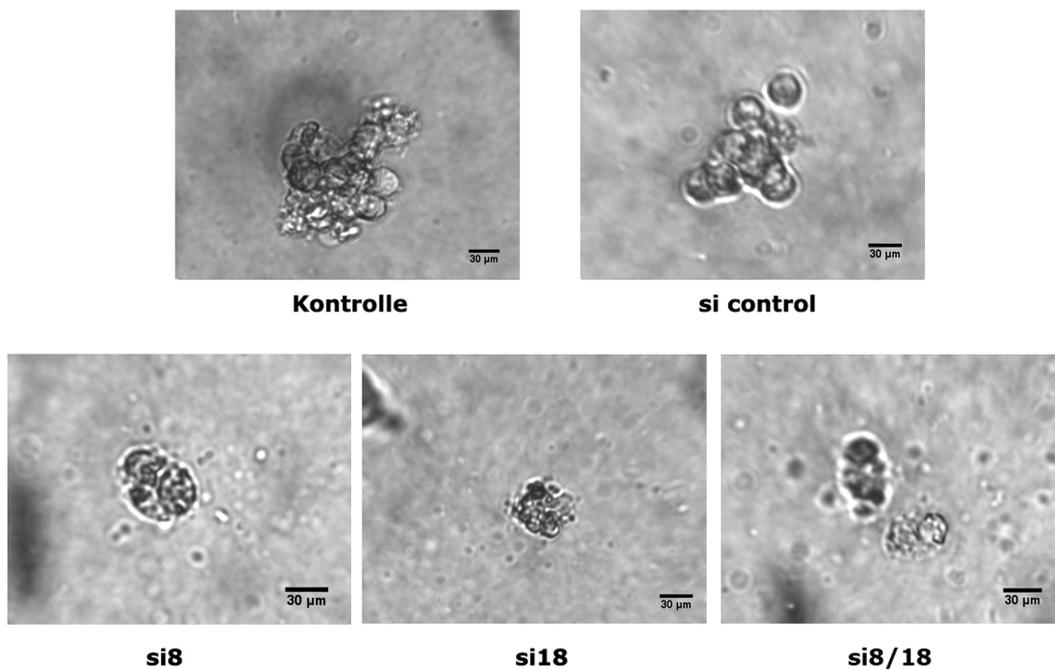


Abbildung 30: Morphologie der HeLa-Zellkolonien in halbfestem Medium nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18. Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18 und si control erfolgte mit HiPerFect. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konzentration von 30.000 Zellen pro 35mm-Schale in halbfestes Medium gegeben. Die Aufnahme repräsentativer Bilder erfolgte 96h nach der Transfektion bei 400facher Vergrößerung am Axiovert 135-Mikroskop der Firma Zeiss. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA)

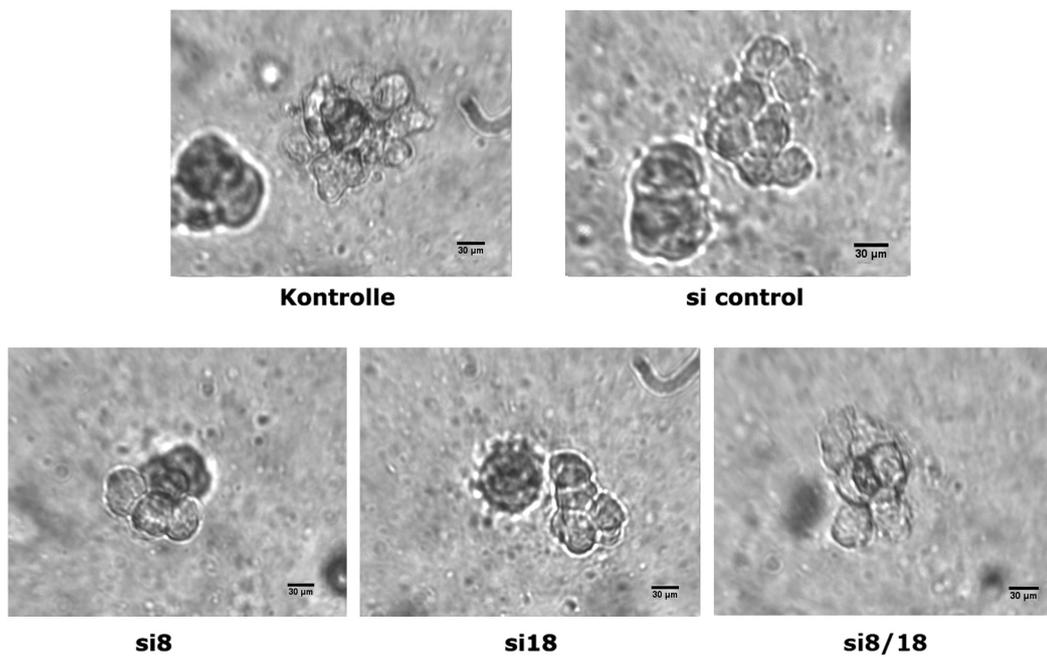


Abbildung 31: **Morphologie der Panc-1-Zellkolonien in halbfestem Medium nach Zytokeratin-Depletion mit den siRNA Oligonukleotiden siCK8 und siCK18.** Die Transfektion der siRNA Oligonukleotide siCK8, siCK18 und si control erfolgte mit HiPerFect. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konzentration von 30.000 Zellen pro 35mm-Schale in halbfestes Medium gegeben. Die Aufnahme repräsentativer Bilder erfolgte 96h nach der Transfektion bei 400facher Vergrößerung am Axiovert 135-Mikroskop der Firma Zeiss. (RNA = Ribonukleinsäure, si = small interfering RNA, CK = Zytokeratin, si control = non-silencing-siRNA)

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Möglichkeiten zur Modulation des Zytokeratinskeletts

Die Entdeckung des RNAi-Komplexes (RNA interference) vor ca. 10 Jahren führte zu einer neuen Art der spezifischen Gensuppression in eukaryotischen Zellen. RNAi ist ein natürlich vorkommender Mechanismus der Zelle, um das zelleigene Genom vor der Invasion durch fremdes genetisches Material (z.B. Virus-RNA, Transposons) zu schützen. Dieser Mechanismus wird sich nun zunutze gemacht, indem man kurze (21-26 Nukleotide) doppelsträngige RNA-Fragmente, die small interfering RNA, in die Zelle einbringt; diese siRNA wird vom RNA-induced silencing complex (RISC) erkannt. Durch Einbau eines Stranges der siRNA in den RISC ist dieser in der Lage die komplementäre mRNA zu identifizieren und mittels einer Nuklease im weiteren Verlauf zu destruieren [18, 61, 63]. Somit hat man die Möglichkeit sehr spezifisch die Expression eines bestimmten Proteins zu hemmen.

Da in dieser Arbeit zwei epitheliale Tumorzelllinien verwendet wurden, deren Zytokeratinskelett nahezu ausschließlich aus dem Heteropolymer Keratin 8 und 18 besteht [60], konnte mittels Depletion der mRNA dieser beiden Proteine eine völlige Suppression des Zytokeratins erreicht werden. Da Keratinfilamente nur gebildet werden können, wenn beide Keratine des Heteropolymers vorliegen [44], stellte sich die Frage, ob die Depletion eines der Keratine ausreichen würde, um eine Filamentbildung zu verhindern. Als Kontrollen wurde einerseits ein doppelsträngige non-silencing siRNA (si control) unter gleichen Bedingungen transfiziert; hierbei handelt es sich um eine siRNA, die für keinen bestimmten Genabschnitt kodiert und daher keine Gensuppression verursachen

sollte. Andererseits dienten untransfizierte Zellen als eine weitere Kontrolle; hierdurch konnte sowohl die Auswirkung des Transfektionsvorganges selbst, als auch eine mögliche unspezifische Reaktion durch die non-silencing siRNA überprüft werden.

Der Nachweis der Zytokeratin-Depletion erfolgte in dieser Arbeit unabhängig voneinander auf drei verschiedenen Ebenen. Zunächst wurde mittels Real-time-PCR der mRNA-Gehalt nach siRNA-Transfektion bestimmt. Es zeigte sich, dass siCK8 sowohl in Panc-1-, als auch in HeLa-Zellen zu einer hohen Depletion der mRNA für Zytokeratin 8 führt. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Depletion von Zytokeratin bereits 24h nach Applikation der siRNA erfolgt und für mindestens 72h anhält, nach ca. 96h allerdings wieder reversibel ist. Die Wirkung der siCK18 entsprach weitgehend der siCK8-Transfektion, erwies sich allerdings insgesamt als weniger effektiv. Bei den HeLa-Zellen war ebenfalls die Wirkung der siCK18-Transfektion schwächer als die siCK8-Transfektion.

Der direkte Proteinnachweis stellte die nächste Ebene der Zytokeratin-Depletion dar. Mittels SDS-PAGE und Westernblot wurde hier das Keratin unter siRNA-Wirkung beurteilt und es bestätigten sich die Ergebnisse der mRNA-Bestimmung. In Panc-1-Zellen führte sowohl die siCK8, also auch die siCK18-Transfektion zu einer deutlichen Reduktion des Panzytokeratingehaltes. Entsprechend der mRNA-Messung zeigte sich bei den HeLa-Zellen durch siCK18 keine eindeutige Verminderung des Panzytokeratins, die Transfektionen mit siCK8 erwiesen sich aber auch hier als ausreichend für eine klare Verminderung des Panzytokeratins.

Es wurde jeweils der Panzytokeratingehalt bestimmt, daher wurden sowohl Keratin 8, als auch Keratin 18 gleichermaßen erfasst; d.h. es erfolgte eine Bestimmung der Proteine nach erfolgter Translation der verbliebenen mRNA, unabhängig, ob bereits eine Keratinfilamentbildung stattfand oder nicht.

Schließlich folgte der direkte morphologische Nachweis der siRNA-Wirkung auf die Keratinfilamentbildung mittels Immunfluoreszenz des Zytokeratinskeletts. Nach ca. 24-48h konnte in Panc-1- und HeLa-Zellen eine völlige Depletion des polymerisierten Zytokeratinskeletts und eine Gestaltänderung der Zellen beobachtet werden. Zunächst kam es zu einer perinukleären Ringbildung des Zytokeratins, welche der Reorganisation des Keratins unter Phosphorylierung oder SPC-Wirkung ähnelte [2], anschließend konnte keine klare Keratinstruktur mehr nachgewiesen werden. Die perinukleäre Ringbildung war in HeLa-Zellen nicht so eindeutig zu erkennen wie in Panc-1-Zellen, dafür zeigte sich der Verlust der Keratinfilamente hier meist schon nach 24h. Bei den Panc-1-Zellen ließ sich nach 96h ein gegenläufiger Effekt beobachten; vermehrt zeigte sich wieder eine

perinukleäre Ringbildung, häufiger auch wieder ein völlig normales Keratinskelett.

Das bedeutet, dass der Effekt der siRNA-Transfektion reversibel ist, die Transfektion mit siRNA gegen Keratin 8 und 18 führt also zu einer zeitlich begrenzten Zytokeratin-Depletion. Bereits nach ca. 24h ließ sich eine deutliche mRNA-Verringerung nachweisen, der Proteinverlust und die Depletion des Filamentsystems folgten mit einer zeitlichen Verzögerung. Am Zytokeratinskelett zeigte sich, dass die Wirkung der siRNA mit der Zeit verloren geht, nach ca. 96h kommt es zum vermehrten Wiederauftreten von Panc-1-Zellen mit einem normalen Zytokeratinskelett. Des Weiteren kann man sagen, dass der Transfektionsvorgang selbst keine wesentlichen Auswirkungen auf die Panc-1-Zellen hatte, da sich in allen Experimenten die si control-transfizierten Zellen und die untransfizierten Zellen nahezu identisch verhielten.

HeLa-Zellen zeigten ebenfalls bereits 24h nach Transfektion mit siRNA gegen Keratin 8 und 18 einen mRNA-Verlust, auch der Proteinnachweis und die morphologisch nachweisbare Keratinskelett-Depletion bestätigen die erfolgreiche Keratin-Reduktion. Ein zeitlicher Verlauf ließ sich bei den HeLa-Zellen nicht klar darstellen, da es spätestens 48h nach Transfektion zu einem Detachment der Zellen kam.

## **4.2 Interaktionen zwischen den Intermediärfilamenten, den Mikrofilamenten und deren Rolle für die Adhäsion epithelialer Tumorzellen**

Aktinfilamente spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung jeglicher Adhäsionsverbindungen von Zellen; sowohl in Zell-Zell-Kontakten, als auch in den Fokalen Adhäsionen [24, 78, 79]. Daher folgte als Konsequenz aus den bisherigen Ergebnissen die morphologische Beurteilung des Aktinskeletts und der Fokalen Adhäsionen in HeLa- und Panc-1-Zellen unter Depletion des Keratinskeletts. Bei den HeLa-Zellen zeigte sich in der Aktin-Immunfluoreszenz kein eindeutiger Unterschied zwischen den Keratin-depletierten und den Kontrollzellen. Die bereits in der Panzytokeratin-Immunfluoreszenz nachgewiesene Formveränderung der HeLa-Zellen war auch hier sichtbar, dennoch lag kein wesentlicher Organisationsunterschied des Aktins vor. Allerdings bestätigte die Morphologie der Fokalen Adhäsionen in der Immunfluoreszenz die funktionellen Ergebnisse. Im Vergleich zu den Kontrollzellen ließ sich eine Reduktion der Fokalen Adhäsionen nachweisen; dies zeigte sich insbesondere in einem deutlichen Größenverlust der einzelnen Kontaktstellen.

Auffällige Veränderungen im Aktinskelett stellten sich hingegen in den Panc-1-Zellen dar. Während die Kontrollzellen ein relativ schwach ausgeprägtes Aktingerüst zeigten, kam es unter Zytokeratin-Depletion zu einer massiven Ausbildung von Stressfasern in klar strukturierter Anordnung, bzw. Ausrichtung. Auch die Fokalen Adhäsionen der Panc-1-Zellen mit Keratinverlust imponierten vermehrt. In den Kontrollzellen ließen sich nur vereinzelt randständige Fokale Adhäsionen nachweisen, die Keratin-Depletion verursachte eine deutliche Erhöhung der Anzahl, eine Verteilung über die gesamte Zelle und eine strahlenförmige Ausrichtung dieser Fokalen Adhäsionen vom Zellkern aus in Richtung der Peripherie der Zelle.

Durch einen schnellen Umbau der Fokalen Kontakte unterliegt das Aktinfilamentnetzwerk einer hohen Dynamik in der Formierung und Kontraktilität der Stressfasern [24]. Diese Dynamik in der Stressfaserentstehung der untersuchten Panc-1-Zellen steht also in direktem Verhältnis zur Vermehrung der Fokalen Adhäsionen. Da als Ursache der gezeigten Veränderungen die Depletion der Keratinfilamente anzusehen ist, gibt es offensichtlich eine direkte Verbindung oder Regulation zwischen dem Keratinskelett und den Aktinfilamenten, bzw. Fokalen Adhäsionen in Panc-1-Zellen.

In der Literatur existieren bereits mehrere Verweise auf Interaktionen zwischen Keratin- und Aktinfilamenten; so konnte z.B. gezeigt werden, dass der Ausgangspunkt der Keratinfilamententstehung mit F-Aktin assoziiert ist. Außerdem kommt es unter  $\alpha$ -Actinin-bedingter Organisation des F-Aktins simultan zu einer Reorganisation des Keratinnetzwerkes. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass es bei einer F-Aktin-Zerstörung ebenfalls zum Verlust der Keratinstruktur kommt [68, 69]. In der Arbeit von Windoffer et.al, 2006 [69] wird das Aktinfilament-Netzwerk als Ursprung der Keratinfilament-Entstehung beschrieben, dort konnten sie allerdings erst eindeutig nachgewiesen werden, wenn es z.B. unter der Bildung von Lamellipodien zu einer Ansammlung Fokaler Adhäsionen kommt [69].

Während diese und weitere Arbeiten zu diesem Thema eine Regulation ausgehend vom den Aktinfilamenten für die Ausbildung des Keratinskeletts beschreiben, zeigt sich in der vorliegenden Arbeit, dass ebenfalls ein Gegenregulationsmechanismus der Aktinfilamentorganisation, bzw. der Fokalen Adhäsionen bei Depletion der Keratinfilamente existiert. Besonders in den Panc-1-Zellen ließ sich unter Keratin-Depletion eine gesteigerte F-Aktin-Bildung und aufgrund der direkten Verbindung auch der Fokalen Adhäsionen nachweisen. Dies bewirkte eine Kompensation der Keratinfilament-Depletion; ein Mechanismus, der dazu führt, dass es trotz fehlendem Keratins nicht zu einem Adhäsionsverlust dieser Zellen kommt.

Bei den HeLa-Zellen ließ sich im Gegensatz zu den Panc-1-Zellen keine gesteigerte Aktin-Induktion nachweisen. Dies resultierte schließlich in einer Verringerung der Fokalen Adhäsionen und als Konsequenz daraus in einem Verlust der Adhäsionsfähigkeit. In HeLa-Zellen ließ sich also eine Kompensation wie bei den Panc-1-Zellen nicht nachweisen.

Des Weiteren wird in der Arbeit Beil et.al, 2003 [2] beschrieben, dass SPC (ein Stimulus zur Phosphorylierung) Veränderungen am Keratin unabhängig von der Aktinpolymerisation macht. Unter SPC-Behandlung kommt es zu einer Reorganisation des Keratins und gleichzeitig zu einer Formierung von Stressfasern, die Elastizität der Zelle nimmt hier zu. Andererseits bewirkt eine LPA-Behandlung (Lysophosphatidsäure) eine vermehrte F-Aktin-Polymerisation ohne eine Reorganisation der Keratinfilamente. Bezüglich der Adhäsionsfähigkeit hingegen lässt sich anhand der Resultate der vorliegenden Arbeit darauf schließen, dass die verstärkte F-Aktin-Polymerisation und die damit verbundene Vermehrung der Fokalen Adhäsionen in Panc-1-Zellen unter Keratin-Depletion der entscheidende Faktor zum Erhalt der Adhäsionsfähigkeit zu sein scheint. Es wirkt wie ein Gegenregulationsmechanismus zwischen Keratin- und Aktinskelett, die Induktion des Aktins unter Zytokeratin-Depletion bewirkt ein konstantes Adhäsionsverhalten der Panc-1-Zellen.

Diese Gegenregulation des Aktinskeletts in Panc-1-Zellen könnte der Grund für das unveränderte Adhäsionsverhalten unter Keratin-Depletion von Panc-1-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen sein. Es erfolgt also unter Zytokeratin-Depletion in Panc-1-Zellen eine Induktion des Aktins, wodurch das Fehlen des Keratinskeletts kompensiert wird. In HeLa-Zellen hingegen zeigte sich keine Induktion des Aktins unter Zytokeratin-Depletion, die depletieren HeLa-Zellen weisen somit ein verändertes Adhäsionsverhalten auf.

### **4.3 Das Adhäsionsverhalten epithelialer Tumorzellen**

Bereits während des Nachweises der erfolgreichen Zytokeratin-Depletion zeigte sich bei den HeLa-Zellen im Verlauf der Experimente ein starkes Zell-Detachment. Zur genauen Differenzierung zwischen einem tatsächlichen Zytokeratin-Depletions-bedingten Detachment und einem Problem des Attachments wurden die Adhäsionsversuche durchgeführt; hier wurde quantitativ nachgewiesen, dass die Adhäsionsfähigkeit an die EZM [78, 79] in HeLa-Zellen unter Keratin-Depletion deutlich eingeschränkt ist. Anhand des zeitlichen Verlaufs ließ sich zeigen, dass es sich nicht um eine Verzögerung der Adhäsion

handelte, sondern eindeutig um eine Verringerung; auch nach längerer Zeit blieb das Verhältnis zwischen den adhärenen Zellen mit Keratin-Depletion und den adhärenen Kontrollzellen gleich. Die Panc-1-Zellen zeigten hingegen trotz einer morphologisch eindeutig verminderten Organisation des Keratinskeletts keine Veränderung in ihrem Adhäsionsverhalten; weder ein Verlust, noch eine Verbesserung der Adhäsion konnten nachgewiesen werden.

Es lässt sich also sagen, dass das Keratin-Zytoskelett in HeLa-Zellen eine entscheidende Rolle für die Adhäsion an Matrices darstellt, in Panc-1-Zellen hingegen die Adhäsionsfähigkeit nicht allein vom Zytokeratin abhängig ist.

Eine andere Methode die Interaktionen zwischen dem Zytokeratinskelett und den Fokalen Adhäsionen zu untersuchen, stellte die Verwendung der Keratin-Konstrukte in den Adhäsionsversuchen dar. Hier zeigte sich die Auswirkung der posttranslationalen Modifikation in Form von Phosphorylierung auf die Organisation des Keratin-Zytoskeletts.

Weder die permanente Phosphorylierung an Ser431 im Keratin 8, bzw. Ser52 im Keratin 18 und die dadurch hervorgerufene perinukleäre Reorganisation und funktionelle Inaktivierung des Keratins, noch die Ausschaltung der Phosphorylierungsfähigkeit, führten in Panc-1-Zellen im Vergleich zum transfizierten Keratin-Wildtyp zu einem veränderten Adhäsionsverhalten. Bei den HeLa-Zellen zeigte sich hingegen, dass jede Keratinskelettveränderung die Adhäsion an die EZM negativ beeinflusste. Während die K8-S431-A / K18-S52-A-Konstrukte in ihrem Adhäsionsverhalten dem Wildtyp entsprachen, zeigte sich bei den phosphomimetischen K8-S431-E / K18-S52-E-Konstrukten eine erheblich reduzierte Adhäsionsfähigkeit.

Panc-1-Zellen zeigen also trotz Veränderungen in ihrem Zytokeratinskelett ein konstantes Adhäsionsverhalten, HeLa-Zellen hingegen zeigen durch Reorganisation des Keratinskeletts bei Phosphorylierung eine reduzierte Adhäsion.

Als nächstes wurde das Matrix-unabhängige Wachstumsverhalten untersucht. Es ist bekannt, dass verschiedene Faktoren auf die Proliferation von Zellen wirken; hierzu zählen u.a. lösliche Faktoren im umgebenen Medium (z.B. Wachstumsfaktoren, Mediatoren), Proteine der EZM, das Zellwachstum selbst und Zell-Zell-Kontakte. Besonders die Stimulation durch Wachstumsfaktoren und die Integrin-vermittelte Adhäsion aktivieren intrazelluläre Signalwege und damit eine Progression des Zellzyklus und somit auch die Proliferation [10, 13, 47]. Die HeLa-Zellen zeigten hier, dass die Zytokeratin-Depletion zu einer Reduktion des Zellkolonie-Wachstums führt. Die Panc-1-Zellen andererseits erwiesen sich auch in diesem Experiment als sehr konstant in ihrem Ver-

halten. Es konnte weder eine Verringerung im Zellkoloniewachstum nachgewiesen werden, noch zeigten sich morphologische Veränderungen der Panc-1-Zellkolonien unter Keratin-Depletion.

Insgesamt zeigt sich also, dass Panc-1-Zellen einen Verlust der Intermediärfilamente kompensieren können, HeLa-Zellen hingegen besitzen einen solchen Kompensationsmechanismus anscheinend nicht. Vielleicht ergibt sich hiermit eine neue Möglichkeit das Verhalten von HeLa-Zellen, insbesondere im Rahmen der Metastasierung dieser Tumorzellen beeinflussen zu können.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen zwischen dem Keratinskelett, den Aktinfilamenten und den Fokalen Adhäsionen in epithelialen Tumorzellen (Panc-1- und HeLa-Zellen) untersucht. Dies erfolgte mittels siRNA (small interfering Ribonukleinsäure)-induzierter Depletion der Keratin 8 und 18-mRNA (messenger Ribonukleinsäure). Da Zytokeratin 8 und 18 als Heteropolymer den Hauptanteil des Zytokeratins in einfachen Epithelien bilden, ermöglichte ein Knock-down dieser Keratine somit eine Untersuchung der Zytoskelettorganisation in Abwesenheit von Zytokeratin.

Sowohl in Panc-1-, als auch in HeLa-Zellen konnte mittels siRNA (small interfering Ribonukleinsäure) eine vollständige Suppression des Keratinskeletts erreicht werden. Es zeigte sich in der RT-PCR (Real-time-Polymerasekettenreaktion) eine deutliche Reduktion der mRNA (messenger Ribonukleinsäure) für Zytokeratin. Auch die Proteinexpression ließ sich mittels Westernblot nur noch stark reduziert nachweisen.

Die Zytokeratin-Depletion führte in HeLa- und Panc-1-Zellen zunächst zu einer Gestaltänderung des Zytokeratinskeletts in Form einer perinukleären Ringbildung und schließlich zu einem völligen Verlust der Zytokeratinfilamentstruktur. Im zeitlichen Verlauf ließ sich außerdem nachweisen, dass dieser Vorgang reversibel ist.

Im anschließend untersuchten Adhäsions- und Wachstumsverhalten der Zellen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Panc-1- und HeLa-Zellen. Aus der Strukturänderung des Zytokeratinskeletts resultierte bei den HeLa-Zellen ein Verlust der Adhäsionsfähigkeit der Zellen. Dies zeigte sich nicht nur bei Depletion der Zytokeratine 8 und 18, sondern auch bei permanenter Phosphorylierung des Serin431 des Keratins 8, beziehungsweise des Serin52 des Keratins 18 mittels phosphomimetischer Keratin-Konstrukte. Panc-1-Zellen hingegen wiesen trotz Zytokeratin-Depletion oder permanenter Phosphorylierung ein unverändertes Adhäsionsverhalten auf.

In Untersuchungen der anderen Zytoskelett-Elemente mittels Immunfluoreszenz reagierten die Panc-1-Zellen auf den Verlust des Zytokeratins mit einer vermehrten Aktin-Stressfaserbildung. Aufgrund der direkten Verbindung zwischen den Aktinfilamenten und den Fokalen Adhäsionen der Zellen, zeigte sich gleichzeitig auch eine Vermehrung und strahlenförmige Ausrichtung der Fokalkontakte entlang der Stressfaserzüge. Bei den HeLa-Zellen konnte unter der Zytokeratin-Depletion keine Veränderung im Aktinfilament-Gerüst nachgewiesen werden. Entsprechend der reduzierten Adhäsionsfähigkeit in den funktionellen Untersuchungen zeigten HeLa-Zellen mit depletiertem Zytokeratin auch morphologisch eine Reduktion der Fokalen Adhäsionen.

Im Vergleich der beiden epithelialen Tumorzell-Modelle HeLa und Panc-1 zeigen also die Pankreas-Karzinom-Zellen bei Zytokeratin-Depletion eine Anpassung ihres Matrixverhaltens in Form einer vermehrten Aktin-Induktion und Ausbildung Fokaler Adhäsionen. Auf diese Weise wirken die Panc-1-Zellen einem Verlust der Adhäsion unter Zytokeratin-Depletion entgegen. Ein solcher Kompensationsmechanismus kann in HeLa-Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Depletion des Zytokeratins in diesen Zellen führt zu einer Reduktion der Fokalen Adhäsionen; eine Gegenregulation durch das Aktinfilament-Gerüst bleibt jedoch aus, es resultiert ein Verlust der Adhäsionsfähigkeit der HeLa-Zellen daraus.

# Kapitel 6

## Literaturverzeichnis

- [1] Bear J, Svitkina T, Krause M, Schafer D, Loureiro J, Strasser G, Maly I, Chaga O, Cooper J, Borisy G, Gertler F. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-521, 2002.
- [2] Beil M, Micoulet A, von Wichert G, Paschke S, Walther P, Omary M, Veldhoven PV, Gern U, Wolff-Hieber E, Eggermann J, Waltenberger J, Adler G, Spatz J, Seufferlein T. Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nat Cell Biol* 5, 803-811, 2003.
- [3] Caulín C, Salvesen G, Oshima R. Caspase Cleavage of Keratin 18 and Reorganization of Intermediate Filaments during Epithelial Cell Apoptosis. *J Cell Biol* 138, 1379-1394, 1997.
- [4] Chu P, Weiss L. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 40, 403-439, 2002.
- [5] Cramer L, Siebert M, Mitchison T. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol* 136, 1287-1305, 1997.
- [6] Darling E, Guilak F. A Neural Network Model for Cell Classification Based on Single-Cell Biomechanical Properties. *Tissue Eng Part A*, 14, 1507-1515, 2008.
- [7] Dhanasekaran D, Kashef K, Lee C, Xu H, Reddy E. Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* 26, 3185-3202, 2007.
- [8] Dhillon A, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290, 2007.

- [9] Didry D, Carlier M, Pantaloni D. Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J Biol Chem* 273, 25602-25611, 1998.
- [10] Eliceiri B, Cheresch D. Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 563-568, 2001.
- [11] Evans E, Calderwood D. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* 316, 1148-1153, 2007.
- [12] Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63, 345-382, 1994.
- [13] Fujito T, Ikeda W, Kakunaga S, Minami Y, Kajita M, Sakamoto Y, Monden M, Takai Y. Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3. *J Cell Biol* 171, 165-173, 2005.
- [14] Geiger B, Volk T, Volberg T. Molecular Heterogeneity of Adherens Junctions. *J Cell Biol* 101, 1523-1531, 1985.
- [15] Gillingham A, Munro S. Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 1641, 71-85, 2003.
- [16] Gu L, Coulombe P. Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. *Curr Opin Cell Biol* 19, 13-23, 2007.
- [17] Hakuno D, Takahashi T, Lammerding J, Lee R. Focal adhesion kinase signaling regulates cardiogenesis of embryonic stem cells. *J Biol Chem* 280, 39534-39544, 2005.
- [18] Hannon G, Rossi J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378, 2004.
- [19] Hatzfeld M, Franke W. Pair Formation and Promiscuity of Cytokeratins: Formation In Vitro of Heterotypic Complexes and Intermediate-sized Filaments by Homologous and Heterologous Recombinations of Purified Polypeptides. *J Cell Biol* 101, 1826-1841, 1985.
- [20] Heath J, Holifield B. On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organisation of fibroblasts. *Symp Soc Exp Biol* 47, 35-56, 1993.

- [21] Herrmann H, Hesse M, Reichenzeller M, Aebi U, Magin T. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* 223, 83-175, 2003.
- [22] Hesse M, Zimek A, Weber K, Magin T. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *Eur J Cell Biol* 83, 19-26, 2004.
- [23] Holmes K, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347, 21-22, 1990.
- [24] Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* 173, 383-394, 2006.
- [25] Huttenlocher A, Palecek S, Lu Q, Zhang W, Mellgren R, Lauffenburger D, Ginsberg M, Horwitz A. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem* 272, 32719-32722, 1997.
- [26] Hynes R. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687, 2002.
- [27] Jaffe A, Hall A. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269, 2005.
- [28] Janmey P, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol* 113, 155-160, 1991.
- [29] Jeon E, Moon H, Lee M, Song H, Kim Y, Bae Y, Jung J, Kim J. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci* 119, 4994-5005, 2006.
- [30] Jeon E, Song H, Kim M, Moon H, Bae Y, Jung J, Kim J. Sphingosylphosphorylcholine induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via activation of JNK. *J Lipid Res* 47, 653-664, 2006.
- [31] Johansson B, Buno I, Juarranz A, Canete M, Villanueva A, Gosalvez J, Stockert J. Image Processing and Analysis of Fluorescent Labelled Cytoskeleton. *Micron* 29, 445-449, 1998.

- [32] Karakozova M, Kozak M, Wong C, Bailey A, 3rd Yates J, Mogilner A, Zebroski H, Kashina A. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science* 313, 192-196, 2006.
- [33] Kim K, Ren J, Jiang Y, Ebrahem Q, Tipps R, Cristina K, Xiao Y, Qiao J, Taylor K, Lum H, Anand-Apte B, Xu Y. GPR4 plays a critical role in endothelial cell function and mediates the effects of sphingosylphosphorylcholine. *FASEB J* 19, 819-821, 2005.
- [34] Ku N, Li J, Krams S, Esquivel C, Keeffe E, Wright T, Parry D, Omary M. Keratins as susceptibility genes for endstage liver disease. *Gastroenterology* 129, 885-893, 2005.
- [35] Ku N, Liao J, Omary M. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 272, 33197-33203, 1997.
- [36] Ku N, Omary M. Identification of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 18: potential kinases and a role in filament reorganization. *J Cell Biol* 127, 161-171, 1994.
- [37] Ku N, Omary M. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol* 174, 115-125, 2006.
- [38] Ku N, Zhou X, Toivola D, Omary M. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277, 1108-1137, 1999.
- [39] Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, 1970.
- [40] Lakshman N, Kim A, Bayless K, Davis G, Petroll W. Rho plays a central role in regulating local cell-matrix mechanical interactions in 3D culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 64, 434-445, 2007.
- [41] Liao J, Lowthert L, Ku N, Fernandez R, Omary M. Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. *J Cell Biol* 131, 1291-1301, 1994.
- [42] Loranger A, Gilbert S, Brouard J, Magin T, Marceau N. Keratin 8 modulation of desmoplakin deposition at desmosomes in hepatocytes. *Exp Cell Res* 312, 4108-4119, 2006.

- [43] Ma L, Xu J, Coulombe P, Wirtz D. Keratin filament suspensions show unique micromechanical properties. *J Biol Chem* 274, 19145-19151, 1999.
- [44] Magin T, Vijayaraj P, Leube R. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* 313, 2021-2032, 2007.
- [45] Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3233, 2007.
- [46] Mullins R, Heuser J, Pollard T. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6181-6186, 1998.
- [47] Nelson C, Chen C. Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Lett* 514, 238-242, 2002.
- [48] Nicholson-Dykstra S, Higgs H, Harris E. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr Biol* 15, 346-357, 2005.
- [49] Omary M, Ku N, Liao J, Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* 31, 105-140, 1998.
- [50] Omary M, Ku N, Tao G, Toivola D, Liao J. „Heads and tails“ of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci* 31, 383-394, 2006.
- [51] Oshima R, Baribault H, Caulin C. Oncogenic regulation and function of keratin 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev* 15, 445-471, 1996.
- [52] Pallari H, Eriksson J. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* 366, 53, 2006.
- [53] Pantaloni D, Clainche CL, Carlier M. Mechanism of actin-based motility. *Science* 292, 1502-1506, 2001.
- [54] Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci* 120, 3491-3499, 2007.
- [55] Ridley A, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399, 1992.

- [56] Ridley A, Schwartz M, Burridge K, Firtel R, Ginsberg M, Borisy G, Parsons J, Horwitz A. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709, 2003.
- [57] Riveline D, Zamir E, Balaban N, Schwarz U, Ishizaki T, Narumiya S, Kamb Z, Geiger B, Bershadsky A. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153, 1175-1186, 2001.
- [58] Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, Schleicher M, Faix J. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol* 7, 619-625, 2005.
- [59] Schweizer J, Bowden P, Coulombe P, Langbein L, Lane E, Magin T, Maltais L, Omary M, Parry D, Rogers M, Wright M. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 174, 169-174, 2006.
- [60] Seipelt J, Liebig H, Sommergruber W, Gerner C, Kuechler E. 2A Proteinase of Human Rhinovirus Cleaves Cytokeratin 8 in Infected HeLa Cells. *J Biol Chem* 275, 20084-20089, 2000.
- [61] Silva J, Chang K, Hannon G, Rivas F. RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age. *Oncogene* 23, 8401-8409, 2004.
- [62] Small J, Rottner K, Kaverina I, Anderson K. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochem Biophys Acta* 1404, 271-281, 1998.
- [63] Stegmeier F, Hu G, Rickles R, Hannon G, Elledge S. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13212-13217, 2005.
- [64] Svitkina T, Borisy G. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* 145, 1009-1026, 1999.
- [65] Svitkina T, Bulanova E, Chaga O, Vignjevic D, Kojima S, Vasiliev J, Borisy G. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 160, 409-421, 2003.

- [66] Tao G, Toivola D, Zhou Q, Strnad P, Xu B, Michie S, Omary M. Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates keratin 8 after hyposmotic stress in a site- and cell-specific manner. *J Cell Sci* 119, 1425-1432, 2006.
- [67] Toivola D, Ku N, Resurreccion E, Nelson D, Wright T, Omary M. Keratin 8 and 18 Hyperphosphorylation Is a Marker of Progression of Human Liver Disease. *Hepatology* 40, 459-466, 2004.
- [68] Weber K, Bement W. F-actin serves as a template for cytokeratin organization in cell free extracts. *J Cell Sci* 115, 1373-1382, 2002.
- [69] Windoffer R, Kölsch A, Wöll S, Leube R. Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. *J Cell Biol*, 173, 341-348, 2006.
- [70] Windoffer R, Leube R. Detection of cytokeratin dynamics by time-lapse fluorescence microscopy in living cells. *J Cell Sci* 112, 4521-4534, 1999.
- [71] Windoffer R, Woll S, Strnad P, Leube R. Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 15, 2436-2448, 2004.
- [72] Woll S, Windoffer R, Leube R. Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems. *Eur J Cell Biol* 84, 311-328, 2005.
- [73] Yamada S, Wirtz D, Coulombe P. Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments. *Mol Biol Cell* 13, 382-391, 2002.
- [74] Yamada S, Wirtz D, Coulombe P. The mechanical properties of simple epithelial keratins 8 and 18: discriminating between interfacial and bulk elasticities. *J Struct Biol* 143, 45-55, 2003.
- [75] Yoon K, Yoon M, Moir R, Khuon S, Flitney F, Goldman R. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J Cell Biol* 153, 503-516, 2001.
- [76] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44, 2006.
- [77] Yu Y. Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1113-1129, 2002.

- [78] Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* 32, 416-420, 2004.
- [79] Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114, 3583-3590, 2001.