

**Charakterisierung und Validierung
von Ena/Vasodilatator
stimulierendes Phosphoprotein
(VASP) Homologie 1 (EVH1)-
Domänen-Inhibitoren**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien
Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker Matthias Müller

aus Potsdam

2016

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von 2011 bis 2016 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin unter der Leitung von Dr. Ronald Kühne.

Erstgutachter: Dr. Ronald Kühne

Zweitgutachter: Prof. Dr. Christian Freund

Disputation am 21.06.2016

Inhalt

Abstract	VII
Kapitel 1	
Einleitung	1
1.1 Die Entstehung von Metastasen aus Primärtumoren	1
1.1.1 Primärtumoren	1
1.1.2 Die Invasions-Metastasierungs-Kaskade	2
1.1.3 Epitheliale-mesenchymale-Transition und Tumormikroumgebung	2
1.1.4 Die invasive Signatur	4
1.2 Das Aktin-Zytoskelett in der Migration	5
1.2.1 Aktinsynthese	7
1.2.1.1 Nukleation	8
1.2.1.2 Elongation	11
1.2.2 Ena/VASP-Proteine als zentraler Angelpunkt in der Aktingerüst- reorganisation und Migration. - Aufbau und Funktion	12
1.2.2.1 Ena/VASP-Proteine in der fokalen Adhäsion	16
1.2.2.2 Ena/VASP-Proteine in den Scheinfüßchen und Invadopodien	17
1.3 Therapie der Metastasierung am Beispiel des Mammakarzinoms	19
1.4 Die Ena/VASP-EVH1-Domäne und die Inhibierung der von ihr adressierten Protein-Protein-Interaktionen	23
1.5 Zielsetzung	26

Kapitel 2

Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Chemikalien	29
2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien	29
2.1.3 Enzyme	30
2.1.4 Reaktionschemikaliensätze	30
2.1.5 Vektoren	30
2.1.6 Oligonukleotide	31
2.1.7 DNA-Konstrukte	31
2.1.8 Organismen	32
2.1.9 Antikörper und Zellfarbstoffe	33
2.1.10 Inhibitoren	34
2.1.11 Peptide	34
2.1.12 Isotope	34
2.1.13 Geräte	34
2.1.14 Verbrauchsmaterialien	38
2.1.15 Wissenschaftliche Software und Datenbanken	38
2.2 Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1 Klonierung von <i>EnaH</i> - und <i>EVL- EVHI</i>	40
2.2.1.1 Amplifizierung der <i>EVHI</i> aus einer cDNA-Bibliothek mittels PCR	40
2.2.1.2 Restriktionsendonuklease-Verdau	40
2.2.1.3 Ligation	41
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i>	41
2.2.3 Plasmid-DNA-Extraktion	41

2.2.4	DNA-Sequenzierung	42
2.2.5	Konzentrationsbestimmung von DNA	42
2.2.6	Agarosegelelektrophorese	42
2.2.7	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	43
2.2.8	Bakterienkultivierung	43
2.3 Biochemische Methoden		44
2.3.1	Expression und Aufreinigung	44
2.3.1.1	Expression	44
2.3.1.2	Lyse der Bakterien	44
2.3.1.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung	45
2.3.1.4	Abspalten des Markers GST mittels Thrombin	45
2.3.1.5	Aufkonzentrieren von Proteinen	45
2.3.1.6	Größenausschlusschromatographie	46
2.3.2	Auftauen und Konzentrationsbestimmung von Proteinen	46
2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.3.3.1	Fixierung, Färbung, Aufnahme	47
2.3.4	Pulldown-Versuche	48
2.3.5	Western Blot	49
2.3.6	Tryptischer Verdau und ¹⁸ O-Markierung von Proteinen	50
2.3.7	Peptid-Spot-Arrays	51
2.3.8	HPLC-Analyse von NBD-markierten Verbindungen in Zellen	52
2.4 Biophysikalische Methoden		54
2.4.1	Bestimmung von Bindungskonstanten mittels ITC	54
2.4.2	¹⁸ O-Quantifizierung mittels Massenspektrometrie	54

2.5 Zellbiologische Methoden	56
2.5.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	56
2.5.2 Vitalitätsassay	56
2.5.3 Adhäsionsassay	56
2.5.4 Immunofluoreszenzanfärbung und Zellmembranpermeabilitätsassay	57
2.5.5 Untersuchung der Zellgröße	58
2.5.6 Invasionsassay	58
2.5.7 Echtzeitbeobachtung der Migration	59
2.5.8 Mikroskopeinstellungen bei den zellbiologischen Methoden	59

Kapitel 3

Ergebnisse	61
3.1 Proteinpräparation	61
3.2 Auswahl geeigneter Zelllinien	64
3.3 <i>In vitro</i> -Verdrängung bekannter Zielproteine der Ena/VASP-EVH1-Domäne mittels der neuartigen Inhibitoren	66
3.4 Proteomweite Untersuchung des Interaktionsmusters der Ena/VASP-EVH1 Domänen mittels ¹⁸ O-Massenspektrometrie und unter Verwendung der neuartigen Inhibitoren	67
3.5 Zellgängigkeit der verwendeten Inhibitoren, deren intrazelluläre Stabilität und Vitalität der verwendeten Zelllinien: Voraussetzung für Studien <i>in cellulo</i>	70
3.6 <i>in vitro</i> -ADME-Parameter der neuen EVH1-Inhibitoren: Plasmastabilität, Plasmaproteinbindung, metabolische Caco-2-Permeation und Stabilität in Lebermikrosomen	73
3.7 Interferenz der Protein-Protein-Wechselwirkung der Ena/VASP-Proteine mit ihren Zielproteinen durch die neuartigen Inhibitoren <i>in cellulo</i>	78

3.8	Charakterisierung phänotypischer Veränderungen der untersuchten Zelllinien durch die Inkubation mit den zellgängigen Inhibitoren der Ena/VASP-EVH1-Domäne	83
3.8.1	Zell-Zell-Kontakte und das cortikale Aktinnetzwerk	83
3.8.2	Der Einfluss der Ena/VASP-Proteine auf Stressfasern von HCT-116	84
3.8.3	Veränderung der beobachteten Zellfläche unter Einfluss der zellgängigen Inhibitoren	85
3.9	Einfluss der Inhibitoren der Ena/VASP-EVH1-Domäne auf die Beweglichkeit der migrierenden Zelllinie MDA-MB-231	87
3.10	Die neuartigen Inhibitoren der Ena/VASP-EVH1-Domäne als <i>chemical tool</i> : Validierung neuer Interaktionspartner	92
3.10.1	Epitopkartierung	92
3.10.2	Bestimmung von Bindungskonstanten	93

Kapitel 4

Diskussion	97	
4.1	EVH1-Bindungspartner: Charakterisierung und Competition mit den neuen EVH1-Inhibitoren <i>in vitro</i> und <i>in cellulo</i>	97
4.2	Phänotypische Veränderungen von EVH1-Inhibitor-inkubierenden Zellen	100
4.3	Ena/VASP-Proteine als zentraler Knotenpunkt in der Migration	103
4.4	Pharmakologische Parameter der EVH1-Inhibitoren	107
4.5	Fazit	109
Zusammenfassung	111	
Danksagung	113	

Anhang

I Publikationen	115
II Abbildungsverzeichnis	116
III Tabellenverzeichnis	117
IV Abkürzungsverzeichnis	118
V Literaturverzeichnis	121

Abstract

A hallmark of cancer is the ability to form metastases. Cells of a primary tumor undergo a developmental regulatory program called epithelial-mesenchymal transition (EMT) which leads to a specific signature of gene expression. This involves the upregulation of actin remodeling proteins and results in a migration state of cancer cells. Pivotal in this process are the Ena/VASP family proteins involved in regulation of actin polymerisation. They localise to regions of lamellipodia, filopodia, invadopodia and focal adhesions where they influence actin dynamics and thus migration. Since the localisation of Ena/VASP to certain regions in the cell is dependent on their EVH1 domains, these structures are favourable targets in drug discovery. Until now, no suitable inhibitors could be found to interfere with EVH1 interactions. This work presents a new strategy of EVH1 inhibitor design. New proline mimetics (ProM's) have been designed in which two consecutive prolines are linked by a vinylidene bridge thus forcing the three-dimensional structure to adopt a poly proline II helix which is recognised by EVH1 domains. Molecules containing these structures abolish EVH1 interactions to natural binding partners.

The aim of this work was the investigation of molecules that interfere with EVH1 interactions as well as the identification of new EVH1 interactors using pulldown techniques. Their cell membrane permeability and toxicity were examined in a cellular context. The influence of these molecules on Ena/VASP

localisation within the cell and their effects on the resulting behaviour in migration and invasion of metastasizing cancer cells was analysed.

The cell invasion of a breast cancer cell line was reduced by up to 80% using EVH1-inhibitors. This has a great potential in the development of new drugs in cancer treatment.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Die Entstehung von Metastasen aus Primärtumoren

1.1.1 Primärtumoren

Tumoren sind Erkrankungen bei denen sich normale Zellen zu einer fortschreitenden neoplastischen Erkrankung entwickeln. Ursächlich für diese Erkrankung ist die Entartung von Körperzellen, die von einer Reihe spezifischer Merkmale gekennzeichnet ist. Anhaltende proliferative Signale und die Umgehung von Wachstumssuppressoren sind jene Merkmale, die verantwortlich sind für das schnelle Wachstum der Tumoren. Apoptose-resistenz und die replikative Immortalität verhindern das Absterben der Zellen und führen zu einem immer weiteren Fortschreiten der Erkrankung. Die Fähigkeit, neue Blutgefäße im Zuge der Angiogenese zu bilden, stellt die Versorgung der Tumoren mit Sauerstoff sowie Nährstoffen und damit auch die Weiterentwicklung und das Wachstum sicher. Ein weiteres Merkmal ist die Eigenschaft, Migration und Invasion betreiben zu können und damit Metastasen zu bilden (Hanahan und Weinberg 2000). Während primäre Tumoren chirurgisch oder pharmakologisch mittels einer systemischen Therapie mit Zytostatika entfernt werden können, stellen die Metastasen ein großes Problem dar, da sie oft erst Jahre nach der Entfernung des Primärtumors

diagnostiziert werden. Bis dahin können sie weite Teile des Körpers befallen und so zu Organversagen und dem Tod führen (Barkan *et al.* 2010). Beispielsweise erkrankten laut Robert-Koch-Institut im Jahr 2011 in Deutschland etwa 70000 Frauen an Brustkrebs und circa 18000 starben an den Folgen von Metastasen (Krebs in Deutschland, 2013). Daher ist die Behandlung der Metastasenentstehung ein herausragendes Ziel in der Bekämpfung von Krebs.

1.1.2 Die Invasions-Metastasierungs-Kaskade

Die Metastasierung ist ein mehrstufiger Prozess, der auch als Invasions-Metastasierungs-Kaskade bezeichnet wird (Talmadge und Fiedler, 2010). Die Abfolge der zellbiologischen Veränderungen beginnt hierbei mit der lokalen Invasion im Primärtumor bis an die tumorbegrenzende Basallamina, gefolgt von der Intravasation, bei der Zellen durch die Basallamina in nahegelegene Blut- oder Lymphgefäße infiltrieren. Danach folgt der Transit der Zellen im lymphatischen oder hämatogenen System.

Bei der Extravasation invadieren die Zellen aus dem Lumen der Gefäße in bestimmte, entfernte Gewebe. Hier formen diese Zellen Mikrometastasen in Form von kleinen Knoten. Der letzte Schritt in der Bildung von Metastasen ist die Kolonisation, welche die Ausbildung von Tumoren aus mikrometastatischen Läsionen bezeichnet.

1.1.3 Epitheliale-mesenchymale-Transition und Tumormikroumgebung

Am Beginn der Invasions-Metastasierungs-Kaskade steht ein entwicklungsregulatorisches Programm namens epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Hierbei handelt es sich um einen Prozess, bei dem sich Epithelzellen in ihrer Spezialisierung rückwärts entwickeln und eine fibroblastenähnliche Morphologie annehmen (Thiery und Sleeman 2006). Gekennzeichnet ist diese Rückentwicklung durch die Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, welche auch während der Embryonalentwicklung in migrierenden Zellen vorherrschen (Micalizzi *et. al.* 2010). Zellen die der

EMT unterliegen, weisen im Allgemeinen eine erhöhte Motilität auf und exprimieren beispielsweise Matrixmetalloproteasen, welche die extrazelluläre Matrix - wie etwa die den Tumor umgebende Basallamina - zersetzen. Weiterhin wird die Expression von E-Cadherin bei gleichzeitiger Hochregulierung von N-Cadherin stark reduziert, was zur Folge hat, dass diese Zellen sich aus dem festen Zellverband des Primärtumors lösen (Cavallaro und Christofori 2004).

In embryonalen Zellen wird die Fähigkeit zur Migration durch Signale von benachbarten Zellen forciert (Micalizzi et. al. 2010). Analog dazu führen heterotypische Zellinteraktionen zwischen Tumorzellen und tumorassoziierten Zellen dazu, dass die EMT durchlaufen wird und damit die Zellen zur Migration und Invasion befähigt werden (Karnoub und Weinberg 2006-2007). Dieses heterogene Zellgemisch bezeichnet man als Tumormikroumgebung. Zu diesen tumorassoziierten Zelltypen gehören unter anderem mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten und Zellen des Immunsystems wie Makrophagen. Letztere sezernieren den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), der die Invasivität der Tumorzellen fördert. Im Gegenzug produzieren diese Tumorzellen den koloniestimulierenden Faktor (CSF-1) (Qian und Pollard 2010) sowie Cytokine (Gocheva et. al. 2010) welche die Makrophagen stimulieren. Mesenchymale Stammzellen im Tumor produzieren den Chemokin-Liganden CCL5, der zum einen die Tumorzellen in ihrer Invasivität fördert, zum anderen aber auch Immunzellen aus der Tumorumgebung anlockt. Sie hinterlassen bei ihrer Invasion in den Tumor Kanäle, welche die Tumorzellen nutzen, um zu intravasieren (Karnoub et. al. 2007). Tumorzellen sind dazu in der Lage, Chemotaxis zu betreiben. Sie folgen einem Lockstoffgradienten, der sie in lymphatische oder hämatogene Systeme sowie von dort aus in spezifische Organe oder Gewebe leitet. So exprimieren viele Tumorzellen den Chemokinrezeptor CXCR4, womit sie dem Gradienten von CXCL12 aus Lunge, Leber und Knochenmark in eben diese Organe folgen (Zhongxing Liang, Younhyoun Yoon, John Votaw, *et al.* 2005).

Ein in der Bildung von Metastasen wichtiger Faktor ist die morphologische Plastizität. Hierunter versteht man die Umkehrung der EMT, die auch als

mesenchymale-epitheliale-Transition (MET) bezeichnet wird. MET ist verantwortlich für die Rückverwandlung der invasiven Tumorzellen in das nichtinvasive Primärtumorstadium und ist die Voraussetzung zur Bildung von Metastasen im Zielgewebe (Hugo et. al. 2007). Die morphologische Plastizität von Tumorzellen ist auch verantwortlich für die Entstehung verschiedener Formen der Invasion. Man unterscheidet hierbei drei Formen: die mesenchymale, die kollektive und die amöboide Invasion. Die mesenchymale Invasion beschreibt Einzelzellen, die sich mittels Matrixmetalloproteasen aktiv durch das Gewebe arbeiten. Sie durchliefen die EMT in vollem Maße. Bei der kollektiven Invasion in kleineren Zellverbänden fehlt das durch EMT hervorgerufene Lösen aus dem Zellverband, was dazu führt, dass solche Zellen nur selten Metastasen hervorbringen (Friedl und Wolf 2008, 2010). Die dritte Form, die amöboide Invasion, ist von unklarer Prävalenz. Hierbei handelt es sich um Zellen, welche nicht aktiv extrazelluläre Matrix verdauen, sondern durch bereits vorhandene Zwischenräume migrieren (Madsen und Sahai 2010).

1.1.4 Die invasive Signatur

Invasive, aus Primärtumoren gewonnene Tumorzellen zeigen gegenüber nichtinvasiven Primärtumorzellen Unterschiede in ihren Genexpressionsniveaus. Daraus konnte eine invasive Signatur erstellt werden (Wang *et al.* 2004). Dabei sind unter anderem Gene, welche die Proliferation betreffen herunterreguliert, was zu einer Resistenz gegen die meisten Chemotherapeutika führt, die auf die erhöhte Proliferation von Tumorzellen abzielen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass diese Zellen Gene zur Regulation der Aktindynamik hochreguliert hatten. Das Aktin-Zytoskelett und dessen Remodellierung sind unabdingbar für die Verformbarkeit und Fortbewegung von Zellen und mithin für Tumormetastasierung.

Zu den hochregulierten Genen der Aktindynamik gehören unter anderem der epidermale *Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)*, *Cofilin*, *Zyxin*, der Komplex aus *Aktin-bezogenem-Protein 2 und 3 (Arp2/3)* und *Drosophila enabeled (Ena)* als Mitglied der Ena/VASP-Protein-Familie (Wang *et al.* 2004).

1.2 Das Aktin-Zytoskelett in der Migration

Das Aktingerüst gehört neben den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten zum Zytoskelett einer jeden eukaryotischen Zelle. Es ist ein Polymer aus Einheiten des Proteins Aktin, welches im monomeren Zustand in hoher Konzentration in der Zelle auftritt und als globuläres G-Aktin bezeichnet wird. Polymere Aktinfilamente werden hingegen als F-Aktin bezeichnet. Dieses F-Aktin bestimmt die Form der Zelle und, ihr als Tretmühle bezeichneter simultaner Auf- und Abbau, ermöglicht den Transport von Komponenten in der Zelle sowie das Fortbewegen der Zelle selbst. Die Polarität dieser Filamente wird durch aktin gebundenes ATP bestimmt, welches kurz nach der Anlagerung an ein wachsendes Filament zu ADP hydrolysiert wird und später den Abbau einleitet (Pollard und Cooper 2009). Bei der Migration erfolgt die Neusynthese der Filamente in Richtung der Bewegung. Am gegenüberliegenden Ende der Zelle werden diese Filamente abgebaut. Zur Ermöglichung der Fortbewegung bedarf es zweier essentieller Aspekte. Zum einen müssen die Filamente in so genannten fokalen Adhäsionspunkten fixiert sein, da sonst die Filamente nur zurück in die Zelle gleiten würden und keinen Vortrieb hervorrufen. Zum anderen muss die Synthese an der Leitfront reguliert werden, um so einen gerichteten Vortrieb, die Protrusion, zu ermöglichen (Abb. 1.1 A). Meist folgt die Zelle hier dem Gradienten eines bestimmten Lockstoffes. In der vorangetriebenen Protrusion, die als Scheinfüßchen bezeichnet wird, müssen neue fokale Adhäsionspunkte geschaffen werden. Alte, der Migration abgewandte, Adhäsionen werden dabei abgebaut. Da es in der Zelle auch solche Aktingerüststrukturen gibt, bei denen Aktinfilamente mit Myosin verbunden sind - ähnlich wie in einer Muskelfaser - kann durch Kontraktion dieser Filamente die Fortbewegung und speziell das Hinterherziehen des Zellkernes bewerkstelligt werden (Abb. 1.1 B) (Ladoux und Nicolas, 2012).

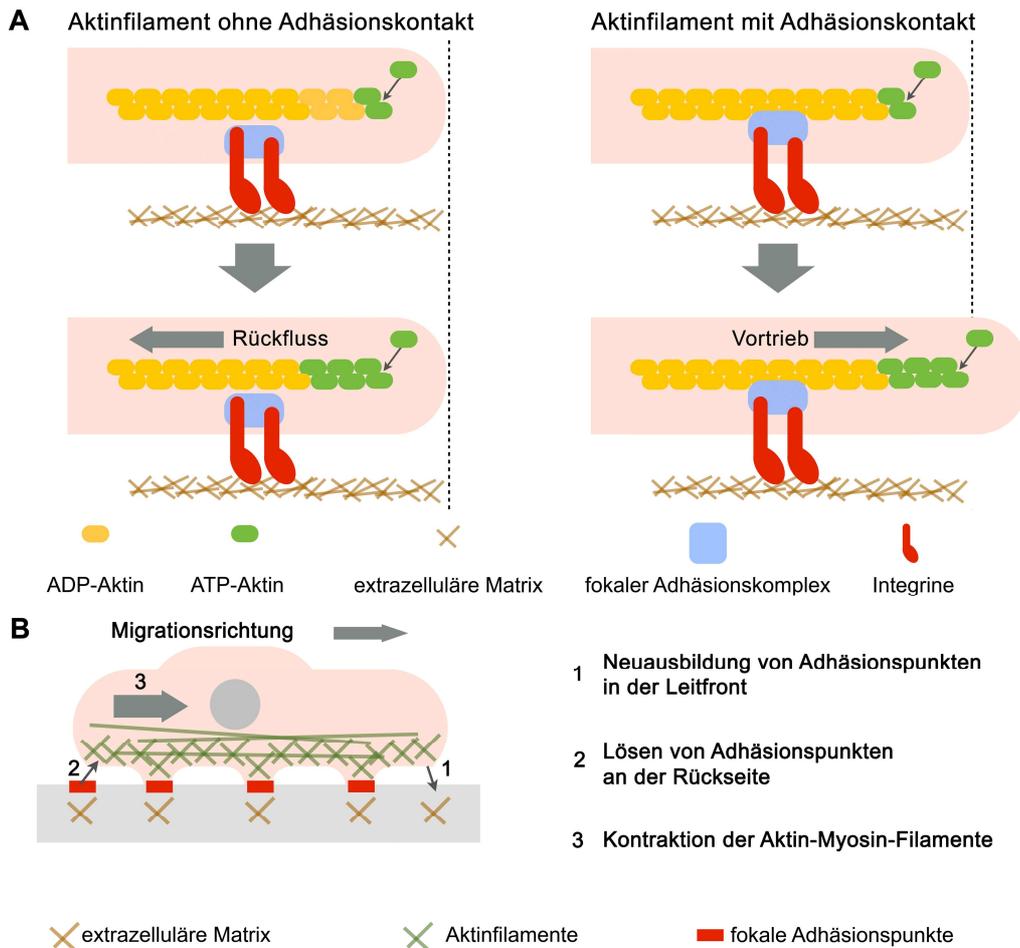


Abb. 1.1 Aktinpolymerisierung in der Zellmigration

(A) Neu synthetisiertes Aktinfilament (grün) verursacht keinen Vorschub der Plasmamembran (links) sondern gleitet in den Zellkörper zurück. Erst die Fixierung in fokalen Adhäsionspunkten verhindert das Zurückgleiten des Filaments und ermöglicht den Vorschub der Plasmamembran (rechts). (B) Bei der Fortbewegung der Zelle müssen in der Leitfront neue Adhäsionspunkte aufgebaut werden, während alte Adhäsionsstrukturen am hinteren Ende der Zelle aufgelöst werden müssen. Das Hinterherziehen des Zellkörpers erfolgt durch Kontraktion von Aktin-Myosin-Filamenten. Abb. nach: Rep. Prog. Phys., Ladoux und Nicolas 2012.

1.2.1 Aktinsynthese

Das F-Aktin bildet sich nicht spontan, da der erste Schritt der Polymerisierung, die Bildung eines Aktin-Dimers, eine K_D von 4,6 M aufweist und die Reaktion daher nicht freiwillig abläuft (Abb.1.2). Somit sind in der Zelle Helferproteine, so genannte Nukleatoren, von Nöten, welche die Di- und Trimerisierung von Aktin katalysieren (Sept und McCammon 2001). Ist dieser Schritt der Keimbildung aber initiiert, läuft die Polymerisierung weiter spontan ab, da die K_D eines Aktinmonomers an das bestehende Filament nur noch 140 nM beträgt.

Die Zelle besitzt jedoch Möglichkeiten, diese spontane Polymerisierung zu regulieren. Zum einen sind die meisten Aktinmonomere an Proteine wie Profilin gebunden. In diesem Zustand sind sie nicht dazu befähigt, spontan an ein Filament zu binden (Kovar et. al. 2006). Zum anderen existieren Filamentkappen. Hierbei handelt es sich um Proteine, welche an das wachsende Ende des Filaments binden können und eine weitere Polymerisierung verhindern (Pollard und Borisy, 2003). Um das Wachsen eines Aktinfilaments zu regulieren, braucht es weitere Helferproteine, die Elongatoren, welche die Filamentkappen verdrängen und die Polymerisation beschleunigen. Die Neubildung von Aktinfilamenten in der Zelle wird also gesteuert von der Aktivität der Nukleatoren und der Elongatoren.

Der Abbau eines Filaments wird eingeleitet durch die Hydrolyse von aktinmonomer-gebundenem ATP zu ADP und anorganischem Phosphat (P_i). Dies geschieht durch Aktin selbst kurz nach der Bindung an das Filament. Nachdem P_i langsam aus dem Komplex dissoziiert ist, können Proteine der Aktin-Depolymerisations-Faktor (ADF)/Cofilin-Familie an das Filament binden und die Depolymerisation des Filaments bewirken. Profilin fungiert hiernach als Nukleotid-Austausch-Faktor. Es belädt die freiwerdenden Aktinmonomere erneut mit ATP, womit sie der Polymerisation wieder zur Verfügung stehen (Pollard und Borisy 2003).

Die beiden ersten Gruppen von Proteinen, die Nukleatoren und die Elongatoren, sollen im Folgenden weiter beleuchtet werden.

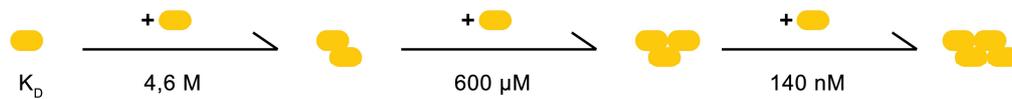


Abb. 1.2 Spontane Aktinpolymerisation

Die Bildung von Di- und Trimeren als Aktinkeim in der Polymerisierung läuft nicht freiwillig ab und benötigt Helferproteine. Erst die Bildung eines Tetramers (Polymerisierung) ist beschleunigt und kann spontan ablaufen, da das Gleichgewicht der Reaktion stark zu den Produkten hin verschoben ist. Abb. nach: Biophys. J., Sept und McCammon 2001.

1.2.1.1 Nukleation

Die Nukleation stellt den ersten Schritt in der Synthese eines Aktinfilaments dar. Die hierzu benötigten Helferproteine werden dabei in drei Klassen unterteilt. Die erste identifizierte Klasse ist die des Arp2/3-Komplexes. Dieser besteht aus Aktin-bezogenem-Protein 2 und 3 sowie fünf weiteren Untereinheiten. Zur Aktivierung benötigt er Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)- Familienmitglieder wie WASP selbst, das neuronale N-WASP oder die Wiskott-Aldrich-Syndrom-Verprolin-Homologie-Proteine (WAVE). Diese besitzen C-terminal eine Bindedomäne für den Arp2/3-Komplex sowie eine Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)- Homologiedomäne 2 (WH2) welche G-Aktin binden kann. Arp2/3 imitiert nach Aktivierung ein Aktindimer, an das sich ein weiteres G-Aktin anlagert. Rekrutiert wird dieses G-Aktin über die WH2-Domäne (Abb. 1.3). Weiterhin interagiert der Arp2/3-Komplex mit der Seite eines existierenden Filaments und verursacht so eine Verzweigung im 70 Grad-Winkel. So entsteht ein schnell wachsendes, breitgefächertes Aktingerüst (Pollard 2007). Diese Art der Aktinnukleation spielt eine wichtige Rolle bei der Protrusion von Scheinfüßchen und ist damit wichtig für die Migration einer Zelle (Takenawa und Suetsugu 2007).

Zur zweiten Klasse gehören die Proteine Spire, Cordon-bleu (Cobl) und Leiomodin (Lmod) (Abb. 1.3). Sie alle haben gemeinsam, dass sie G-Aktin über die WH2-Domäne binden, jedoch nicht den Arp2/3-Komplex rekrutieren.

Spire, das hauptsächlich in Nervenzellen exprimiert wird (Schumacher et. al. 2004) und einen Einfluss auf den Vesikeltransport in den Zellen hat (Qualmann et al. 2000), besitzt vier WH2-Domänen. Zur Nukleation benötigt es ein Spire-Dimer sowie die Kooperation von zwei Forminen (Bosch et al. 2007). Cobl besitzt drei WH2-Domänen und wird ebenfalls in Nervenzellen exprimiert. Hier ist es beteiligt an der Synthese des zellauskleidenden Cortex. In seiner Nukleationsgeschwindigkeit ist es vergleichbar mit dem Arp2/3-Komplex. Die drei möglichen Aktinmonomere bringt es in räumlich dichten Kontakt und bewirkt so die Nukleation (Ahuja et al. 2007). Lmod bindet zwei Aktinmonomere wie eine Filamentkappe von der nichtwachsenden Seite eines Filaments. Eine WH2-Domäne bringt ein drittes Aktin dicht an das Dimer und bewirkt die Nukleation. Zusätzlich bindet es ein Tropomyosin welches ebenfalls an das wachsende Aktinfilament bindet. Exprimiert wird es im Herzmuskel und in der glatten Muskulatur, wo es bei der Ausbildung des Sarkomers eine Rolle spielt (Conley et al. 2001).

Die dritte Klasse der Aktinnukleatoren stellen die Formine dar. Diese Proteine besitzen eine C-terminale Formin-Homologie-Domäne 2 (FH2), welche sich ringartig mit der FH2 eines zweiten Formins zusammenlegt und je ein G-Aktin bindet. Über die FH1-Domäne, welche aktin gebundenes Profilin rekrutiert, werden ein drittes und ein viertes G-Aktin zu einem neu entstehenden Aktinkeim zusammengebracht (Abb. 1.3). Bemerkenswert an den Forminen ist, dass sie neben der Nukleation auch als Elongatoren fungieren und so ein neu entstehendes langes Aktinfilament hervorbringen können. Der Ring aus den beiden FH2-Domänen rutscht dabei nach jeder G-Aktinanlagerung zurück an das wachsende Ende des Filaments (Goode und Eck 2007).

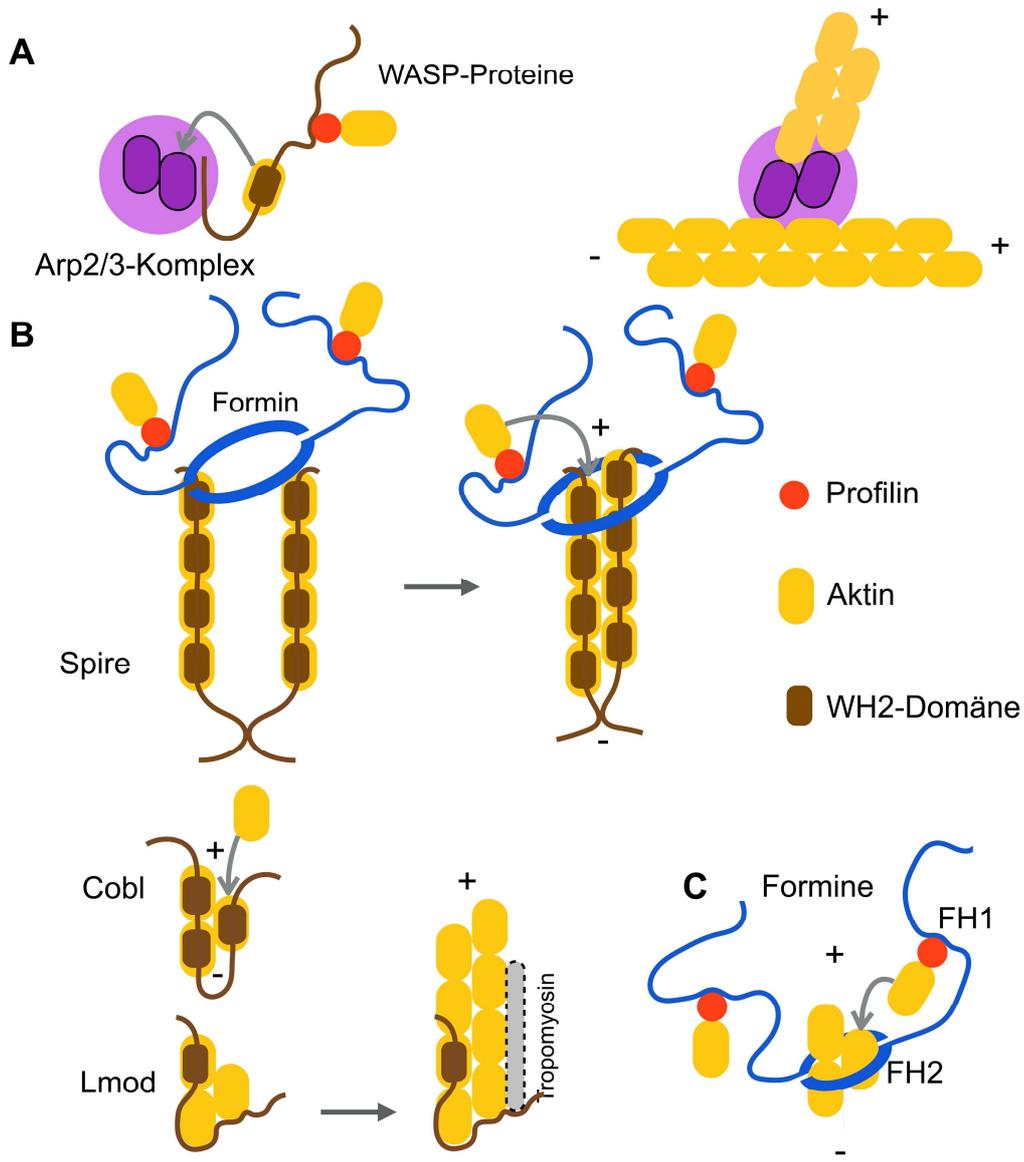


Abb. 1.3 Nukleationsfaktoren der Aktinpolymerisierung

(A) Der Arp2/3-Komplex wird aktiviert durch WASP-Familien-Proteine und imitiert ein Aktindimer. Ein weiteres Aktin wird über Profilin und die WH2 rekrutiert (links). Arp2/3-induzierte Aktinkeime können sich an bestehende Filamente anlagern und führen zu einem stark verzweigten Netzwerk (rechts). (B) Die Nukleationsfaktoren Spire, Cordon-Bleu (Cobl) und Leiomodin (Lmod) nutzen ihre WH2-Domänen und bringen so Aktinkeime zusammen. Spire benötigt dazu Formine, Lmod Tropomyosin. (C) Die Formine bilden Dimere welche Aktin binden. Über die FH1 rekrutieren sie Profilin, den Träger von monomeren Aktin. Bei der Nukleation bleiben Arp2/3, Spire, Cobl und Lmod am nichtwachsenden Ende (-) des Filaments, während die Formine am wachsenden Ende (+) verweilen. Abb. nach: Cell Press Qualmann und Kessels 2009.

1.2.1.2 Elongation

Nachdem die Nukleatoren einen Aktinkeim gebildet haben, setzen nun die Elongatoren ein und sorgen für die Entstehung und Verlängerung des Aktin-Filaments. Wie bereits beschrieben, stellen die Formine eine Klasse der Elongatoren dar und fungieren ebenfalls auch als Nukleatoren. Da sie nach der Keimbildung und während der Elongation das Filament nicht verlassen, verhindern sie somit auch das Binden einer Filamentkappe, welche die spontane Synthese stoppen würde (Kovar *et al.* 2006).

Zur zweiten bekannten Klasse der Elongatoren zählen die Ena/VASP-Proteine. Sie besitzen eine Ena/VASP-Homologie-Domäne 2 (EVH2), mit der sie sowohl an ein bestehendes Aktinfilament als auch an ein G-Aktin binden können. Weiterhin verfügen sie über Bindungsstellen für Profilin, das, wie auch bei den Forminen, die Versorgung mit G-Aktin sichert (Ahern-Djamali *et al.* 1999). Durch das Zusammenbringen von bestehendem Filament und den Monomeren fördern sie die Polymerisierung. Während ein Formin-Dimer an einem Aktinfilament arbeitet, können Ena/VASP-Tetramere mehrere Filamente gleichzeitig prozessieren und diese bündeln (Ferron *et al.* 2007; Abb. 1.4) Weiterhin schützen auch Ena/VASP-Proteine vor der Bindung von Filamentkappen und regeln die Zellmotilität (Bear *et al.* 2002).

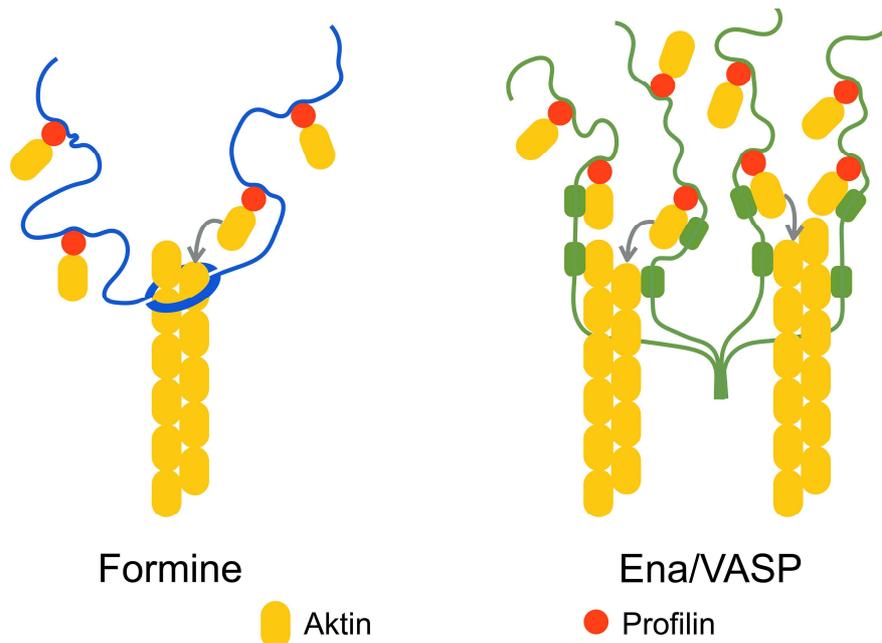


Abb. 1.4 Elongationsfaktoren der Aktinpolymerisierung

Formine und Ena/VASP-Proteine verlängern das Aktinfilament und schützen es vor Filamentkappenproteinbindung. Formine nutzen ihre Formin-Homologie-Domäne 1 (FH1), um Profilin-Aktin-Monomere zu rekrutieren und an die FH2-Domäne zu übergeben. Formine agieren als Dimere und verweilen während der Proymerisierung immer am wachsenden Ende des Filaments. Ena/VASP-Proteine bilden Tetramere, bündeln Aktinfilamente und können mehrere Filamente gleichzeitig prozessieren. Auch sie verweilen am wachsenden Ende des Filaments. Abb. nach: Curr Opin Cell Biol., Chesarone und Goode 2009.

1.2.2 Ena/VASP-Proteine als zentraler Angelpunkt in der Aktingerüst-reorganisation und Migration - Aufbau und Funktion

Die Ena/VASP-Proteinfamilie besteht beim Menschen aus den drei Mitgliedern Vasodilatator-stimulierendes Phosphoprotein (VASP), *Enabeld* human (EnaH) und dem *Ena/VASP like* Protein (EVL). Diese Proteinklasse besitzt die gleiche Domänenstruktur, bestehend aus einer N-terminalen Ena/VASP-Homologie-Domäne 1 (EVH1), einer zentralen prolinreichen Sequenz und einer C-terminalen Ena/VASP-Homologie-Domäne 2 (EVH2). EVH1 und EVH2 sind dabei hochkonservierte Regionen innerhalb dieser Familie. Unterschiede bestehen hauptsächlich in der prolinreichen Sequenz (PRS), bei der EnaH zusätzlich verschiedene Isoformen aufweist. (Halbrugge und Walter 1989; Gerlter *et al.* 1989, 1996).

Ena/VASP-Proteine haben Einfluss auf die Zellform, Adhäsion, interzelluläre Interaktionen sowie die Migration und Invasion. Sie sind in allen Kompartimenten omnipräsent, die essentiell für die Migration und Invasion einer Zelle sind. So befinden sie sich in der für die Chemotaxis wichtigen Leitfront von Scheinfüßchen und in den Spitzen der Filopodien (Bae *et al.* 2010). Außerdem findet man sie in den fokalen Adhäsionspunkten, welche die Verankerung der Zelle an extrazelluläre Matrix (ECM) bewirken (Brindle *et al.* 1996). In den ECM zersetzenden Invadopodien sind sie ebenfalls lokalisiert (Ridley *et al.* 2003). Ena/VASP-Proteine sind in verschiedenen, metastasierenden Krebsarten hochreguliert (Wang *et al.* 2004) und fördern die Tumorzellinvasion sowie Metastasierung (Gertler und Condeelis 2011). In Tierversuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Abschalten eines Ena/VASP-Gens durch die anderen Familienmitglieder ausgeglichen werden kann, jedoch das Abschalten aller Ena/VASP-Gene zu mangelhafter Endothelbarrierefunktion und damit einhergehend zu Einblutungen und embryonaler Letalität der Tiere führt (Furman *et al.* 2007). Daher gestaltete sich eine *in vivo* Untersuchung dieser bedeutenden Proteinfamilie als schwierig.

Als Bestandteil des Multiproteinkomplexes am T-Zell-Rezeptor bei der Interaktion zwischen einer antigenpräsentierenden Zelle und einem T-Lymphozyten treten sie zusammen mit dem Adapterprotein ADAP auf, das direkt mit Ena/VASP interagieren kann (Jordan *et al.* 2003; Krause *et al.* 2000). Weiterhin ist die Ena/VASP-Familie beteiligt an der Thrombozytenaggregation (Aszodi *et al.* 1999) und Wuchsrichtungsbestimmung von Axonen (Bear und Gertler 2009).

Die Ena/VASP-Funktion ist reguliert über die Rekrutierung in Proteinkomplexe *downstream* von Plasmamembran-Rezeptoren und über die Phosphorylierung. Via EVH1-Domäne erfolgt die Lokalisierung der Proteine in die fokalen Adhäsionen und die Leitfront der Lamellipodien sowie in die Spitzen der Filopodien. Dies geschieht über die Interaktion zu [F/W/L/Y]P.ϕP-Konsensussequenzen (ϕ ist eine aliphatische, . eine beliebige Aminosäure) (Dinkel *et al.* 2014; Ball *et al.* 2005) in Proteinen wie Zyxin

(Reinhard *et al.* 1995), Vinculin (Reinhard *et al.* 1996), *Ras-Associated and Pleckstrin-Homology-Domains-containing-Protein-1* (RAPH1) (Krause *et al.* 2004), Palladin (Boukhelifa *et al.* 2004) und Migfilin (Zhang *et al.* 2006). Bestimmte, konservierte Serine in der Ena/VASP-Familie können durch cAMP-, bzw. cGMP-abhängige Protein-Kinasen (PKA und PKG) phosphoryliert werden (Halbrugge und Walter 1989; Halbrugge *et al.* 1990; Lambrechts *et al.* 2000). Dies verringert filamentbündelnde Eigenschaften sowie die Fähigkeit der Filamentkappenverdrängung der Ena/VASP-Proteine und damit ihre Fähigkeit zur Aktinpolymerisierung (Harbeck *et al.* 2000; Barzik *et al.* 2005; Lambrechts *et al.* 2000). Während also die EVH1 den Ort in der Zelle bestimmt an dem Ena/VASP-Proteine agieren, reguliert der Grad der Phosphorylierung die Aktivität dieser Proteine in der Aktinpolymerisation. Dabei hat die Phosphorylierung keinen Einfluss auf die EVH1-Interaktionen (Harbeck *et al.* 2000). Beide Prozesse sind demnach unabhängig voneinander. Die Phosphorylierung beeinflusst aber die Wechselwirkung mit anderen Proteinen, die in der Lage sind, an die prolinreichen Sequenzen in der Ena/VASP-PRS zu binden. So wird die Interaktion zu Src-Homologie-Domänen (SH3) von Proteinen wie Abl und Src durch Phosphorylierung unterbunden, während die Bindung an Profilin, Lyn-SH3 und Fe65-WW bestehen bleibt (Lambrechts *et al.* 2000; Harbeck *et al.* 2002).

Die Phosphorylierung hat Einfluss auf die Morphologie und Motilität von Zellen. So kommt es in Neuronen und Thrombozyten zu einer verstärkten Ausbildung von Filopodien, was das Neuritenwachstum (Lebrand *et al.* 2004) und die Thrombozytenaggregation (Pula *et al.* 2006) bewirkt. Die Migration von Fibroblasten wird dadurch negativ beeinflusst (Loureiro *et al.* 2002).

Die EVH2-Domäne umfasst ein G-Aktin-bindendes (GAB), ein F-Aktin-bindendes (FAB) Segment und eine Tetramerisierungssequenz. Die Bindung an ein bestehendes Filament via FAB verdrängt Aktin-Kappenproteine (Barzik *et al.* 2005). Der Prozess der Aktinpolymerisation ist von Ferron *et al.* 2007 beschrieben worden. Dabei rekrutieren die Profilin-Bindungsstellen des prolinreichen Segmentes Profilin-Aktin-Bausteine, welche auf eine Ladeposition übertragen werden. Hier bindet zusätzlich das GAB an das Aktin im

Komplex und überträgt es auf das bestehende Filament. Das Profilin wird danach aus dem Komplex entlassen und das FAB rückt um eine Position weiter an das neue Ende des Filaments (Abb. 1.5). Man geht davon aus, dass zwei Ena/VASP-Proteine ein Aktin-Filament prozessieren. Tetramere dieser Proteine sind daher dazu in der Lage, Aktin-Filamente zu bündeln (Bachmann *et al.* 1999).

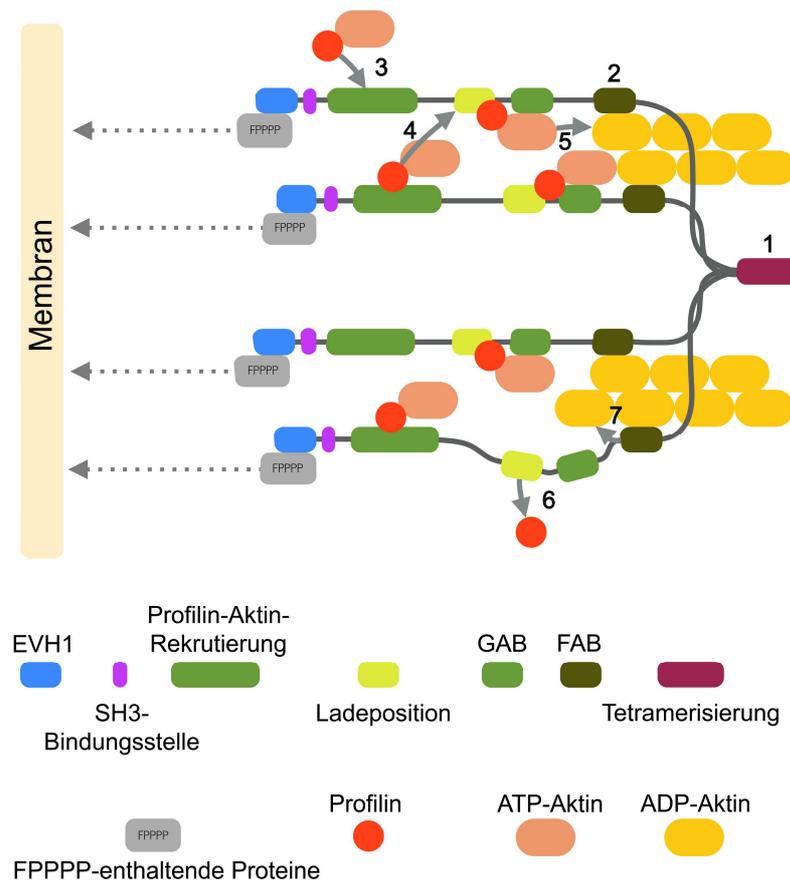


Abb. 1.5 Aktinfilament-Elongation durch Ena/VASP-Proteine

Ena/VASP-Proteine werden über die Interaktion ihrer EVH1-Domänen zu [F/W/L/Y]PPPP-präsentierenden Proteinen wie Zyxin, Vinculin und RAPH1 in Bereiche der Aktinpolymerisierung rekrutiert. Diese Proteine verlinken die Maschinerie mit der Plasmamembran (gepunktete Pfeile). Ena/VASP-Proteine bilden Tetramere (1), bündeln Aktinfilamente und binden sie über ihr F-Aktin-bindendes Segment (FAB, 2). Das Profilin-Aktin-Rekrutierungsmodul besitzt drei Bindestellen für Profilin-Aktin (3) und erhöht die lokale Konzentration dieser Bausteine. Ein Profilin-Aktin wird auf die Ladeposition übertragen (4). Gleichzeitig bindet das G-Aktin-bindende Segment (GAB) an das geladene Aktin und überträgt es auf das bestehende Filament (5). ATP-Hydrolyse im Aktin bewirkt wahrscheinlich die Aufhebung der Profilin-Aktin-Interaktion. Die Bindung der Ladeposition an ein Profilin allein ist schwächer als an das Profilin-Aktin. Profilin wird freigesetzt (6). Die FAB rutscht ein Aktin weiter voran an das neue Filamentende (7). Abb. nach: EMBO J., Ferron *et al.* 2007.

1.2.2.1 Ena/VASP-Proteine in der fokalen Adhäsion

Fokale Adhäsionspunkte sind Multiproteinkomplexe mit über 100 beteiligten Proteinen. Die Aufgaben dieser Proteine lassen sich einteilen in Rezeptor- und Matrix-Bindung, Aktinverknüpfung, Aktinpolymerisierung und intrazelluläre Signaltransduktion (Ladoux und Nicolas 2012).

Am Anfang eines entstehenden Adhäsionspunktes als fokaler Komplex in Bereichen von neuen Protrusionen der Zelle steht die Aktivierung von transmembranständigen Integrin-Heterodimeren, welche extrazelluläre Matrix erkennen und binden. Das Integrin $\beta 1$ erfährt diese Aktivierung durch einen Komplex aus *Rap1-GTP-interacting adapter molecule* (RIAM) und Ena/VASP-Proteinen (Worth *et al.* 2010).

Auf der intrazellulären Seite werden die zusammengelegten Integrine über Adapterproteine wie Talin und Vinculin an das Aktinnetzwerk gekoppelt (Zamir *et al.* 2001). Die Reifung der neuen fokalen Komplexe in den Scheinfüßchen zu stabilen fokalen Adhäsionen erfolgt, indem weitere Proteine wie Zyxin rekrutiert werden (Zaidel-Bar *et al.* 2004). Durch mechanischen Stress, der durch die Migration auf die fokalen Komplexe einwirkt, werden die Thyrosinkinase Src und die fokale-Adhäsions-Kinase (FAK) aktiviert, was zu einer Vergrößerung der Komplexe führt (Wang *et al.* 2005). RIAM, Vinculin und Zyxin und andere interagieren mit der EVH1-Domäne der Ena/VASP-Proteine und deren EVH2-Domäne stellt wiederum die Verbindung zum Aktinzytoskelett her.

Der für die Migration notwendige Abbau der fokalen Adhäsionspunkte am hinteren Ende der Zelle, der das Nachziehen des Zellkörpers gewährleistet, ist bisher noch nicht genau geklärt. Ein vorgeschlagener Mechanismus ist, dass die Protease Calpain Proteine der fokalen Adhäsionen abbaut und so das Ablösen verursacht (Huttenlocher *et al.* 1997).

1.2.2.2 Ena/VASP-Proteine in den Scheinfüßchen und Invadopodien

Die Koordination verschiedenster Prozesse ist essentiell für die Zellmigration. Hierzu zählen die Wahrnehmung von Substraten und die dynamische Reorganisation der Zell-Substrat-Verankerungen sowie die Erschaffung von Protrusionen und kontraktile Kräfte (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Small *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2010). Die regulierte Aktinpolymerisierung in der Leitfront erschafft diese Protrusionen in Form von Scheinfüßchen. Dies sind zum einen die breit gefächerten Lamellipodien und zum anderen die fingerartigen Filopodien (Small *et al.*, 2002). Lamellipodien bestehen aus einer Mischung von kurzen, stark verzweigten und langen, unverzweigten Aktinfilamenten. Neben der Nukleation und der Verzweigung durch Arp2/3 und dessen Aktivatoren, die WASP-Familien-Proteine, sind hier auch die Ena/VASP-Proteine und Formine von Bedeutung (Koestler *et al.* 2008; Yang *et al.* 2007). Diese Art der Scheinfüßchen liefern die vorantreibende Kraft für Motilität und Migration.

Filopodien hingegen bestehen aus langen, unverzweigten und parallelen Aktinfilamenten (Pollard und Borisy, 2003; Chhabra und Higgs, 2007). Sie sondieren die Umgebung während der Migration und suchen nach möglichen Verankerungsquellen. Filopodien fördern die frühe Phase der Substratbindung und aktivieren Signaltransduktionskaskaden zum Aufbau von stabilen fokalen Adhäsionspunkten. (Davenport *et al.*, 1993; Partridge und Marcantonio, 2006; Galbraith *et al.*, 2007; Schäfer *et al.*, 2010). Mitglieder der Ena/VASP-Proteine und Formine wie das *Mammalian Diaphanous 2* (mDia2) fördern die Filopodienbildung (Pruyne *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2002; Lebrand *et al.*, 2004; Mejillano *et al.*, 2004; Schirenbeck *et al.*, 2006; Applewhite *et al.*, 2007; Gates *et al.*, 2007; Homem und Peifer, 2009). Die mDia2-abhängige Filopodienbildung kann durch kleine GTPasen wie Cdc42 aktiviert werden (Peng *et al.*, 2003; Pellegrin und Mellor, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die EVH1-Domäne der Ena/VASP-Proteine direkt mit der FH2-Domäne von mDia2 interagiert und der Ena/VASP-Familie deshalb eine Schlüsselfunktion in der Filopodienorganisation zukommt (Barzik *et al.* 2014). So regulieren sie die Länge, protrusive Persistenz und Zell-Substrat-Kontakte und damit die Entstehung von fokalen Adhäsionen in den Filopodien.

Unter den WASP-Familien-Proteinen ist WAVE2 dasjenige Mitglied dieser Familie, welches die Bildung von Lamellipodien induziert (Sarmiento *et al.* 2008) und gleichzeitig das Formin mDia2 im Komplex zusammen mit Arp2/3 hält und so inhibierend auf dessen Funktion zur Filopodienbildung wirkt (Beli *et al.* 2008, Schirenbeck *et al.* 2005; Block *et al.* 2008). WAVE2 ist Bestandteil des WAVE2-Komplexes zu dem auch das Protein *Abelson Interactor 1* (Abl1) gehört. Es interagiert mit RAPH1 (Law *et al.* 2013), welches über Phosphatidylinositol-(3,4)bisphosphat an die Plasmamembran rekrutiert wird und das Ena/VASP-Proteine über die EVH1-Domäne in die Leitfront lokalisiert (Krause *et al.* 2004). So wirken WAVE2-assoziiertes Arp2/3 und Ena/VASP-Proteine zusammen an der Entstehung von Lamellipodien.

Eine weitere und wichtige Struktur in der Migration sind die Invadopodien. Es handelt sich hierbei um aktinreiche Protrusionen der Plasmamembran, welche mit der Zersetzung von extrazellulärer Matrix assoziiert sind (Murphy und Courtneidge 2011) und speziell bei der Extravasation in der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen (Seano und Prim 2015). Wachstumsfaktoren wie EGF oder der *platelet-derived growth factor* (PDGF) führen zur Aktivierung von Kinasen bestehend aus Src und der Abl-Kinase Arg. Letztere aktiviert Cortactin und bildet so einen Komplex zusammen mit den WASP-Familienmitgliedern WAVE oder N-WASP und Arp2/3, um die Aktinpolymerisation und damit die Protrusion des Invadopodiums zu initiieren (Lapetine *et al.* 2009; Mader *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Ena/VASP-Proteine in Bereichen der Aktinfilamentsynthese der Invadopodien lokalisiert sind und, dass das Herunterregulieren mittels Ribonukleinsäure-interferenz (RNAi) der Proteine WAVE2, N-WASP oder Ena/VASP sowohl die Invasion als auch die Aktinfilamentmenge in den Invadopodien drastisch reduziert (Takahashi und Katsuo Suzuki 2011). Ena/VASP-Proteine spielen daher eine zentrale Rolle bei der Migration und Invasion.

1.3 Therapie der Metastasierung am Beispiel des Mammakarzinoms

In Deutschland folgt die Therapie von Mammakarzinomen der international standardisierten S3-Leitlinie (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. *et al.* 2012). Bei einem rezidivierten oder metastasierten Mammakarzinom unterscheidet man demnach zwei Kategorien. Die Therapie des lokalen / lokalregionalen Rezidivs, welche aus operativer Entfernung, eventueller Bestrahlung und systemischer Behandlung besteht und die Therapie von Fernmetastasen. Bei letzterem wird auf Bestrahlung und/oder eine systemische Therapie gesetzt. Das Schema zur systemischen Behandlung ist in der Abbildung 1.6 dargestellt. Dabei wird zunächst in der Histologie der Status des Estrogenrezeptors (ER) in den Tumorzellen untersucht. Bei positivem Befund wird mit der endokrinen Therapie bestehend aus Aromatasehemmern und einem Estrogenrezeptor-Modulator begonnen. Ist die Patientin prämenopausal wird zusätzlich die Ovarialfunktion medikamentös ausgeschaltet. Eine Chemotherapie ist angezeigt bei negativem ER-Status oder einer ineffektiven endokrinen Therapie. Bei langsamem Tumorwachstum ist dabei eine Monotherapie die erste Wahl. Rasches Wachstum und aggressives Tumorverhalten werden mit Kombinationen, meist aus einem Taxan mit anderen Zytostatika, behandelt. Zeigt der histologische Befund die Expression des humanen-epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER2) an der Zelloberfläche, so wird im Rahmen einer gezielten Therapie zusätzlich mit dem monoklonalen Anti-HER2-Antikörper Trastuzumab oder dem Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib behandelt. Gegenstand der gezielten Therapie ist es auch, die Angiogenese, und damit die Versorgung der Metastase, mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab gegen den Gefäßwachstumsfaktor (VEGF) zu unterbinden.

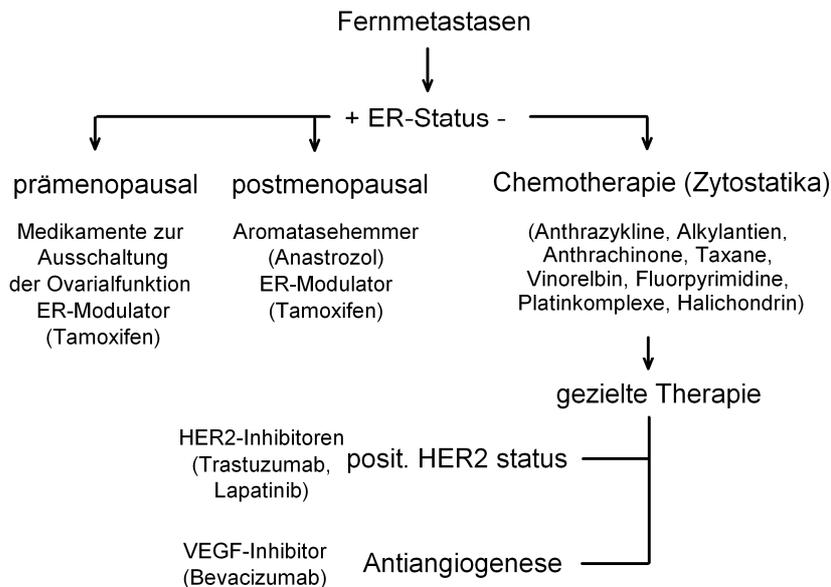


Abb. 1.6 Schema zur systemischen Behandlung von metastasierendem Mammakarzinom

Abkürzungen ER: Estrogenrezeptor, HER2: humaner-epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor-2; VEGFR: vaskulärer-endothelialer-Wachstumsfaktor-Rezeptor; Abb. nach: Deutsche Krebsgesellschaft e.V. *et al.* 2012.

Neben den bereits beschriebenen Inhibitoren gibt es eine Reihe weiterer Versuche, Wirkstoffe zur Behandlung von Metastasen zu finden. Eine Übersicht ist in der Abbildung 1.7 gezeigt. Hierbei fokussiert sich die Forschung auf die Entwicklung von Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche in Folge ihrer Signalkaskaden die Expression proliferativer und metastasierungs-assoziiierter Gene unterbinden sollen sowie auf Zielproteine, die in direktem Zusammenhang mit der Metastasierung, der Organisation des Aktinzytoskelettes stehen. Dabei seien vor allem fokale-Adhäsions-Kinase (FAK)-, Integrin- und Matrixmetalloprotease-Inhibitoren zu nennen (Zimmer and Steeg, 2015). Häufige Nebeneffekte wie die Auflösung der Zellverbände bei kollektiver Migration (Integrin-Inhibitoren) oder die Umstellung auf die proteaseunabhängige amöboide Zellinvasion (Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen (MMP)) führten jedoch teilweise zum Abbruch klinischer Studien (van Zijl *et al.* 2011).

Ein Vorteil bei der Inhibierung von Proteinen, welche direkt an der Aktinpolymerisation beteiligt sind, bestünde hierbei darin, dass sowohl

kollektiv, mesenchymal als auch amöboid migrierende Zellen gleichermaßen gehemmt werden sollten. Außerdem würde hier *downstream* von den Signalkaskaden eingegriffen, ganz im Gegensatz zu den bisher entwickelten Inhibitoren der klassischen Pharmakophore wie Kinasen und Enzyme. Dadurch könnte eine Vermeidung unerwünschter Nebeneffekte, die bei der breiten Inhibierung ganzer Signalkaskaden mit der einhergehenden drastischen Veränderung der Genexpression, sowie das Umgehen dieser Kaskadenwege durch *cross-talk* mit anderen erzielt werden. Am weitesten *downstream* der Signalkaskaden liegen Proteine, welche direkt Aktinfilamente synthetisieren. Dazu gehören alle Proteine die im Zusammenhang mit Arp2/3 die Aktinnukleation bewirken sowie die Proteine der Ena-VASP-Familie und der Formine. Daher ist es ein interessanter Ansatz, Inhibitoren für Vertreter dieser Klasse zu generieren.

Bisher wurde der Schwerpunkt hauptsächlich auf der Inhibierung des Arp2/3 Komplexes gesetzt. So ist Arp2/3 direkt und zentral an den wichtigen Schritten der Aktinnukleation beteiligt, wie im Kapitel 1.2.1 dargelegt wurde. Es wurden für Arp2/3 auch schon kleine Liganden via Hochdurchsatz-Screening gefunden und untersucht (Nolen *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des Arp2/3-Komplexes die Ausbildung von Lamellipodien und damit die Migration selbst verlangsamt (Ilatovskaya *et al.* 2013). Hierbei verändert sich jedoch nur die Art der Migration von der lamellipodiengetriebenen hin zur filopodiengetriebenen. Während normale Fibroblasten eine lamellipodiengetriebene und gerichtete Migration aufweisen, so migrieren Arp3-*knockout*-Fibroblasten auf eine filopodiengetriebene Art und Weise. Letztere zeichnet sich durch eine deutlich geringere Geschwindigkeit aus und ist zudem ungerichtet (Suraneni *et al.* 2014). So wird an dieser Stelle nun den Forminen die wichtigste Rolle in der Migration zugeschrieben. Auch für diese Proteinklasse ist ein Inhibitor - SMIFH2 - entwickelt worden (Rizvi *et al.* 2009). Seine Fähigkeit, die Migration zu inhibieren, wird aktuell kontrovers diskutiert. SMIFH2 bewirkt eine effektive Inhibierung der Migration von Glioblastoma-Zelllinien (Arden *et al.* 2015), während die Migrationsgeschwindigkeit der Knochenmarkszelllinie U2OS eher beschleunigt wird (Isogai *et al.* 2015).

Die Ena/VASP-Familie scheint wegen ihrer zentralen Stellung in der Aktinsynthese ebenfalls ein aufschlussreiches, wenn auch bisher vernachlässigtes, Ziel zu sein. Wie dargelegt vermittelt sie den direkten Kontakt zwischen dem Aktinfilament und den Adhäsionspunkten sowie den Scheinfüßchen und ist damit direkt am Zellphänomen Migration beteiligt. Über die Inhibition der Ena/VASP-EVH1-Domäne könnte daher *downstream* in das Verhalten der Zellen eingegriffen werden, ohne den Nachteil den die Beeinflussung ganzer Genexpressionsmuster sonstiger Rezeptorinhibitoren mit sich bringen kann. Im nächsten Kapitel soll dies näher beleuchtet werden.

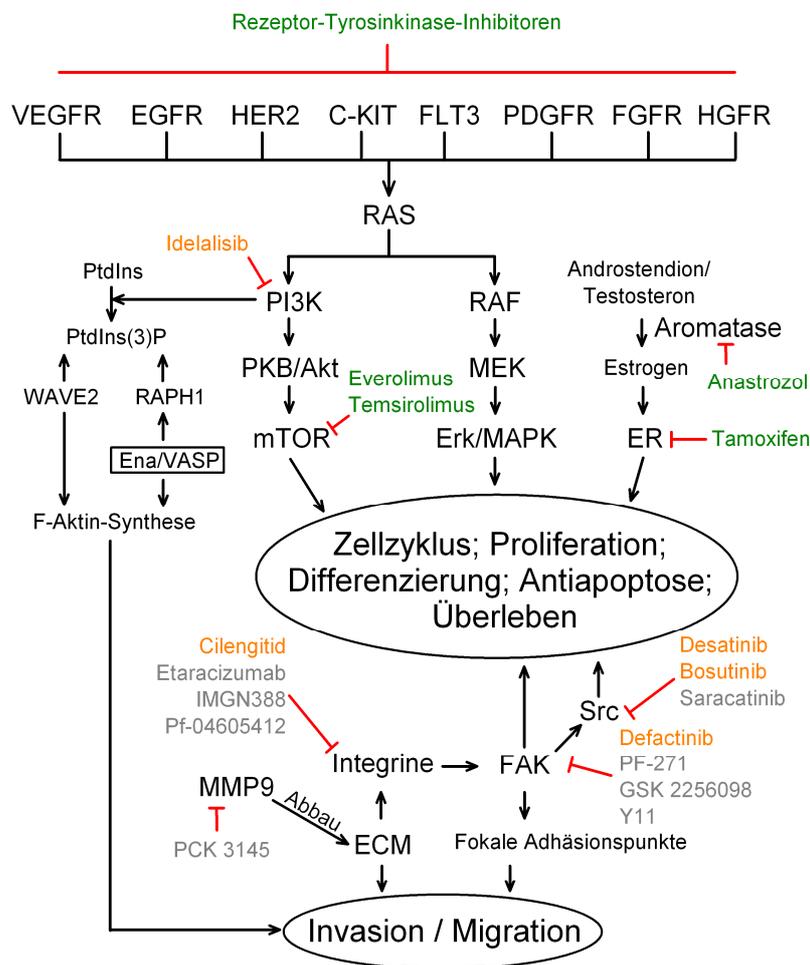


Abb. 1.7 Übersicht der systemischen Therapie bei Metastasierung

Wachstumsfaktor-Rezeptoren: C-KIT Tyrosinkinase-KIT (Stammzellfaktorrezeptor), EGFR epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, FGFR Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor, FLT3 fötaler Leber-Tyrosinkinase-Rezeptor, HER2 humaner-epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor-2, HGFR Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor, PDGFR Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor, VEGFR vaskulärer-endothelialer-Wachstumsfaktor-Rezeptor;

G-Protein RAS (*Rat-Sarcoma*); Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) welche die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen (PtdIns) am 3'-OH (PtdIns(3)P) katalysiert; PKB/Akt Proteinkinase B (Akt); mTOR (*Mammalian-Target-Of-Rapamycin*); Proteinkinase RAF (*Rat-Fibrosarcoma*); MEK: *Mitogen-Activated-Protein-Kinase*; Erk/MAPK MAP-Kinase Signalweg; ER Estrogenrezeptor; Src: Tyrosinkinase *sarcoma*; FAK fokale-Adhäsions-Kinase; ECM extrazelluläre Matrix; MMP9 Matrixmetalloprotease-9; Ena/VASP: *Enabled/Vasodilator-stimulierendes-Phosphoprotein*; RAPH1 *Ras-Associated and Pleckstrin-Homology-Domains-containing-Protein-1*; WAVE2 Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein-Familie-Verprolin-Homologes-Protein-2. Entsprechende Inhibitoren, die eine FDA-Zulassung (Food and Drug Administration) haben, sind in grün (gegen Metastasierung) und orange (gegen seltene Formen der Leukämie, Glioblastoma oder Mesenchelioma) dargestellt. Inhibitoren ohne derzeitige Zulassung sind in grau aufgezeigt. Abb. nach: Mihály *et al.* 2012; Zimmer and Steeg 2015; van Zijl 2011; Cuzick *et al.* 2013; Wu *et al.* 2013.

1.4 Die Ena/VASP-EVH1-Domäne und die Inhibierung der von ihr adressierten Protein-Protein-Interaktionen

Die EVH1-Domäne gehört zu den PRS-erkennenden Domänen (PRD), wozu auch die SH3- (Yu *et al.* 1994; Sparks *et al.* 1996), WW- (Chen *et al.* 1995; Macias *et al.* 1996), GYF-Domänen (Freund *et al.* 1999; Nishizawa *et al.* 1998) und Profilin (Schutt *et al.* 1993; Mahoney *et al.* 1997) gehören. Allen diesen Domänen gemein ist die Bindung anderer Proteine (Protein-Protein-Wechselwirkungen), wobei sie ihre Ziele über lineare prolinreiche Sequenzen, die ihre Zielproteine enthalten müssen, erkennen.

EVH1-Domänen haben strukturelle Ähnlichkeit mit den Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen. Im Vergleich zu ihnen binden sie jedoch nicht an Phospholipide, sondern an kurze Peptidsequenzen. In Abhängigkeit ihrer Ligandenspezifität unterscheidet man vier Klassen der EVH1-Domänen. Zur ersten Klasse gehören exklusiv die Ena/VASP-Proteine EnaH, VASP und EVL. Sie teilen das Konsensusmotiv [F/W/L/Y]P.ϕP (ϕ ist eine aliphatische, . eine beliebige Aminosäure) (Dinkel *et al.* 2014; Ball *et al.* 2005). Zur zweiten Klasse gehören die Homer/Vesl-Proteine mit der Konsensussequenz PP..(F/W/Y).D. Sie sind die nächsten Verwandten der Klasse eins und binden eine Art umgekehrtes Motiv. WASP und das neuronale N-WASP gehören zur dritten Klasse der EVH1 (auch WH1 genannten) Domäne (Peterson *et al.*

2007; Volkman *et al.* 2002). Die letzte und damit vierte Klasse der EVH1-Domänen beinhaltet die Spred-Proteine. Sie binden wesentlich längere Motive (Bundschu *et al.* 2006; Harmer *et al.* 2005).

Prolinreiche Peptidsequenzen (PRS) nehmen in wässriger Lösung bevorzugt die Konformation einer idealen, linkshändigen Polyprolin II (PPII) Helix an, welche charakteristische Rückgratwinkel von $\Phi = -78^\circ$ und $\Psi = +146^\circ$ aufweist (Ball *et al.* 2005). PRD können diese PPII Helix in zwei Möglichkeiten binden: (i) PxxP und (ii) xPPx. Je zwei Prolinreste interagieren so direkt mit den Oberflächen-Seitenresten der PRD. Die Ena/VASP-EVH1 Domäne bindet im Modus (i).

Das reine Prolinmotiv bindet im Allgemeinen nur mit sehr schwacher Affinität an die PRD, wobei keine besondere Selektivität für eine PRD zu erwarten ist. Die Erhöhung der Affinität und der Selektivität der PRS an ihrer PRD wird über zusätzliche Aminosäuren erreicht, den sogenannten flankierenden Epitopen (Niebuhr *et al.* 1997; Carl *et al.* 1999; Federov *et al.* 1999; Prehoda *et al.* 1999; Ball *et al.* 2000). Die Kombination aus Bindungsmodus der PPII Helix und flankierender Epitope ergibt ein für jede PRD spezifisches Konsensusmotiv, welches gleichzeitig das minimale Bindungsmotiv darstellt.

Auf Basis des Konsensusmotives entwickelten wir neuartige Inhibitoren, welche die Protein-Protein-Wechselwirkung der Ena/VASP-EVH1-Domäne mit ihren Zielproteinen effizient unterband (Opitz *et al.* 2015). Dabei stellte sich als besondere, aber auch bekannte Schwierigkeit die Ersetzung der Proline durch unnatürliche Bausteine dar. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Schmalz an der Organischen Chemie der Universität zu Köln und der Arbeitsgruppe von Dr. Kühne am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) konnten wir diese Schwierigkeit erfolgreich überwinden, in dem wir ein neuartiges Konzept von Modulen erarbeiteten, welches Di-Proline in ihrer PPII-Struktur nachahmt (Opitz *et al.* 2015).

Bei diesen so genannten Prolin-Mimetika (ProM's) handelt es sich im Ausgangspunkt um ein Di-Prolin, welches zusätzlich mittels einer Vinyliden-Brücke in seiner PPII-Struktur rigidifiziert wurde (Abb. 1.8A). Durch

Variation der Ringe und der Verknüpfungspunkte der Vinyliden-Brücke konnten wir verschiedene ProMs erzeugen, wobei für Ena/VASP-EVH1 bisher 5 verschiedene ProMs ausprobiert wurden (Zaminer *et al.* 2010; Reuter *et al.* 2014 /2015; Soicke *et al.* 2014). Die beiden Bausteine ProM-1 und ProM-2 erwiesen sich dabei als die erfolgreichsten. Mit ProM-2 können die ersten beiden Proline des Konsensusmotivs [FYWL]P. ϕ P ersetzt werden und mit ProM-1 die letzten Proline (Opitz *et al.* 2015). Mittels *Molecular Modelling* fanden wir für das flankierende Epitop als günstigste Ersetzung die unnatürliche Aminosäure 2-Chloro-Phenylalanin (Opitz *et al.* 2015) und nach Optimierung erhielten wir den Liganden **1** Ac-[2-Cl-F][ProM-2][ProM-1]-OH (Abb. 1.8A). Der Ligand **1** folgt dem Konsensusmotiv [FYWL]P. ϕ P, das gleichzeitig das minimale Bindungsmotiv darstellt. Im Vergleich zu anderen PRD konnte festgestellt werden, dass diese Verbindung selektiv für die Ena/VASP-EVH1-Domänen ist (Opitz *et al.* 2015). Weiterhin bindet der Ligand **1** mindestens 180 Mal stärker an die Ena/VASP-EVH1-Domäne, als das Peptid Ac-FPPPP-OH, das die unveränderte, natürliche Variante des Liganden **1** darstellt (Abb. 1.8C).

Die Abbildung 1.8B zeigt die Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen von Mena (*murine enabeled*)-EVH1 mit dem natürlichen Peptidliganden Ac-FPPPP-OH (PDB:1evh, Prehoda *et al.* 1999) und der EnaH-EVH1 mit dem Liganden **1** (PDB:4my6, Opitz *et al.* 2015). Hierbei ist zu erkennen, dass beide Liganden in der PPII-helikalen Formation übereinanderliegen und der Ligand **1** die natürliche Struktur sehr gut nachahmt.

Mittels der gewonnenen Kristallstruktur des Liganden **1** entwickelten wir einen neuen ProM-Baustein, ProM-9 (Abb. 1.8A). Dieser stellt ein Derivat des ProM-1 dar, bei dem der zweite fünfgliedrige Ring mit einem Methylrest dekoriert wurde, der mit der Proteinoberfläche interagiert. Mit dieser Änderung erhielten wir den Liganden **2**, der nochmals dreimal besser an die Ena/VASP-EVH1-Domänen band, als der Ligand **1** (Abb. 1.8C).

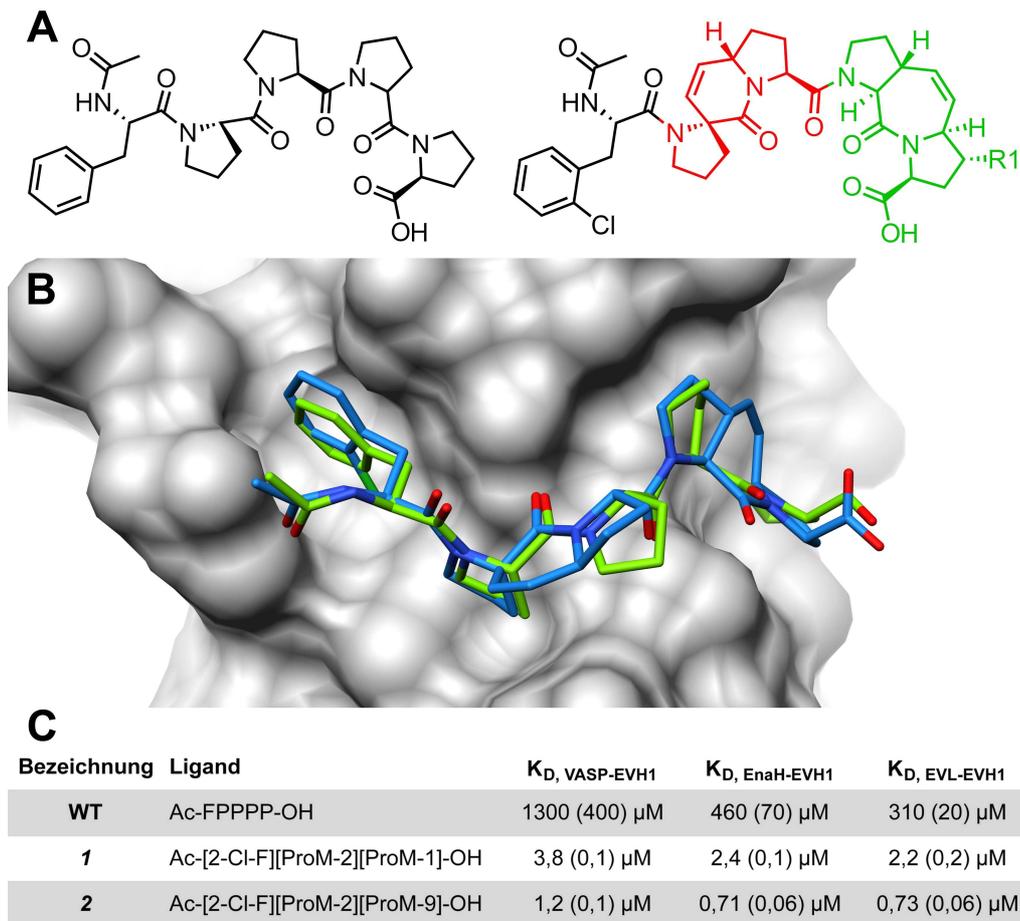


Abb. 1.8 ProM's - Strukturen und Bindungskonstanten von EHH1-Liganden

(A) rechts: Ligand **1** Ac-[2-Cl-F][ProM-2][ProM-1]-OH mit ProM-2 in rot und in grün ProM 1 (R1 = -H) oder Ligand **2** Ac-[2-Cl-F][ProM-2][ProM-9]-OH mit ProM-9 (R1 = -Me) in grün. links: korrespondierendes Peptid Ac-FPPPP-OH (B) Überlagerung der Kristallstrukturen von Mena-EVH1 mit Peptidliganden Ac-FPPPP-OH in grün (PDB:1evh; Prehoda *et al.* 1999) und EnaH-EVH1 mit ProM-Liganden Ac-[2-Cl-F][ProM-2][ProM-1]-OH in blau (PDB:4my6; Opitz *et al.* 2015). (C) Bindungskonstanten der Liganden an die EVH1-Domänen von VASP, EnaH und EVL. (Quelle: Robert Opitz).

1.5 Zielsetzung

Die Ena/VASP-Proteinfamilie ist ein zentraler Knotenpunkt der Aktinfilamentsynthese und ist damit direkt in wichtige physiologische Prozesse der Zelle involviert, wie die Migration und Invasion. Damit ist diese Proteinfamilie aber auch direkt an krankheitsrelevanten Prozessen beteiligt, wie der Metastasierung von Krebs. Wie dargestellt, scheint für diese Phänomene die EVH1-Domäne der Proteine mit entscheidend zu sein, da diese Domäne wichtig für die Lokalisation der Ena/VASP-Proteine ist. Wir haben

für die EVH1-Domäne Inhibitoren entwickelt, allerdings wurden diese Liganden nur in ihrer Affinität an die Domänen optimiert.

Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, die EVH1-Liganden umfassend biologisch zu charakterisieren, um einerseits den Wirkmechanismus der neuen Verbindungen aufzuklären und andererseits mögliche Seiteneffekte abzuschätzen. In biochemischen Versuchen soll untersucht werden, ob die neuen Liganden in der Lage sind, natürliche Bindungspartner der Ena/VASP-EVH1-Domänen zu verdrängen. In einem proteomweiten Ansatz soll auch evaluiert werden, ob es weitere bislang unbekannte EVH1-Bindungspartner gibt, welche mit den Liganden von den EVH1-Domänen verdrängt werden können. Gegebenenfalls sollen diese Interaktionen genauer zellbiologisch untersucht und charakterisiert werden. Weiterhin ist zu prüfen, ob die Liganden zellpermeabel sind und in der Zelle genügende Stabilität aufweisen. Mittels Immunofluoreszenz-Technik ist zu zeigen, welchen Einfluss die Verbindung auf Ena/VASP-Proteine und deren Bindungspartner in der Zelle hat. Neben einem Toxizitätstest der neuen EVH1-Liganden soll auch herausgefunden werden, ob und gegebenenfalls wie diese Verbindungen das Zytoskelett und die Migration bzw. Invasion einer metastasierenden Krebszelle beeinflussen können. Vergleichend sollen dazu auch andere, bereits bekannte Inhibitoren der Zellmigration herangezogen werden. Abschließend soll diskutiert werden, ob die Ena/VASP-EVH1-Domäne über Potential als pharmakologisches Ziel in der Metastasierungsinhibition verfügt.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die hier verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Carl Roth, Sigma-Aldrich oder Invitrogen bezogen. Ihre Reinheit betrug mindestens 99%.

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, Puffer und Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt, soweit sie nicht gebrauchsfertig und steril erworben wurden. Ihre jeweilige Zusammensetzung ist unter den einzelnen Punkten beschrieben. Alle angesetzten Lösungen wurden entweder bei 120°C und einem Druck von zwei Bar 20 Minuten lang autoklaviert oder durch einen Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert.

2.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
für die Molekularbiologie	
T4 DNA-Ligase	NEB
Alkalische Phosphatase	NEB
KOD <i>Hot Start</i> DNA-Polymerase	Merck
BamHI	Fermentas
NotI	Fermentas
für die Biochemie	
Thrombin	Merck
Trypsin	Promega
für die Zellkultur	
Trypsin / EDTA	Biochrom

Tab. 2.1 Liste der verwendeten Enzyme

2.1.4 Reaktionschemikaliensätze

Reaktionschemikaliensätze, so genannte Kits, standen für die Aufreinigung von PCR-Fragmenten sowie von Plasmid-DNA als auch für die DNA-Extraktion aus Agarosegelen von den Firmen Fermentas, Invitrogen und Qiagen zur Verfügung.

2.1.5 Vektoren

Zur Expression der EVH1-Domänen wurde der Vektor pGEX-4T-1 von Clontech verwendet. Er ist ausgestattet mit codierenden Sequenzen für eine N-terminale Glutathion (S)-Transferase (GST) gefolgt von einer 30

Thrombin-schnittstelle zwischen GST und dem einzuführenden Protein. Der Vektor enthält ein Resistenzgen für Ampicillin.

2.1.6 Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz 5'-3'	Anmerkung
1	EnaH_fw	TTTTTGGATCCATGAGTGAACAG AGTATCTGTCAG	EnaH-EVH1-Domäne: von AS 1; <u>Bam</u> HI-Schnittstelle; Forwärtsprimer
2	EnaH_rev	TTTTTTTTTGGCGCCGCTCATAA CACTTCTAAGGCATGCATCATGG	EnaH-EVH1-Domäne: bis AS 112; <u>Not</u> I-Schnittstelle; Rückwärtsprimer
3	EVL_fw	GAAAGGGATCCATGGCCACAAG TGAACAGAGTATC	EVL-EVH1-Domäne: von AS 1; <u>Bam</u> HI-Schnittstelle; Forwärtsprimer
4	EVL_rev	TTTTTGGCGCCGCTTACATGATG TTCAGGGCAAACAGC	EVL-EVH1-Domäne: bis AS 115; <u>Not</u> I-Schnittstelle; Rückwärtsprimer

Tab. 2.2 Liste der Oligonukleotide

2.1.7 DNA-Konstrukte

* Konstrukt von Dr. Anne Diehl (AG Oschkinat, FMP)

Protein	Swissprot ID	Aminosäuren	Bezeichnung	Vector	Primer
EnaH	Q8N8S7	1-112	GST-EnaH-EVH1	pGEX-4T-1	1/2
EVL	Q9UI08	1-115	GST-EVL-EVH1	pGEX-4T-1	3/4
VASP	P50552	1-113	GST-VASP-EVH1	pGEX-4T-1	*

Tab. 2.3 Liste verwendeter Proteine

2.1.8 Organismen

Bakterienstämme

E. coli BL21(DE3)

Dieser Stamm, bezogen von Stratagene, wurde für die Produktion von Proteinen genutzt. Er besitzt den Genotyp: F- ompT gal [dcm] hsd SB (r-B m-B) λ -Prophage DE3 T7 RNA-Polymerase.

E. coli XL1-Blue

Für die Produktion von DNA wurde der Stamm XL1-Blue genutzt. Er wurde von Stratagene bezogen und besitzt den Genotyp: F'::Tn10 proA9+B+ lacIq Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17 (r-k m+k) glnV44 relA1 lac.

Eukaryotische Zelllinien

HCT-116

HCT-116 (CCL-247) ist eine humane, kolorektale Karzinomzelllinie aus einem erwachsenen Mann.

MDA-MB-231

MDA-MB-231 (HTB-26) ist eine humane Mammakarzinomzelllinie aus einer Metastase in einem Pleuraerguss einer 51jährigen Frau.

Beide Zelllinien wurden von ATCC bezogen.

2.1.9 Antikörper und Zellfarbstoffe

	Nr.	Firma	Western Blot	Immuno- fluoreszenz
Primärantikörper				
<i>goat</i> -anti-ZO1	C-19	scbt	-	1:500
<i>goat</i> -anti-Zyxin	N-19	scbt	1:1000	1:1000
<i>mouse</i> -anti-ZO1	ZO1-1A12	zymed Invitrogen	-	1:500
<i>mouse</i> -anti-EVL	C-12	scbt	1:1000	-
<i>mouse</i> -anti-VASP	IE273	Immuno Globe	1:1000	1:1000
<i>rabbit</i> -anti-EnaH	D33C1	Cellsignaling	1:1000	-
<i>rabbit</i> -anti-GST	Z5	scbt	1:1000	-
<i>rabbit</i> -anti-RAPH1	H-150	scbt	1:1000	1:1000
<i>rabbit</i> -anti-WAVE2	D2C8	Cellsignaling	-	1:50
Sekundärantikörper				
Anti- <i>goat</i> IgG (H+L) Alexa 555	A21432	Invitrogen	-	1:1000
Anti- <i>mouse</i> IgG Fab2 Alexa 647	4410	Cellsignaling	-	1:1000
Anti- <i>rabbit</i> IgG Fab2 Alexa 488	4412	Cellsignaling	-	1:1000
Anti- <i>goat</i> IRDye800	32214	Li-COR	1:50000	-
Anti- <i>mouse</i> IRDye800	32212	Li-COR	1:50000	-
Anti- <i>rabbit</i> IRDye800	32213	Li-COR	1:50000	-
Zellfarbstoffe				
Hoechst 33258	33258	Invitrogen	-	2µg/ml
Phalloidin-Rhodamin	R415	Invitrogen	-	0,5U/cm ²
CF 405 Phalloidin	00034	Biotium.	-	0,5U/cm ²

Tab. 2.4 Liste der verwendeten Antikörper und Zellfarbstoffe

2.1.10 Inhibitoren

Die Inhibitoren LY 294002 und PF-573 228 wurden von scbt bezogen und wiesen eine Reinheit von über 98% auf. In Kooperation mit Prof. Dr. H.-G. Schmalz von der Universität zu Köln und der Gruppe von Dr. R. Volkmer am FMP wurden sowohl die EVH1-Inhibitoren **1** und **2** sowie deren Variationen **1b** bis **1d** und **2b** als auch die fluoreszenzfarbstoffmarkierten Verbindungen NBD-**1** und NBD-**1b** synthetisiert. Diese Verbindungen wiesen eine Reinheit von über 90% aus.

2.1.11 Peptide

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Peptiden handelt es sich um Ac-SEDNLPPPPAEFS-NH₂ aus WAVE2 und Ac-SDFPPPPPETEL-NH₂ aus RAPH1. Beide wurden von Dr. R. Volkmer synthetisiert und wiesen eine Reinheit von über 95% auf.

2.1.12 Isotope

Das in dieser Arbeit verwendete, ¹⁸O-markierte Wasser (H₂¹⁸O) wies eine Reinheit von mehr als 97% (w/v) auf und wurde von der Firma Campro Scientific bezogen.

2.1.13 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschränke	
BD53	Binder
CO ₂ -Präzisionsinkubator CB150	Binder

Chromatographiesysteme

ÄKTApurifier™ 10	GE
Profinia™ Protein Purification System	Bio-Rad
HPLC-System LC-Net II/ADC	Jasco

Chromatographiesäulen

HiLoad 16/60 Superdex 75	GE
Bio-Scale™ Mini Profinity™ GST Cartridge, 5ml	Bio-Rad
reversed-phase Säule (ProntoSIL™ 300A, 0.5 µm, 18C)	Bischoff Chromatography

Elektroporationsgerät

Elektroporator Gene Pulser X cell™	Bio-Rad
------------------------------------	---------

Elektrophoresesysteme

Netzanschlussgerät PowerPac™ basic	Bio-Rad
Agarosegelkammern mit Gelschlitten und Kämmen	Peqlab
mini PROTEAN™ Tetra Cell™ SDS-Gelsystem mit Blottmodul	Bio-Rad
Fluoreszenzplattenleser Sapphire II	Tecan
French™ Press	SLMAminco
Heitzblock	Stuart Scientific
ITC200	MicroCal
Lyophilisator alpha 2-4 LD plus	Christ

Massenspektrometriesystem

LTQ Orbitrap XL™	Thermo Fisher
mit Eksigent™ NanoLC-Ultra™ Liquid Chromatographie (LC)-Anlage	Axel Semrau GmbH
und PepMap™ 300 C18 75/15 reversed-phase Säule	Thermo Scientific

Mikroskope

Satz I

Nikon *eclipse* TS 100

mit Phasenkontrastring ELWD 0.3 T1-SNCP,

Digitaler Kamera DS-Vi1 mit *Controller* DS-L2

und dem Objektiv 10x/0.25 Ph1 ADL.

Nikon

Satz II

Nikon *eclipse* Ti

Nikon

mit sCMOS Kamera (Neo),

Andor

Halogen-Metaldampf-Lampe (Lumen 200),

Prior

Shutter (NI-SH-CON),

Nikon

dem Objektiv Nikon Plan Flour 10x/0.30

Nikon

und ImageJ-basierter *Micromanager*-Software.

Plus Gehäuse mit Temperatureinheit
(H201-T-Unit mit *Air Heater*),

Begasungsvorrichtung mit *CO₂-Controller*
(CO₂-Unit-BL),

Pumpe (*Air Pump*-BL) und begasbarer Kammer
(H201-K-Frame)

sowie Bedieneinheit (*oko-Touch*) und *Smart Box*

okolabs

Satz III

Konfokales *Laser Scanning* Mikroskop LSM 710

mit dem Objektiv Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil
DIC M27

und der ZEN 2010 Software.

Carl Zeiss Jena

Osdysey Infrarotimager

Li-COR

PCR-Gerät *GeneTouch*TM

BioER

pH-Meter

pH-Meter CG-840	Schott
Mit Elektrode InLab Expert	Mettler Toledo
pH-Meter <i>sever easy</i>	Mettler Toledo
Mit Elektrode InLab Ultra-Micro	Mettler Toledo

Schüttler

Schüttelinkubator Multitron	Infors
Schüttler DRS-12	neoLab
Thermoschüttler CHB-202	BioER
<i>SpeedVac</i> System SPD 1010	Thermo Servant
Spektrophotometer <i>NanoDrop</i> TM ND-1000	Thermo
UV/Vis Spektrophotometer UV mini 1240	Shimadzu
UV-System mit digitaler Kamera	INTRAS
Wasserbad WB-7	Memmert
Ultraschallgerät <i>Digital Sonifier</i> [®] UNITS Model W-250D	Branson Sonifier

Waagen

Präzisionswaage TP-214	Denver Instruments
Feinwaage Mettler AT21 <i>Comparator</i>	Mettler Toledo
Zellzähler TC20	Bio-Rad

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf
Tischzentrifuge 5810R	Eppendorf
Standzentrifuge Avanti TM J-25	Beckmann

2.1.14 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
<i>Micro Bio-Spin 30 Columns</i>	Bio-Rad
Nitrocellulose Membran, 0.45 µm	Bio-Rad
<i>Glutathione Sepharose 4B™</i>	GE
Vivaspin mit 5 und 10 kDa Ausschlussgrenze	Satorius

Zellkulturware

Cellstar® 6-Well Platte	greiner bio-one
Cellstar® T75 Zellkulturflasche mit Sterilfilterkappe	greiner bio-one
Corning® cellBIND® 96-Well Platten, schwarz, klarer Boden	Corning
Corning® Matrigel® <i>Invasion Chamber</i> , 24-Well; 8.0 Micron	Corning
Deckgläser	VWR
µ-Slide 8-Well Kammern und µ-Slide Chemotaxis ^{3D} -Slides	ibidi
weitere Kunststoff- und Glasmaterialien	VWR / Sarstedt

2.1.15 Wissenschaftliche Software und Datenbanken

Programme / Datenbanken	Hersteller / Referenz
<i>CellMiner</i>	http://discover.nci.nih.gov/cellminer/
<i>Chemotaxis and Migration Tool</i>	http://www.ibidi.de/applications/ap_chemo.html
<i>ExPASy ProtParam tool</i>	http://web.expasy.org/protparam/ (Wilkins et al. 1999)
ImageJ	National Institutes of Health (NIH)
<i>Mascot Distiller</i>	Matrix Science Ltd.
<i>MaxQuant</i>	(Cox et al. 2008)

Odyssey 2.0	LI-COR Biosciences
R	https://www.R-project.org
rITC (basiert auf R)	Script von Dr. Robert Opitz
Sigma Plot 11	Systat Software
Uniprot	http://www.uniprot.org/
ZEN 2010	Carl Zeiss Jena

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierung von *EnaH*- und *EVL-EVHI*

Bei der Klonierung der beiden EVHI-Domänen wurden die für sie codierenden cDNA-Abschnitte aus einer cDNA-Bibliothek mittels Polymeraseketten-Reaktion (PCR) und spezifischer Primer herausamplifiziert. Durch das Design der Primer wurden flankierende Restriktionsendonuklease-Schnittstellen in die DNA-Abschnitte eingefügt, welche es ermöglichten, sie in einen Vektor hineinzuligieren.

2.2.1.1 Amplifizierung der *EVHI* aus einer cDNA-Bibliothek mittels PCR

Die codierende cDNA für *EnaH*- (1-112) und *EVL-EVHI* (1-115) wurde mit spezifischen Primern (Tab. 2.2) aus der Lungen-cDNA-Bibliothek (*Quick Screen Human cDNA library panel*, Clontech; Geschenk von Dr. Anne Diehl) mittels PCR herausamplifiziert.

Die erhaltenen Fragmente wurden im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt, die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.1.2 Restriktionsendonuklease-Verdau

Sowohl die erhaltenen Fragmente aus der PCR als auch die Vektoren, in welche die *EVHI* kloniert werden sollten, wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (BamHI und NotI, *Fast Digest*, Fermentas) bei 37°C binnen zwei Stunden geschnitten. Im Falle des Vektors schloss sich ein Dephosphorylierungsschritt durch Zugabe von einem µl CIP (1U/µl *Calf Intestinal Phospahtase*) 30 Minuten vor dem Ende der Restriktion an. Die Aufreinigung erfolgte über das *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) für das PCR-Fragment und via Agarosegelelektrophorese mit anschließender Extraktion aus dem Gel (*QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen) jeweils nach Herstellerangaben.

2.2.1.3 Ligation

Nach dem Restriktionsverdau schloss sich die Ligation an. Das PCR-Fragment und der Vektor wurden im Verhältnis fünf zu eins (w/w) vereint und mit der T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C nach Herstellerangaben ligiert.

2.2.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurde das Verfahren der Elektroporation angewendet. Hierzu muss sichergestellt sein, dass die DNA-Proben frei von elektrisch leitfähigen Komponenten sind. Dazu wurde eine Aufreinigung der DNA mittels *Micro Bio-Spin* 30 Säulen (Bio-Rad) vorgenommen. Etwa 100 ng DNA oder der komplette Ligationsansatz wurden mit 50 µl elektrokompeterer Bakterien vermischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, Bio-Rad) überführt. Am *Gene Pulser X cell* (Bio-Rad) erfolgte die Elektroporation mit folgenden Einstellungen:

Spannung:	1800 V
Widerstand:	200 Ω
Kapazität	25 µF

Direkt nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 1 ml Medium (2YT) aufgenommen und eine Stunde lang bei 37°C schüttelnd inkubiert, bevor der gesamte Ansatz auf einer Agaroseplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert wurde. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C.

2.2.3 Plasmid-DNA-Extraktion

Zur Plasmid-DNA-Produktion wurde eine Einzelkolonie von einer Agaroseplatte in 5 ml (für eine Minipräparation) oder 150 ml (für eine Midipräparation) Medium (2YT) inokuliert. Das Medium enthielt 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion der plasmidtragenden Bakterien. Die Kultur wuchs schüttelnd bei 37°C über Nacht. Die Zellen wurden durch einen Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 16000 x g und 4°C) pelletiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-Präparation erfolgte aus den Pellets mittels

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) oder *PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit* (Invitrogen) jeweils nach Herstellerangaben.

2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzvalidierung der Konstrukte erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Je drei Klone wurden zur Sequenzierung gegeben.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte über die Absorption bei 260 nm Wellenlänge am *NanoDrop* (Thermo Fisher).

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung der DNA nach ihrer Größe wurden Gele mit 0,7% (w/v) Agarose bei großer DNA wie Vektoren und mit 1,5% (w/v) bei kleiner DNA wie den PCR-Produkten verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und im Anschluss mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelschlitten gegossen. Nach dem Erhärten des Gels wurde der Schlitten horizontal in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit TAE-Puffer befüllt. Der Einsatz von Kämmen erzeugt nach ihrer Entfernung Taschen, in welche DNA-Proben, versetzt mit 1/10 ihres Volumens an Probenpuffer, pipettiert wurden. Zum späteren Abschätzen der Fragmentgrößen wurden Größenstandards (100bp *ladder*, 1kbp *ladder*; NEB) parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 100-140 V 45-90 Minuten. Mittels dem DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid konnten die DNA-Banden im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht werden.

TAE-Puffer

2,5 mM Tris, 0,1 % (v/v) Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.2.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Ein frischer, kein Plasmid enthaltender Einzelklon des *E. coli*-Stammes wurde in 50 ml 2YT-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden 5 ml auf 500 ml Medium verdünnt und die Kultur weiter inkubiert bis zu einer optischen Dichte von maximal $OD_{600} = 0,5$. Der Stamm BL21 wuchs komplett ohne Antibiotikum, XL1-Blue in Anwesenheit von Tetracyclin. Die Kultur wurde sofort im Eisbad auf 4°C abgekühlt und bei 1000 x g und 4°C pelletiert. Das weitere Arbeiten erfolgte mit eisgekühlten Lösungen und Geräten. Das Pellet wurde vorsichtig in 200 ml sterilem und salzfreiem Wasser resuspendiert und erneut bei 1000 x g bei 4°C pelletiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach erfolgte die Resuspendierung in 25 ml 10% Glycerol (v/v) in Wasser mit erneutem Pelletieren und Resuspendieren in 10% Glycerol (v/v) auf ein finales Volumen von 1 ml. Diese Suspension wurde zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.8 Bakterienkultivierung

Zwei verschiedene Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit verwendet. Zum einen *E. coli* XL1-Blue zur Herstellung von Plasmid-DNA zum anderen *E. coli* BL21 (DE3) zur Expression von Proteinen. Beide Stämme wuchsen in 2YT-Medium bei 37°C schüttelnd bei 200 rpm. Ampicillin in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml im Medium fand Anwendung bei Bakterien die das Pladmid pGEX-4T-1 enthielten.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression und Aufreinigung

2.3.1.1 Expression

Die in pGEX-4T-1 (Contech) klonierten Konstrukte wurden in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (siehe Transformation von *E. coli*) und ein Einzelklon in 50 ml 2YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin als Starterkultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Liter 2YT-Medium mit dem Antibiotikum wurde dann durch eine 1:100-Verdünnung aus der Starterkultur inokuliert und wachsen gelassen bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$. Im Eisbad wurde die Kultur dann schnell abgekühlt und sodann mit weiteren 100 µg/ml Ampicillin versetzt sowie die Proteinexpression mit 150µM IPTG induziert. Über Nacht bei 18°C erfolgte die Expression der gewünschten Proteine. Durch Zentrifugation bei 18600 x g bei 4°C wurden die Bakterien pelletiert und bei -80°C gelagert.

2YT-Medium

16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0

2.3.1.2 Lyse der Bakterien

Das aus der Expression erhaltene Zellpellet wurde in 20 ml 1 x Profinia Lyse-, Equilibrierungs- und Waschpuffer (siehe 2.3.1.3) resuspendiert und zusätzlich mit zwei *Complete Protease Inhibitor Cocktail*-Tabletten (Roche) versetzt. Am Ultraschallgerät (*Branson Sonifier W-250D*) wurden die Bakterien durch 10-minütiges Beschallen bei einer Amplitude von 20% und einer kontrollierten Maximaltemperatur von 15°C im Eisbad aufgeschlossen. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 15557 x g bei 4°C vom proteinhaltigen Überstand abgetrennt. Mit der Sterilfiltration des Lysates (0,22 µm Filter) endete die Herstellung des Lysates, welches umgehend zur Aufreinigung genutzt wurde.

2.3.1.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde die Anlage *Profinia* (Bio-Rad) und die 5 ml *Bio-Scale™ Mini Profinity™-GST-Säule* mit *Glutathione-Sepharose-Matrix* (Bio-Rad) verwendet. Nach der Standardmethode des Herstellers wurden die Proteine bei 4°C aufgereinigt. Das Eluat wurde im Anschluss einem zweiten Reinigungsschritt (Größenausschlusschromatographie) unterzogen.

2x Profinia GST Lyse-, Equilibrierungs- und Waschpuffer

300 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 10 mM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,4

2x Profinia GST Elutionspuffer

40 mM Gluthation, 200 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0

2.3.1.4 Abspalten des Markers GST mittels Thrombin

Um EVH1-Domänen ohne GST-Marker zu erhalten, wurde dieser mittels 1 U Thrombin (Merck) pro mg Protein bei 27°C über Nacht abgespalten. Eventuell aufgetretenes Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 15000 x g bei 4°C entfernt.

2.3.1.5 Aufkonzentrieren von Proteinen

Vor und nach der Größenausschlusschromatographie mussten die Proteine in ihren Lösungen aufkonzentriert werden. Zum einen weil das Säulenmaterial mit maximal 5 ml zu beladen war und zum anderen weil nach der Aufreinigung eine gewisse Mindestkonzentration erreicht werden sollte. Zum Einsatz kamen hier die Ultrafiltrations-Konzentratoren *Vivaspin* (Satorius) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa für GST-Fusionsproteine bzw. 5 kDa für die EVH1-Domänen allein. Die Aufkonzentration erfolgte bei 20°C nach Herstellerangaben.

2.3.1.6 Größenausschlusschromatographie

Mittels Größenausschlusschromatographie wurden die Proteine in ihrem Reinheitsgrad erhöht und zugleich in einen anderen Puffer überführt. Hierzu wurde die Anlage *ÄKTApurifier 10* (GE) und die Säule *16/60 Superdex™ 75* (GE) verwendet. Das maximale Ladevolumen dieser Säule beträgt 5 ml. Sie lief mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und dem EVH1-Puffer als Laufmittel. Fraktionen wurden zu je 1 ml gesammelt. Die Extinktion bei 280 nm wurden über die Zeit gemessen und im Chromatogramm dargestellt. Proteinenthaltende Fraktionen wurden im Anschluss an den Lauf mittels SDS-PAGE auf Zielproteine und deren Reinheit geprüft, vereint und aufkonzentriert. Gereinigte Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

EVH1-Puffer

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM TCEP, pH 7,4

2.3.2 Auftauen und Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die bei -80°C gelagerten Protein-Aliquots wurden schnell durch Handwärme aufgetaut und danach bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Die genaue Proteinkonzentrationsbestimmung im Überstand erfolgte am UV/VIS-Photospektrometer (UV mini 1240, Shimadzu) bei 280 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Die Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden mit dem *ProtParam tool* von *ExpASy* (<http://web.expasy.org/protparam/>) berechnet.

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde in Kammern (*TetraCell™*, Bio-Rad) durchgeführt, in denen ein oder zwei Gele pro Schlitten eingespannt werden können. Die Kammer wurde nach Herstellerangaben mit Elektrodenpuffer gefüllt und die Proben in die vorgesehenen Taschen pipettiert. Vorbereitend dazu wurde eine Probe 1:2 mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 Minuten lang bei 95°C inkubiert. Als Größenstandard wurde der Marker (*PageRuler*

Prestained Protein Ladder, Thermo) mit auf das Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung der Gele ist in der Tabelle 2.5 gezeigt.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 26 mA (bei zwei Gelen 52 mA) für etwa 35 Minuten. Im Anschluss wurde das Gel fixiert und gefärbt.

Komponente	Sammelgel	Trenngel	Trenngel
	5%	10%	15%
H ₂ O	1,4 ml	1,9 ml	1,1 ml
30% Acrylamid-Mix	330 µl	1,7 ml	2,5 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml
1M Tris, pH 6,8	250 µl	-	-
10% SDS	20 µl	50 µl	50 µl
10% (w/v) APS	20 µl	50 µl	50 µl
TEMED	2 µl	2 ml	2 µl

Tab. 2.5 Zusammensetzung von SDS-Gelen

30% Acrylamid-Mix

Acrylamid: Bisacrylamid (37,5:1)

2 x SDS-Probenpuffer

6,25 mM Tris-HCl, 25% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Bromphenolblau, 715 mM 2-Mercaptoethanol, pH 6,8

Elektrodenpuffer

3,03 g Trisbase, 14,4 g Glycin, 1 g SDS, *ad* 1l H₂O

2.3.3.1 Fixierung, Färbung, Aufnahme

Das Fixieren und Färben der Proteine im Gel wurde in einem Schritt durchgeführt. Nur beim Western Blot wurde darauf verzichtet, da die im Gel enthaltenen Proteine auf eine Membran überführt werden sollen. Das Gel wurde in der Fixier- und Färbelösung aufgekocht und circa 5 Minuten schwenkend inkubiert. Danach wurde das überschüssige Coomassie aus dem Gel entfernt, indem es mit Entfärbelösung aufgekocht und schwenkend 10 Minuten inkubiert wurde. Dieser Entfärbeprozess wurde insgesamt drei Mal

durchgeführt und das Gel danach in der Gelstation mit Kamera (Intras) abfotografiert.

Fixier- und Färbelösung

170 mM Essigsäure, 50% (v/v) Methanol, 0,25% (w/v) Coomassie R-250 in *aqua bidest.*

Entfärbelösung:

170 mM Essigsäure, 30% (v/v) Methanol in *Aqua bidest.*

2.3.4 Pulldown-Versuche

Im Pulldown-Versuch wurden die GST-markierten EVH1-Domänen an eine Glutathionsepharose-Matrix gebunden und aus einem nativen Zelllysate die Bindungspartner der EVH1-Domänen gezogen, bzw. wurde versucht, diese wieder mit dem EVH1-Inhibitor *I* zu verdrängen. Hierzu wurde die Matrix (*Glutathione- Sepharose 4b*, GE) drei Mal mit Ladepuffer gewaschen und danach mit den Proteinen beladen. Zu jeweils 10 µl der Matrix wurden 500 nmol der Proteine GST, GST-EnaH-EVH1, GST-VASP-EVH1 und GST-EVL-EVH1 gegeben und diese eine Stunde lang bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem Lysepuffer wurde die beladene Matrix mit den Zelllysaten über Nacht bei 8°C rotierend inkubiert. Dabei wurden dem Lysat 0, 1, 10 oder 100 µM des Inhibitors *I* beigegeben. Die Lysate stammten von den Zelllinien HCT-116 mit 2,3 µg und von MDA-MB-231 mit 1,5 µg pro Ansatz. Die Matrix wurde im Anschluss drei Mal mit Lysepuffer gewaschen. Dazu wurde die Matrix mit Puffer resuspendiert, bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Eluieren der Proteine von der Matrix erfolgte durch Zugabe von 30 µl zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer und anschließendem Inkubieren bei 95°C für 5 Minuten. Die Analyse der gebundenen und wieder verdrängbaren Proteine im erhaltenen Überstand erfolgte zum einen mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot, beziehungsweise durch die ¹⁸O-Markierung und Vermessung in der Massenspektrometrie.

Ladepuffer

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM TCEP pH 7,4

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 0,25% (w/v) Natriumdeoxycholat, 0,1% (v/v) Triton-X-100, 1 Tablette *Complete Protease Inhibitor Cocktail* pro 10 ml

2.3.5 Western Blot

Zur immunologischen Charakterisierung von Proteinen werden beim Western Blot die Proteine aus einem Gel (SDS-PAGE) auf eine Membran übertragen und danach mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Das Übertragen wurde hier in einer Kammer mit Blotmodul (*TetraCell*TM, Bio-Rad) durchgeführt. Dabei wurde der Blot schichtweise aufgebaut, in einem Träger fixiert und in die Kammer mit Transferpuffer getaucht. Die Schichten wurden wie folgt aufgebaut:

Kathode

Schwamm

Whatmanpapier

Nitrocellulosemembran, 0,45 µm Porengröße

SDS-Gel

Whatmanpapier

Schwamm

Anode

Der Transfer lief bei konstant 100 V unter Kühlung der Kammer für 60 Minuten. Zur Kühlung wurde ein Eisakku aus dem -20°C Tiefkühlschrank in die Kammer mit eingesetzt und der Puffer mit meinem Rührfisch und Magnetrührer um diesen Akku umspült. Nach dem Übertragen der Proteine wird die Membran aus der Apparatur entfernt und in einer Blotschale drei Mal mit TBS-T gewaschen, bevor mit Blockierpuffer unbesetzte Proteinbindungs-

stellen auf der Membran besetzt wurden. Das Blockieren fand bei Raumtemperatur für 30 Minuten statt.

In einem weiteren Schritt wurden die Zielproteine mittels spezifischer Antikörper markiert. Dazu wurde die Membran mit den Primärantikörpern in Blockierpuffer versetzt (Tab. 2.4) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden im Anschluss heruntergewaschen, bevor die spezifischen Antikörper mit sekundären Antikörpern (Tab. 2.4) sichtbar gemacht werden konnten, da diese an Farbstoffe gekoppelt sind. Sekundäre Antikörper (IRDye800, Li-COR) wurden 1:50000 in Blockierpuffer verdünnt und inkubierten auf der Membran im Dunkeln für 45 Minuten. Nach erneutem Waschen konnte die Membran gescannt werden (ODYSSEY Infrarotscanner, Li-COR).

Transferpuffer

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20% (v/v) Methanol, pH 9

TBS-T

20 mM Tris, 150mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween-20, pH 8,0

Blockierpuffer

5 % (w/v) Magermilchpulver (Roth) in TBS-T

2.3.6 Tryptischer Verdau und ¹⁸O-Markierung von Proteinen

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte und mit Coomassie angefärbte Proteinbanden wurden parallel aus der Kontroll- und Probenbande im Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und für den tryptischen Verdau vorbereitet.

Dazu wurde durch abwechselndes Waschen mit Puffer A und B für jeweils 10 Minuten bei 30°C und 300 rpm das Coomassie aus den Banden entfernt. Gefolgt von einer Behandlung mit Acetonitril wurden die Gelstücke dehydriert. In einer Vakuumzentrifuge (*SpeedVac* System SPD 1010, Thermo Servant) erfolgte die vollkommene Trocknung der Gelstücke. Der enzymatische Verdau der Proteine zu Peptiden erfolgte durch die Rehydratisierung der Gelstücke mit 50 ng Trypsin (*sequencing grade modified*,

Promega) in 10 µl einer 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung und Inkubation bei 37°C über Nacht.

Hierbei unterschied sich die Behandlung der Probe von jener der Kontrolle. Ein Ansatz wurde unter Verwendung von ¹⁸O-markiertem Wasser (97% (w/v) ¹⁸O, Campro Scientific), der andere mit ¹⁶O-Wasser tryptisch verdaut. Hierbei entstehen aus gleichen Proteinen identische Peptidsequenzen mit Unterschieden in ihrer Masse.

Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von je 10 µl 0,5% TFA (v/v) in Acetonitril. Gleichzeitig wurden so die Gelstücke dehydriert. Der Überstand wurde dann aus ¹⁶O und ¹⁸O behandeltem Ansatz vereint, in ein Probengefäß überführt und in der Vakuumzentrifuge (*SpeedVac* System SPD 1010, Thermo Servant) getrocknet. Durch Zugabe von je 6 µl 0,1% (v/v) TFA in Wasser mit 5% (v/v) Acetonitril und kurzer Behandlung im Ultraschallbad (Sonorex RK31H, Bandelin) wurden die Peptide gelöst und massenspektrometrisch vermessen.

Puffer A

25 mM Ammoniumbicarbonat, 50% (v/v) Acetonitril

Puffer B

50 mM Ammoniumbicarbonat

2.3.7 Peptid-Spot-Arrays

Die Synthese der Peptid-Spots auf der Papiermembran wurde von Dr. Rudolf Volkmer bewerkstelligt. In einem ersten Schritt wurden die Membranen in 100% Ethanol 5 Minuten lang inkubiert und anschließend in TBS-T (siehe 2.3.5) gewaschen. Danach wurden sie in Blockierpuffer (siehe 2.3.5) für 2 Stunden geblockt. Der Interaktionspartner (je eine der drei EVH1-Domänen) wurde im Anschluss in einer Konzentration von 10 µg/ml in Blockierpuffer auf die Membranen gegeben und über Nacht schwenkend bei 4°C inkubiert. Ungebundenes Protein wurde daraufhin durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte immunologisch. Zunächst wurde der Primärantikörper Anti-GST in Blockierpuffer (siehe Tab. 2.4) für 1,5 Stunden inkubiert. Nach erneutem

dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper IRDye800 in Blockierpuffer für 45 Minuten. Nach abermaligem Waschen wurde der Sekundärantikörper am Infrarotsscanner (Odyssey, Li-COR) detektiert. Im Falle der Funktionalitätskontrolle der hergestellten Proteine wurde nach der Detektion ein weiterer Inkubationsschritt über Nacht bei 4°C mit der Verbindung *1* in Blockierpuffer angeschlossen. Darauf folgte die erneute Inkubation mit dem Sekundärantikörper und anschließende Detektion.

2.3.8 HPLC-Analyse von NBD-markierten Verbindungen in Zellen

Pro Kondition wurden auf je vier Deckgläser (Ø 24mm) in 6-Well-Platten 1 Mio. Zellen (HCT-116) eingesät und über Nacht angezogen. In einer großen, quadratischen Petrischale wurde ein Stück feuchtes Whatmanpapier gelegt, mit einem Streifen Parafilm bedeckt und vier Tropfen (je 100µl) RPMI-1640-Medium mit 50 µM der zu testenden Verbindung NBD-*Ib* auf den Parafilm geben. Die bewachsenen Deckgläser wurden aus der 6-Well-Platte entnommen und mit der bewachsenen Seite auf die Tropfen gelegt. Die Petrischale wurde verschlossen und im Brutschrank inkubiert. Nach den verschiedenen Inkubationszeiten (1, 5, 30 und 180 Minuten) wurden die Deckgläser vom Parafilm genommen, durch kurzes Eintauchen in PBS gewaschen und in eine neue 6-Well-Platte gegeben. Mit je 500 µl *aqua bidest.* wurden mit einem Zellschaber die Zellen vom Deckglas abgelöst und die Suspension auf zwei Eppendorfgefäße (*LowBind*, Eppendorf) überführt. Die Zellsuspensionen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (1min bei 10% Amplitude, 4°C), die Lysate (Überstand und Pellet) tiefgefroren und über Nacht lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden dann in DMSO resuspendiert (je 500 µl pro Eppendorfgefäß), abzentrifugiert und der Überstand aus den beiden Eppendorfgefäßen pro Kondition in ein neues Eppendorfgefäß überführt, tiefgefroren und erneut über Nacht lyophilisiert. Diese Lyophilisate wurden erneut in DMSO resuspendiert (50 µl), zentrifugiert und der Überstand in ein HPLC-Gefäß überführt. Die Analyse in 4 µl erfolgte an der HPLC (LC-Net II/ADC, *Detector* FP-2020Plus mit Pumpe PU-2089Plus und *Autosampler* AS-2057Plus; Jasco) mit einer *reversed-phase*-Säule (ProntoSIL 300A, 0.5 µm, 18C; Bischoff Chromatography). Die Detektion der NBD-Fluoreszenz

erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und 520 nm Emission. Als Laufpuffer diente 0,1% TFA in *aqua bidest.* Zur Elution der NBD-Verbindungen wurde ein Gradient von 5% bis 95% Elutionspuffer (0,1% TFA, 80% Acetonitril in *aqua bidest.*) über 40 Minuten gewählt. Die Peak-Flächen wurden direkt an der HPLC-Software integriert und die Flächen in Excel ausgewertet. Die Fläche unter dem Peak der Verbindung mit freier Säure (NBD-*I*) wurde dabei ins Verhältnis gesetzt zur Fläche unter den Peaks der Verbindung mit Ethylester (NBD-*Ib*).

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4

2.4 Biophysikalische Methoden

2.4.1 Bestimmung von Bindungskonstanten mittels ITC

Mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) wurden die Bindungskonstanten von Peptiden an die EVH1-Domäne bestimmt. Die verwendeten Peptide sind von Dr. Rudolf Volkmer synthetisiert und aufgereinigt worden. Das Lösen der Peptide erfolgte in EVH1-Puffer (siehe 2.3.1.6) und das Einstellen des pH-Wertes mit NaOH in EVH1-Puffer am Mini-pH-Meter (Inlab micro). Die Konzentration wurde dabei über die Peptideinwaage bestimmt. An der ITC200-Maschine wurden die Messungen durchgeführt, wobei das jeweilige Peptid in das Protein titriert wurde. Dazu wurden in der Kammer 300 μ M VASP-EVH1 und in der Spritze das zu untersuchende Peptid, beide in EVH1-Puffer, vorgelegt. Das Peptid von RAPH1 wurde mit einer Konzentration von 3,6 mM und das WAVE2-Peptid mit 4,5 mM eingesetzt. Alle Lösungen wurden vor dem Experiment entgast. Die Messung erfolgte bei 25°C durch Injizieren von insgesamt 40 μ l der Peptidlösung in das Protein in 2,5 μ l Schritten. Die Auswertung erfolgte mit rITC, ein Programm geschrieben von Dr. R. Opitz.

2.4.2 ¹⁸O-Quantifizierung mittels Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine geeignete Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen in einem Gemisch. Die zu untersuchenden Proteingemische werden hierbei mittels Trypsin in Peptide gespalten (2.3.6). Trypsin spaltet eine Peptidkette nach den Aminosäuren Arginin und Lysin. Es entstehen aus einem Protein so Peptide mit klar definierten Massen. Dieses Massenmuster ist eine Art Fingerabdruck des Proteins und kann mit der Software *Mascot Daemon* für alle Proteine aus der *SwissProt*-Datenbank vorhergesagt werden. Aus einem Datensatz mit verschiedensten Peptidmassen können mit dieser Software die Peptidmassenmuster verschiedener Proteine eindeutigen Proteinen zugeordnet werden.

Soll das Proteom zweier Proben miteinander verglichen werden, so ist es möglich, die durch Trypsin generierten Peptide mit Isotopen zu markieren.

Eine Probe wird demnach in H_2^{16}O die andere in H_2^{18}O verdaut (2.3.6). Peptide mit identischer Sequenz besitzen somit unterschiedliche Massen. Nach Vereinen der Peptide und Messen der Massen kann identifiziert werden, welche Proteine in den beiden Proben existieren.

Neben dieser qualitativen Identifizierung ist zusätzlich auch eine quantitative Aussage möglich. Im Zuge der Massendetektion werden die Peptide zuvor ionisiert. Dies geschieht über das Einsprühen der Probe in ein starkes elektrisches Feld (Elektrospray-Ionisierung ESI). Mittels Vergleich der Ionenintensitäten eines jeden leichten und dazu korrespondierenden schweren Peptides erfolgt die Quantifizierung. Diese Art der Anreicherung wird mit der Software *Macot Distiller* bestimmt.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden von Dr. Michael Schümann (AG Krause, FMP) an einem LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher) mit einer Eksigent NanoLC-Ultra *Liquid* Chromatographie (LC)-Anlage (Axel Semrau GmbH) unter Verwendung einer PepMap 300 C18 75/15 *reversed-phase* Säule (Thermo Scientific) erhoben. Die Säule lief mit einem Gradienten von 0 bis 50% Acetonitril mit 0,1% TFA über 85 Minuten.

Zur Auswertung der Daten wurden bestimmte Schwellenwerte gesetzt. Die schwer/leicht-Ratio aus ^{16}O zu ^{18}O -markierten Peptiden musste kleiner gleich 0,4 sein; die Anzahl der Identifizierungen größer gleich 4 und die von *Mascot Distiller* ermittelte Standardabweichung $\text{SD}_{(\text{geo})}$ kleiner gleich 2.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien MDA-MB-231 (HTB-26) und HCT-116 (CCL-247) wurden von der Firma ATCC bezogen und in Kultur gebracht. Hierzu fand das Kulturmedium RPMI-1640 (VLE-RPMI-1640, Biochrom) mit folgenden Zusätzen Verwendung: fötales Kälberserum (*Fetal Bovine Serum*, Biochrom) 10%, stabiles Glutamin (L-Alanyl-L-Glutamin, Biochrom) 2 mM und Penicillin / Streptomycin 100 U/ml (Biochrom). Die Inkubation erfolgte im Brutschrank (Binder) bei 37°C und einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂. Zum Umsetzen der Zellen wurden diese zunächst mit PBS (PBS ohne Calcium und Magnesium, Biochrom) gewaschen und anschließend mittels tryptischem Verdau (0,05% Trypsin / 0,02% EDTA, Biochrom) vom Kulturflaschenboden (Zellkulturflaschen für adhärenzte Zellkultur mit Schräghals und Filter-Schraubverschluss, Greiner Bio One) abgelöst. Die Zellzählung erfolgte am automatisierten Zellzähler (TC20 mit *cell counting kit*, Bio-Rad).

2.5.2 Vitalitätsassay

In 96-Well-Zellkulturplatten (cellBIND®, schwarz mit klarem Boden, Corning) wurden je 20000 Zellen zusammen mit den verschiedenen zu testenden Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesät (drei Wells pro Kondition). Nach 24stündiger Inkubation wurden je Well 10 µl Resazurin-Lösung (*AlamarBlue*, Invitrogen) hinzupipettiert und nach weiterer dreistündiger Inkubation die Fluoreszenz (Anregung: 560 nm, Emission: 590 nm) gemessen (Saphire II, Tecan). Die Auswertung erfolgte in Excel (Mittelwert und Standardabweichung aus drei Datenpunkten).

2.5.3 Adhäsionsassay

In Zellkulturgefäßen (µ-Slide 8-Well mit *ibiTreat*-Oberfläche, ibidi) wurden je 100000 Zellen (MDA-MB-231) zusammen mit den zu testenden Verbindungen

eingesät. Nach 1,5-stündiger Inkubation wurden Zellen gewaschen, welche noch nicht adhären am Boden hafteten. Danach wurden fünf verschiedene Felder je Well am Mikroskop (Nikon *eclipse* TS 100) aufgenommen und ausgewertet. Hierzu wurden adhären Zellen gezählt. Die Kontrolle DMSO wurde auf 100% gesetzt. Die Auswertung erfolgte in Excel.

2.5.4 Immunfluoreszenzgefärbung und Zellmembranpermeabilitätsassay

Die Zellen (HCT-116 und MDA-MB-231) wurden in Zellkulturgefäße (μ -Slide 8-Well mit *ibiTreat*-Oberfläche, ibidi) eingesät. Dabei wurde eine Zellzahl gewählt, die etwa in einer 70%-igen (MDA) bzw. 50%-igen (HCT) Konfluenz resultiert. Nach circa 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden mit diesen Zellen die Versuche unternommen. Hierzu inkubierten die Zellen drei Stunden lang die Inhibitoren im RPMI-1640-Medium.

Im Falle des Zellmembranpermeabilitäts-Assays wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und ein Tropfen Trypanblau-Lösung (Biochrom) in ein Well gegeben. Direkt danach wurde am Mikroskop (LSM 710, Carl Zeiss) die Fluoreszenz von Trypanblau (angefärbte Zellmembran) und NBD (fluoreszenzmarkierte Inhibitoren in der Zelle) detektiert.

Zur Immunfluoreszenzgefärbung wurden die Zellen zunächst mit Fixierpuffer in 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. In einem weiteren Schritt wurden die Zellmembranen 5 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Permeabilisationspuffer behandelt, um sie für große Proteine wie Antikörper durchlässig zu machen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der Blockierpuffer auf die Zellen gegeben, welcher bei 37°C 20 Minuten inkubierte. Zur immunologischen Markierung der gewünschten Proteine wurden spezifische Antikörper in Blockierpuffer (siehe Tab. 2.4) auf die Zellen gegeben und bei 37°C 45 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS inkubierten die Zellen die entsprechenden Sekundär-Antikörper und ein Phalloidin (siehe Tab. 2.4) in Blockierpuffer für 45 Minuten bei 37°C, gefolgt von weiterem dreimaligem Waschen mit PBS. Falls erforderlich kam nun ein Kernfärbungsreagenz (Hoechst 33258, Invitrogen) für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen, gefolgt von zweimaligem Waschen mit PBS. In einem letzten Schritt wurde der PBS aus

den Wells abgenommen und die Zellen mit einem Mountingmedium (IMM ibidi *mounting medium*, ibidi) überschichtet. Die Lagerung der Präparate erfolgte im Dunkeln bei 4°C, bis die Aufnahmen am Mikroskop (LSM 710) getätigt wurden.

PBS

siehe 2.3.8

Fixierpuffer: Eine Ampulle (10 ml) para-Formaldehyd 8% in *aqua bidest.* (Science Services) mit 2 ml 10 x PBS und 8 ml entsalztes Reinstwasser.

Permeabilisationspuffer: 0,1% Triton-X 100 (Carl Roth) in PBS

Blockierpuffer: 300 µl Fischhautgelatine (*Gelatin from cold water fish skin* 45% in Wasser, Sigma-Aldrich) in 99,7 ml PBS.

2.5.5 Untersuchung der Zellgröße

Die Vermessung der Zellgröße erfolgte in ImageJ (NIH) an Aufnahmen aus der Fluoreszenzanfärbung. Die Auswertung der Daten erfolgte im Statistikprogramm R.

2.5.6 Invasionsassay

Zur Untersuchung der Invasivität wurde die Boyden-Kammer mit der extrazellulären Matrix Matrigel® und einer Membran mit 8 µm Porendurchmesser verwendet (Corning® Matrigel® *Invasion Chamber* 24-Well *Plate* 8.0 *Micron*, Corning). Die Durchführung lief nach Herstellerangaben mit 75000 MDA-MB-231-Zellen pro Well, 10% fötales Kälberserum (FBS, Biochrom) als Lockstoff, einer Inkubationszeit von 16 Stunden und den Verbindungen **1b**, **2b**, der Kontrollsubstanz und der Kontrolle DMSO. Angefärbt wurden die invadierten Zellen mit Kristallviolett (*Cell Stain Solution*, Cell Biolabs inc.) nach Herstellerangaben. Am Mikroskop (Nikon *eclipse* TS 100) wurden pro Well fünf Ausschnitte der Membran

aufgenommen, die Zellen gezählt und aus drei Replikaten der Mittelwert und die Standardabweichung mittels Excel berechnet. Die Kontrolle DMSO wurde auf 100% gesetzt.

2.5.7 Echtzeitbeobachtung der Migration

Der Versuch der Echtzeitbeobachtung der Migration erfolgte auf μ -Slide Chemotaxis^{3D}-Objektträgern (ibidi). Vorbereitung und Durchführung wurden nach Herstellerangaben bewerkstelligt. Dabei wurde der mittlere Kanal mit 10000 MDA-MB-231-Zellen befüllt und den Zellen 3 Stunden zum adhären gegeben. Die beiden Reservoirs für den Lockstoffgradienten enthielten RPMI-Medium mit 0 bzw. 10% FBS sowie die zu testenden Substanzen beidseits. Die Beobachtung erfolgte am Mikroskop (Nikon *eclipse* Ti) bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂. Dabei wurde alle 10 Minuten über einen Zeitraum von 12 Stunden von jedem Kanal ein Bild des Durchlichtkanals aufgenommen. Das *Tracking* der Zellen erfolgte dann mit ImageJ (NIH) und die graphische Darstellung und Auswertung der Daten mit der Software *Chemotaxis and Migration Tool* (ibidi).

2.5.8 Mikroskopeinstellungen bei den zellbiologischen Methoden

Bei der Immunfluoreszenzanfärbung und dem Zellmembranpermeabilitäts-Assay wurden am Mikroskop LSM 710 (Carl Zeiss) mehrere Kanäle in einem Präparat vermessen. Die Einstellungen dieser Kanäle zeigt die Tabelle 2.6. Die in den einzelnen Versuchen betrachteten Komponenten und die dazugehörigen Kanäle sind in der Tabelle 2.7 dargestellt.

Kanal	Laser (Anregung nm)	Filter (Emission nm)
1	Diode (405)	415-495
2	Argon (488)	491-535
3	DPSS (561)	566-631
4	Helium-Neon (633)	638-740

Tab. 2.6 Einstellungen für Anregung und Emission am LSM 710 Mikroskop

	Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		Versuch 4	
	Kanal		Kanal		Kanal		Kanal	
F-Aktin	1	-	1	Kern	1	-	1	
RAPH1	2	WAVE2	2	-	2	NBD	2	
Zyxin	3	F-Aktin	3	F- Aktin	3	Trypanblau	3	
VASP	4	VASP	4	ZO1	4	-	4	

Tab. 2.7 Verwendete Kanäle für die Anfärbungen in den einzelnen Experimenten

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Proteinpräparation

Am Anfang der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen steht die Herstellung der beteiligten Proteine. In den hier verwendeten Vektoren zur Proteinherstellung sind die EVH1-Domänen mit einem N-terminalen Marker, der Glutathion-(S)-Transferase (GST), versehen. Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Anfärbung untersucht und lag bei allen drei Proteinen bei über 90% (Abb. 3.1). In einem Western Blot sollten die Proteine charakterisiert werden. Mit Antikörpern, spezifisch für die jeweilige EVH1-Domäne, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den klonierten und aufgereinigten Proteinen tatsächlich um die gewünschten Domänen handelte (Abb. 3.2).

Die Funktionalität der Proteine wurde mittels einer Spot-Array-Analyse getestet. An dieser Stelle ist ein bekannter Binder der EVH1-Domänen, eine Peptidsequenz aus dem Oberflächenprotein ActA des Bakteriums *Listeria monocytogenes*, über den Linker β -Alanin auf einer Papiermatrix synthetisiert und diese so genannten Spots mit den jeweiligen EVH1-Domänen inkubiert worden. Gebundenes Protein wurde im Anschluss immunologisch über die

GST-Markierung identifiziert. Alle drei Domänen zeigen im Vergleich zur GST-Kontrolle eine Anreicherung an den Spots. Die Domänen sind somit funktional und erkennen ihr natürliches Epitop. In einem weiteren Schritt wurde versucht, die gebundenen EVH1-Domänen mit dem EVH1-Liganden *I* wieder von den Spots zu verdrängen (Abb. 3.3). Es stellte sich heraus, dass nur EnaH- und VASP-EVH1 von den Spots wieder verdrängt werden konnten. EVL-EVH1 wies nur eine geringe Verdrängbarkeit auf. Auch in den Pulldown-Experimenten (3.3 und 3.4) zeigte EVL-EVH1 keine identifizierbaren Mengen an Bindungspartnern.

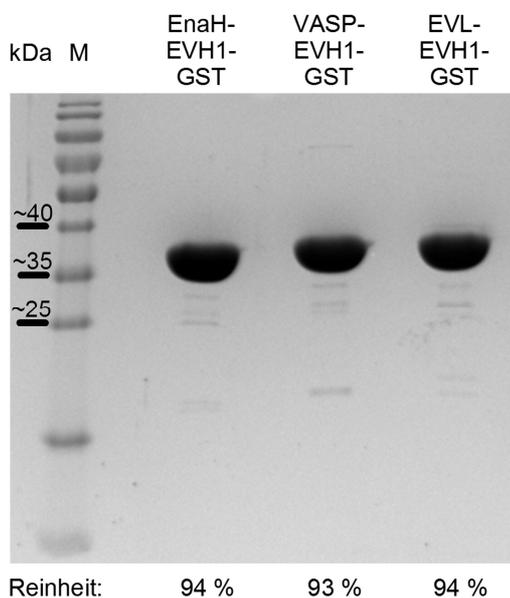


Abb. 3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der EVH1-Domänen.

Je 5 µg der Proteine wurde auf ein 15%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Als Marker (M) wurde der *prestained-Protein-Ladder* (Fermentas) aufgetragen. Die Berechnung der Reinheit erfolgte durch die Software ImageJ.

Abb. 3.2 Western Blot-Analyse der EVH1-Domänen

Je 5 µg der Proteine wurde auf ein 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Als Marker (M) wurde der *prestained-Protein-Ladder* (Fermentas) aufgetragen. Die EVH1-GST-Domänen wurden jeweils mit einem spezifischen Antikörper immunologisch nachgewiesen (A). Der Nachweis mittels eines Antikörpers gegen GST diente als Kontrolle (B).

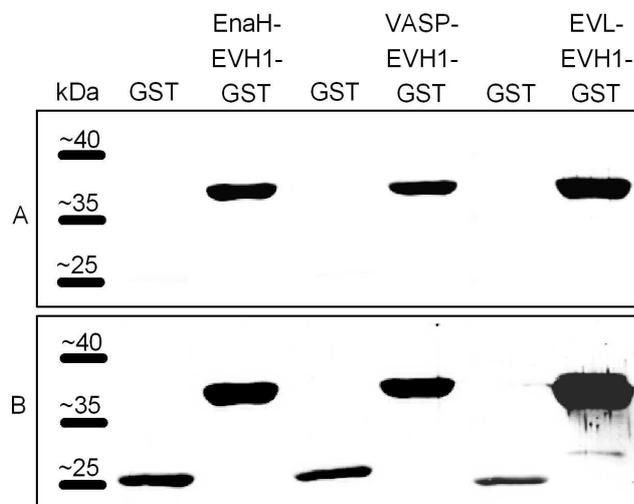
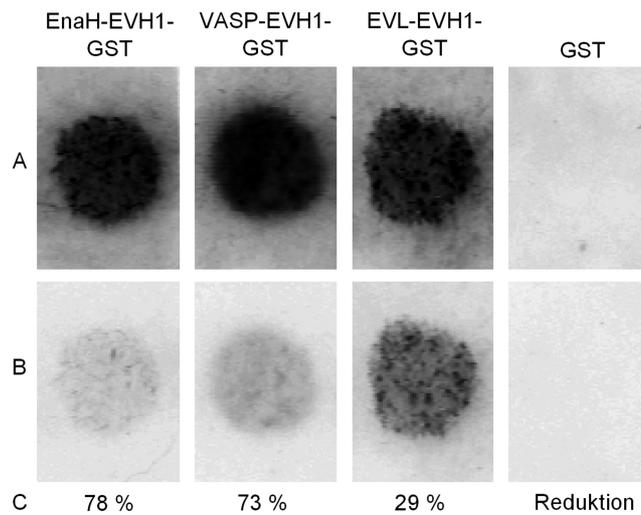


Abb. 3.3 Spot-Array-Analyse der EVH1-Domänen

ActA-Peptid-Spots: SFEFPPPP-TEDEL- β -Alanin. Die jeweiligen GST-markierten EVH1-Domänen wurden darauf inkubiert und immunologisch detektiert (A). Danach inkubierten die Spots 100 μ M Ligand *I* über Nacht bei 4° C und die verbliebenen Domänen wurden erneut immunologisch detektiert (B). Die Reduktion der gemessenen Intensität der Spots



durch den Liganden *I* ist in (C) angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels ODYSSEY-Software. GST allein diente als Kontrolle.

3.2 Auswahl geeigneter Zelllinien

Es ist bekannt, dass Ena/VASP-Proteine in den fokalen Adhäsionspunkten mit dem Protein Zyxin und in der Leitfront von migrierenden Zellen mit dem Protein RAPH1 kolokalisiert sind (Reinhard et. al. 1995; Krause et. al. 2004). Zyxin ist an der Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten beteiligt, RAPH1 ist an der Protrusion von Lamellipodien und damit an der Migration der Zelle beteiligt. In der Abbildung 3.4 sind die Häufigkeiten der Expressionsintensitäten dieser beiden Proteine von 60 Zelllinien dargestellt. Die Wahl fiel dabei auf die hochinvasive Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 und die nur schwach invasive Colonkarzinom-Zelllinie HCT-116. Beide exprimieren Zyxin, jedoch unterscheiden sie sich in der Expression von RAPH1. Während es in MDA-MB-231 hochreguliert ist, zeigt HCT eine Herunterregulierung. Interessant ist HCT-116 vor allem, da sie im Gegensatz zu MDA-MB-231 im Zellverband wächst und ein stark durch Stressfibers geprägtes Aktinnetzwerk besitzt. Immunfluoreszenzaufnahmen (Abb. 3.5) zeigen in beiden Zelllinien Zyxin (blau) kolokalisiert mit VASP (rot) und RAPH1 (gelb) in der Leitfront mit VASP bei MDA-MB-231 kolokalisiert. Im Folgenden sollen die Proteine Zyxin und RAPH1 als Marker dienen.

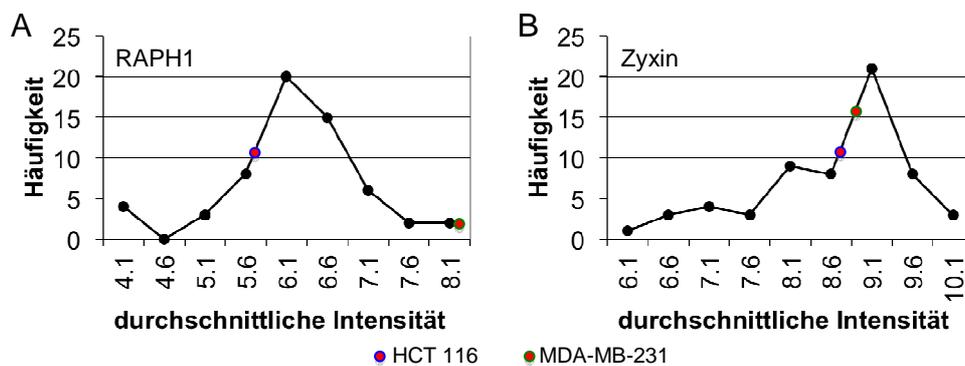


Abb. 3.4 Expression von Zyxin und RAPH1 in HCT-116 und MDA-MB-231

Mittels Affymetrix Chiptechnologie wurden die Expressionslevel von jeweils 60 Zelllinien bestimmt. Dargestellt ist die Häufigkeit der durchschnittlichen Intensitäten innerhalb dieser 60 Zelllinien, für RAPH1 (A) und für Zyxin (B). HCT-116 (blau/rot) und MDA-MB-231 (grün/rot) sind hervorgehoben. Demnach exprimiert MDA-MB-231 etwas mehr Zyxin als HCT. Für RAPH1 ist die Expression bei MDA-MB-231 hoch- und bei HCT-116 etwas herunterreguliert. Quelle: Cellminer, National Institute of Health, USA; „<http://discover.nci.nih.gov/cellminer/>“.

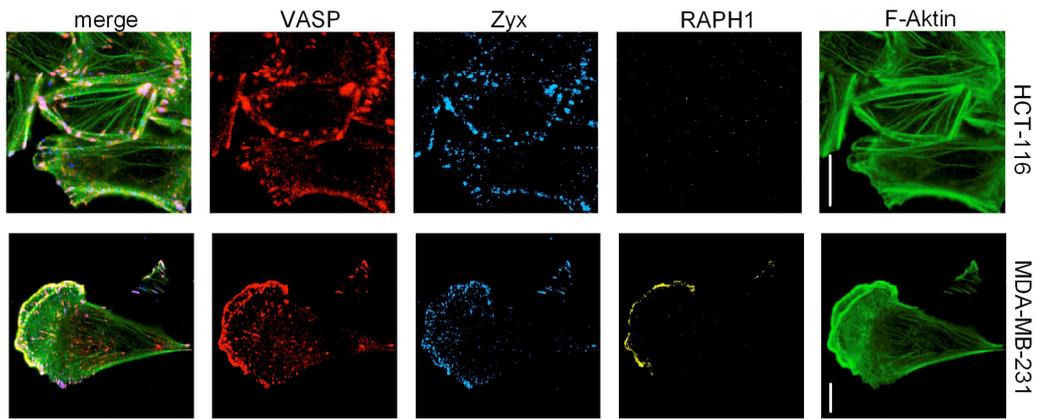


Abb. 3.5 Immunfluoreszenzaufnahmen von HCT-116 und MDA-MB-231

VASP (rot), Zyxin (blau), RAPH1 (gelb) und F-Aktin (grün). Der weiße Balken repräsentiert jeweils 10 μ m. Beide Zelllinien exprimieren Zyxin und VASP, die in so genannten fokalen Adhäsionspunkten zu erkennen sind. RAPH1 ist nur bei MDA-MB-231 zu identifizieren. Es befindet sich hier in der Leitfront von Lamellipodien, wo es mit VASP kolokalisiert.

3.3 *In vitro*-Verdrängung bekannter Zielproteine der Ena/VASP-EVH1-Domäne mittels der neuartigen Inhibitoren

Um das Potential der neuen EVH1-Liganden zu testen, wurden ihre rekombinant hergestellten Zielproteine, die EVH1-Domänen, in Pulldown-Versuchen verwendet. Dabei sollten aus Zelllysaten die bekannten Bindungspartner Zyxin (ZYG) und RAPH1 gezogen und mit dem Liganden *I* wieder verdrängt werden. Für EnaH- und VASP- EVH1 konnte im Pulldown gezeigt werden, dass die beiden bekannten Bindungspartner Zyxin und RAPH1 für MDA-MB-231 und Zyxin für HCT-116, gezogen und in Abhängigkeit der Konzentration des Liganden *I* wieder verdrängt werden können (Abb. 3.6). Die Funktionalität des Liganden als Inhibitor der EVH1-Domänen ist damit gegeben und die darauf beruhenden zellulären Effekte sind ab Abschnitt 3.7 beschrieben.

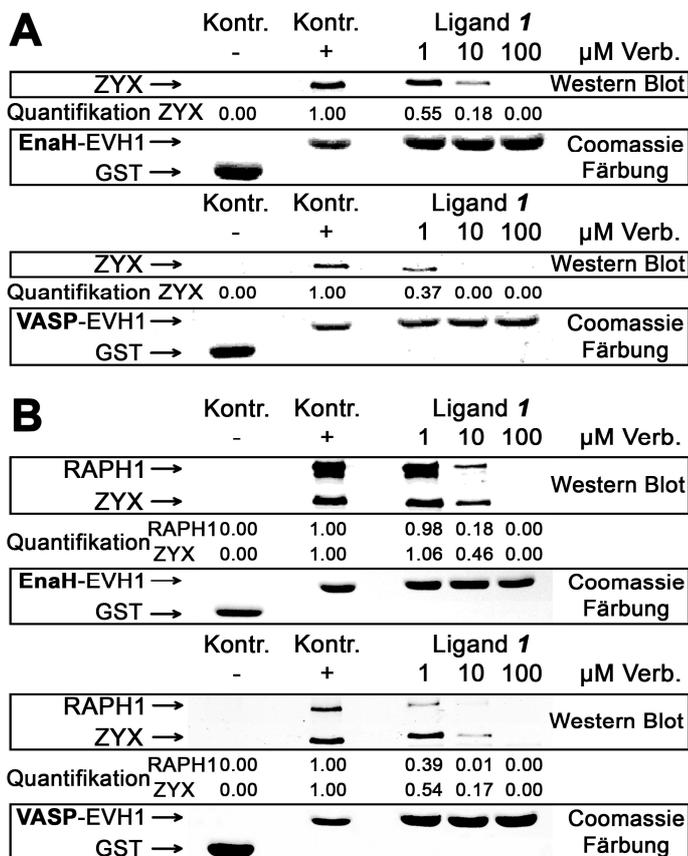


Abb. 3.6 Verdrängung natürlicher Bindungspartner von den EVH1-Domänen

Pulldown-Experimente mit GST-markierten EnaH-EVH1 (oberes Feld) und VASP-EVH1 (unteres Feld) an Glutathionsepharosebeads. Die Lysate stammen aus HCT-116 (A) und MDA-MB-231 (B). Die gezogenen und verdrängten Proteine Zyxin (ZYX) und RAPH1 sind im Western Blot (oberer Kasten) und die Ladekontrollen in Coomassie-Anfärbung (unterer Kasten) gezeigt. GST allein

diente als Kontrolle. Die Quantifizierung erfolgte via ImageJ. Der Ligand *I* verdrängt hierbei die natürlichen Bindungspartner in Abhängigkeit zu seiner Konzentration. Abb. nach: Opitz, Müller, Reuter und Barone *et al.* 2015.

3.4 Proteomweite Untersuchung des Interaktionsmusters der Ena/VASP-EVH1-Domänen mittels ¹⁸O-Massenspektrometrie und unter Verwendung der neuartigen Inhibitoren

Durch die Pulldown-Experimente wurde sichergestellt, dass der Ligand Ac-[2-Cl-F][ProM2][ProM1]-OH in der Lage ist, bekannte Zielproteine der Ena/VASP-EVH1-Domänen zu verdrängen. In einem weitergehenden Schritt sollte daher dieser Inhibitor für eine proteomweite Untersuchung des Interaktionsmusters der Ena/VASP-EVH1-Domänen verwendet werden. Dazu fand ein massenspektrometrischer Ansatz Verwendung, wobei ein weiteres Pulldown-Experiment mit Lysaten von MDA-MB-231 durchgeführt wurde. In diesem proteomweiten Ansatz wurden Banden der im SDS-Gel aufgetrennten Eluate, vom Pulldown mit und ohne Inhibitor, ausgeschnitten und die Proteine in den Banden tryptisch einmal in Anwesenheit von ¹⁶O-Wasser sowie im anderen Fall mit ¹⁸O-Wasser verdaut. Im Anschluss wurden die Proben vereint. Aus einem Protein entstehen so sauerstoffisotopenmarkierte Peptide unterschiedlicher Masse, welche über die Massenspektrometrie identifiziert werden können. Über das Muster der Peptidmassen lassen sich Proteine identifizieren. Aus dem Verhältnis der Intensitäten von schwer zu leicht markierten Peptiden kann auf eine Verdrängung geschlossen werden. Abundante Proteine wie etwa Stoffwechsellenzyme, ribosomale oder DNA-Reparatur-Proteine können jedoch leicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Wohingegen limitiert vorliegende Proteine ein falsch-negatives Ergebnis liefern können. Das Setzen von Schwellenwerten ist der erste Schritt der Validierung. Diese Werte sind gängige Parameter in der Auswertung. Es handelt sich dabei um die Anreicherung (schwer/leicht-Ratio), die Anzahl der Identifikationen der Proteine (#), eine von der Software ermittelte Standardabweichung (SDgeo) und dem Fakt, dass ein Protein bei der Wiederholung des Versuches ein zweites Mal gefunden wird. So reduziert sich die Proteinzahl pro Domäne in diesem Versuch von etwa 1000 auf unter 100. Im nächsten Schritt werden Proteine ausgeschlossen. Hier sind es die bereits erwähnten Produkte von nicht-regulierten, konstitutiv exprimierten Genen wie Stoffwechsellenzyme, DNA-Reparatur-Proteine und solche, die an der Transkription und

Translation beteiligt sind. Dieser Schritt senkt die Anzahl der Proteine auf etwa 20 (Abb. 3.7). Eine 100%-ige Sicherheit, dass die richtigen und vor allem alle Bindungspartner gefunden werden, ist hierbei jedoch nicht zwingend gegeben. Die identifizierten Bindungspartner sind in Tabelle 1 dargestellt. In dieser Untersuchung wurden Partner identifiziert, welche das bekannte EVH1-Konsensusmotiv [F/W/L/Y]P. ϕ P enthalten. Dies sind die Proteine der MRL-Familie sowie Zyxin, Palladin und Lipoma-Preferred-Partner. Testin, welches mit seiner LIM-Domäne ausschließlich an EnaH-EVH1 binden kann, wurde ebenfalls und nur bei EnaH-EVH1 identifiziert (Boëda et. al. 2007). Neben dieser Anzahl von bekannten Bindern konnten auch bisher noch unbekannte Interaktionspartner der EVH1-Domänen identifiziert werden. Zum einen ist dies der WAVE2-Komplex, dessen Interaktion ein Link zwischen Elongation und Nukleation darstellt sowie die Formine INF2 und DIAPH1.

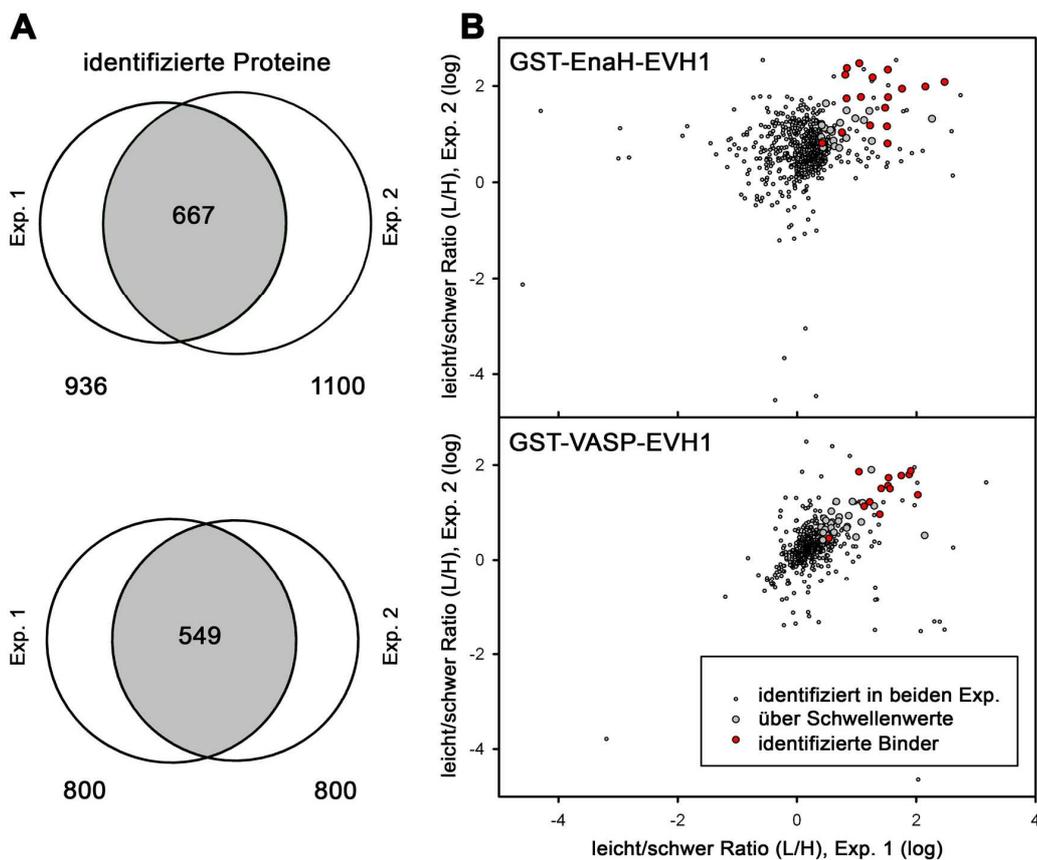


Abb. 3.7 Veranschaulichung der Identifizierung der Proteine, welche von EVH1-Domänen mittels des Inhibitors *I* verdrängt werden können

(A) Venn-Diagramme. Veranschaulichung der Anzahl der identifizierten Proteine in den jeweiligen Experimenten und solcher Proteine die in beiden Versuchen gefunden wurden. (B) Diagramm identifizierter Proteine. Die Proteinwolke bei einer leicht/schwer-Ratio um den 68

Wert 1 zeigt nicht verdrängte Proteine im Versuch. Durch Anwendung von Schwellenwerten erhaltene putative Bindungspartner der jeweiligen EVH1-Domänen sind in grau dargestellt. Angewendete Schwellenwerte: schwer/leicht-Ratio $\leq 0,4$; # ≥ 4 ; SD(geo) ≤ 2 ; schwer/leicht-Ratio aus ^{16}O und ^{18}O markierten Peptiden; SD(geo): von Mascot Distiller ermittelte Standardabweichung; #: Anzahl der Identifizierungen. Rot gekennzeichnet sind solche Proteine, die als tatsächlich verdrängt identifiziert wurden.

	GST-VASP-EVH1			GST-EnaH-EVH1			Proteinname						
	Experiment 1 schwer /leicht SD (geo) #	Experiment 2 schwer /leicht SD (geo) #	Experiment 1 schwer /leicht SD (geo) #	Experiment 2 schwer /leicht SD (geo) #	Experiment 2 schwer /leicht SD (geo) #								
MRL	0,01	1,22	86	0,01	1,23	49	0,05	1,32	57	0,01	1,37	157	RAPH1
	0,06	1,16	10	0,06	1,26	9	0,02	1,45	24	0,01	1,52	46	Rap1-GTP-interacting adapter molecule (RIAM)
FP..P	0,29	1,08	20	0,35	1,10	11	0,06	1,47	19	0,07	1,42	31	Lipoma-preferred partner (LPP)
	0,04	1,20	61	0,03	1,26	48	0,08	1,37	39	0,02	1,20	117	Palladin (PALLD)
	0,07	1,17	68	0,07	1,21	57	0,03	1,53	100	0,07	1,33	115	Zyxin(ZYX)
LIM							0,03	1,26	23	0,03	1,60	25	Testin (TES)
Formine	0,04	1,37	18	0,11	1,19	22	0,15	1,30	15	0,02	1,20	51	Inverted formin-2 (INF2)
	0,01	1,32	71	0,04	1,14	62	0,15	1,22	71	0,00	1,32	184	Protein diaphanous homolog 1(DIAPH1)
WAVE2 Komplex	0,03	1,50	14	0,03	1,17	10	0,00	1,96	15	0,01	1,60	28	Abl interactor 1 (ABI1)
	0,01	1,41	61	0,02	1,25	88	0,09	1,33	71	0,00	1,49	185	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1 (CYFIP1)
	0,02	1,44	6	0,02	1,53	13	0,15	1,81	5	0,01	1,59	39	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 (CYFIP2)
							0,18	1,65	5	0,09	1,36	8	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 (FXR1)
	0,03	1,21	66	0,02	1,23	69	0,03	1,31	78	0,00	1,22	204	Nck-associated protein 1 (NCKAP1)
	0,09	1,66	4	0,01	1,61	4	0,03	1,33	6	0,02	3,60	9	Protein BRICK1(BRK1)
	0,03	1,36	27	0,03	1,33	18	0,01	1,45	29	0,01	1,47	41	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2 (WASF2)
						0,38	1,07	7	0,15	1,59	20	Ras-related protein Rab-7a (RAB7A)	

Tab. 3.1 Identifizierte Bindungspartner der EVH1-Domänen mittels Inhibitor 1

Schwer/leicht-Ratio aus ^{16}O und ^{18}O markierten Peptiden; SD(geo): von Mascot Distiller ermittelte Standardabweichung; #: Anzahl der Identifizierungen; MRL: MRL Protein Familie; FP..P: bekannte Bindungspartner mit einem EVH1-Bindungsmotiv; LIM: Proteine die via LIM-Domäne mit EVH1 interagieren. Weiterhin wurden Formine und der WAVE2-Komplex identifiziert.

3.5 Zellgängigkeit der verwendeten Inhibitoren, deren intrazelluläre Stabilität und Vitalität der verwendeten Zelllinien: Voraussetzung für Studien *in cellulo*

Um die Effekte der Inhibitoren *in cellulo* untersuchen zu können, muss sichergestellt werden, dass diese Inhibitoren das Zellinnere auch erreichen können. Zur Visualisierung der Aufnahme der untersuchten Inhibitoren in die Zelle wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-nitro-2,1,3-benzoxa-diazol-4-yl- (NBD) markiert. Der Inhibitor mit der freien Säure NBD-**I** zeigte hierbei keine Aufnahme in die Zellen während das Ethylester-Derivat NBD-**Ib** sich signifikant in den Zellen anreichert (Abb. 3.8). Im Wesentlichen unterscheiden sich diese beiden Verbindungen in ihrer Ladung. Während NBD-**I** wegen der freien Carboxylgruppe die Ladung -1 trägt, ist eben diese negative Ladung bei NBD-**Ib** durch die Veresterung beseitigt.

Die beiden Substanzen NBD-**I** und -**Ib** können über ihre Retentionszeiten in der HPLC unterschieden werden (Abb. 3.9A). Diese Eigenschaft ermöglicht eine Quantifizierung der Umwandlung beider Substanzen ineinander in Lysaten von Zellen, die nur NBD-**Ib** inkubierten. Es konnte festgestellt werden, dass die Zellen dazu in der Lage waren, NBD-**Ib** zu NBD-**I** zu entestern (Abb. 3.9B). Auffällig bei der HPLC-Untersuchung der Zelllysate war auch, dass neben den beiden Verbindungen NBD-**I** und -**Ib** keine Nebenpeaks zu beobachten waren. Dies ist ein Indiz dafür, dass diese Verbindungen in den Zellen stabil waren und nicht zu weiteren Nebenprodukten abgebaut wurden. Im Folgenden werden für die Versuche an Zellen nur noch die Inhibitoren mit einer C-terminalen Maskierung der negativen Ladung eingesetzt. Untersucht wurden dabei folgende Derivate des Inhibitors **I**: Ethylester (**Ib**), Amid (**Ic**) und der Methylester (**Id**). Die Tab. 3.2 zeigt die Bindungskonstanten der Ethylester-Derivate an die EVH1-Domänen.

Bezeichnung	Ligand	K_D , VASP-EVH1	K_D , EnaH-EVH1	K_D , EVL-EVH1
1b	Ac-[2-Cl-F][ProM-2][ProM-1]-OEt	9,4 (0,5) μ M	7,8 (0,4) μ M	5,8 (0,7) μ M
2b	Ac-[2-Cl-F][ProM-2][ProM-9]-OEt	1,4 (0,2) μ M	0,8 (0,1) μ M	0,67 (0,07) μ M

Tab. 3.2 Bindungskonstanten der Inhibitoren als Ethylester-Derivate

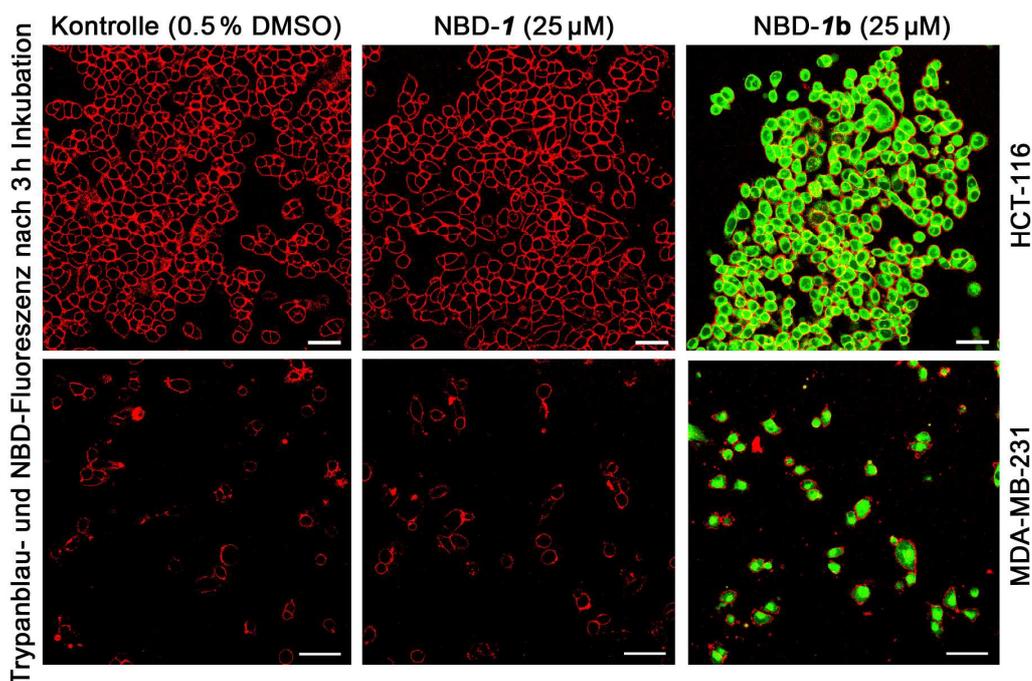
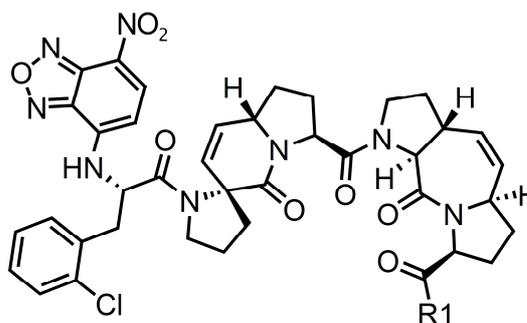


Abb. 3.8 Zellmembranpermeabilität

Oben: Fluoreszenzaufnahmen. Zellmembranen gefärbt mit Trypanblau (rot) und NBD-Fluoreszenz (grün). Der weiße Balken repräsentiert 50 μm . Erst durch Veresterung der freien Säure ist die Fluoreszenz der NBD-markierten Verbindungen in den Zellen zu beobachten;



rechts: Strukturformel. Freie Säure, Rest R1: $-\text{OH}$ (NBD-**1**); Ethylester, R1: $-\text{OEt}$ (NBD-**1b**);

Abb. nach: Opitz, Müller, Reuter und Barone *et al.* 2015.

Um festzustellen, ob die Substanzen in den untersuchten Zelllinien einen zytotoxischen Effekt besitzen, wurde ein Resazurin-Vitalitätstest durchgeführt, der die Mitochondrienaktivität misst. Die getesteten Ethylester-Substanzen **1b**, **2b** und eine Kontrollsubstanz, die trotz großer struktureller Ähnlichkeit zu den verwendeten Inhibitoren wegen des fehlenden Chlor-Atoms nur eine stark verringerte Affinität zu den Ena/VASP-EVH1-Domänen hat, zeigen hierbei keine Herabsetzung der Vitalität der MDA-MB-231-Zellen im Messfenster bis zu einer Konzentration von 150 μM (Abb. 3.10).

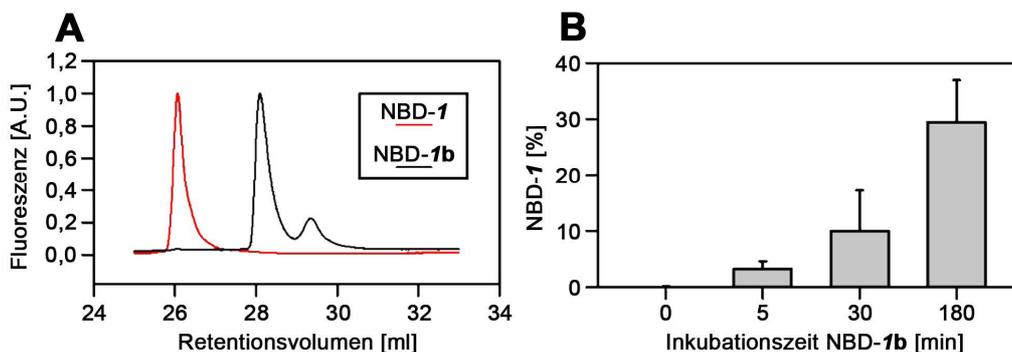


Abb. 3.9 Entesterung des Inhibitors NBD-1b durch HCT-116

HPLC-Analyse von HCT-116 Zelllysaten. (A) Unterschiede der Retentionszeiten von NBD-1 und NBD-1b. (B) Anreicherung der entesterten Form NBD-1 über die Zeit in Zellen welche 100 μM NBD-1b inkubierten. Drei voneinander unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Abb. nach: Opitz, Müller, Reuter und Barone *et al.* 2015.

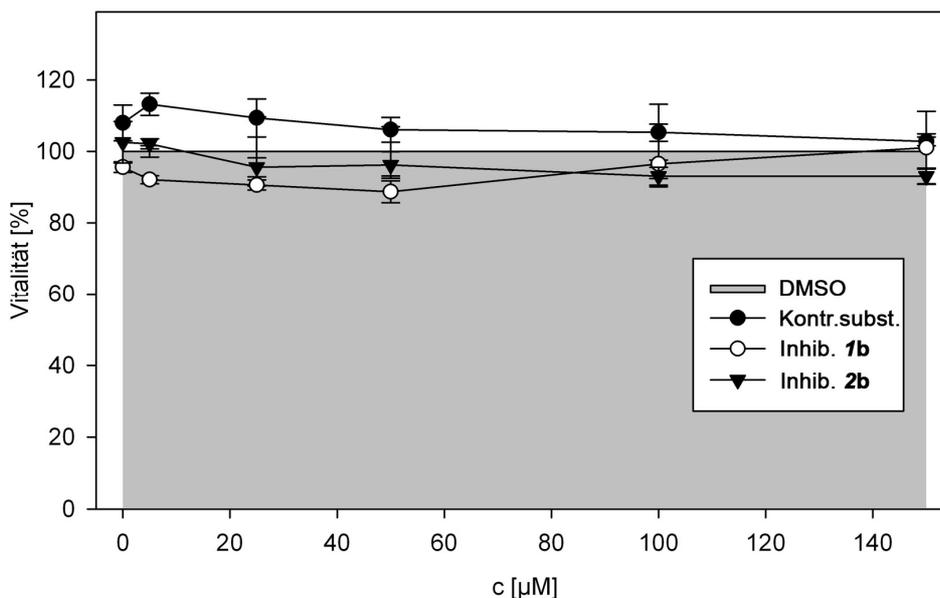


Abb. 3.10 Vitalitäts Assay

Mittels Resazurin gemessene mitochondriale Aktivität als Maß der Vitalität nach 24-stündiger Inkubation der Verbindungen in Abhängigkeit der Konzentration. Die Kontrolle DMSO ist auf 100% gesetzt. Sowohl die Kontrollsubstanz als auch die Inhibitoren 1b und 2b zeigen keinerlei Effekt auf die Zellvitalität von MDA-MB-231-Zellen im Konzentrationsbereich bis 150 μM . Drei voneinander unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

3.6 *in vitro*-ADME-Parameter der neuen EVH1-Inhibitoren: Plasmastabilität, Plasmaproteinbindung, metabolische Caco-2-Permeation und Stabilität in Lebermikrosomen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Derivate der EVH1-Inhibitoren, bei denen die negative Ladung des C-terminus maskiert worden ist, in die hier verwendeten Zelllinien eindringen und keine toxischen Effekte aufweisen. Jedoch wird das Ethylesterderivat **Ib** über die Zeit zur freien Säure **I** umgesetzt. In einem weiteren Schritt sollen nun die ADME-Parameter der EVH1-Inhibitor-Derivate **Ic** (Amid) und **Id** (Methylester) untersucht werden. ADME-Parameter werden in der Pharmakokinetik von Verbindungen bestimmt, zum Beispiel wenn sie in *in vivo*-Experimenten verwendet werden sollen. Es handelt sich dabei um die Absorption oder Aufnahme von Verbindungen in den Körper, deren Distribution im Organismus, Metabolisierung in Lebermikrosomen und Exkretion bzw. Ausscheidung der Verbindungen und deren Metabolite. Die hier dargestellten Parameter sind die so genannten *in vitro*-ADME-Parameter. Sie wurden von der Firma Pharmacelsus bestimmt. Da bereits aus dem vorgehenden Abschnitt bekannt ist, dass das Ethylesterderivat **Ib** nicht sehr stabil in den Zellen ist, wurde diese Version nicht für die Untersuchung der *in vitro*-ADME-Parameter herangezogen. Die untersuchten Parameter sind die Plasmastabilität, die Bindung an Plasmaproteine, die Permeation durch eine Darmepithelzellschicht und die metabolische Stabilität in Lebermikrosomen.

Zur Untersuchung der Plasmastabilität wurden je 10 µM des Inhibitors **Ic** und **Id** über 240 Minuten lang mit murinem oder humanem Plasma inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das Esterase-Substrat Propanthelin mit 10 µM in den Plasmen eingesetzt. Die Identifizierung der verbleibenden Verbindungen wurde mittels HPLC und anschließender Massenspektrometrie (LC-MS) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens 78% der Kontrollsubstanz Propanthelin im Plasma nach 60 Minuten abgebaut werden können, womit die Integrität des Plasmas gegeben war. Weiterhin war es möglich, mindestens 87% (**Ic**) bzw. 95% (**Id**) der eingesetzten Inhibitoren

nach 240minütiger Plasmainkubation daraus wieder zurückzugewinnen. Die Inhibitoren werden damit als hochstabil gegenüber murinem und humanem Blutplasma eingeschätzt (Abb. 3.11).

Die Plasmaproteinbindung wurde mittels Ultrazentrifugation ermittelt. Hierbei wurden die Testsubstanzen mit einer Konzentration von je 10 µM zum einen in murinem sowie humanem Plasma und zum anderen in PBS inkubiert. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt wurden die Konzentrationen in den jeweiligen Filtraten mittels LC-MS bestimmt. Die Differenz zwischen PBS- und Plasma-inkubierten Substanzen in Prozent ist die plasmaproteingebundene Fraktion f_b . Sie ist in der Abbildung 3.12 dargestellt. Als Positivkontrolle diente Warfarin, das eine f_b von mindestens 82 % aufweist. Die f_b von **Ic** (4,5%) und **Id** (7,6%) werden als eine extrem niedrige Plasmaproteinbindung klassifiziert.

Die Zell-Permeation der Inhibitoren wurde in einem Versuch mit Darmepithelzellen (Caco-2) auf einer Membran im Transwell-Format untersucht. Diese Zellen weisen sich durch zwei verschiedene Seiten aus. Die basolaterale (b) und die apikale (a) Seite. Letztere ist dabei *in vivo* dem Darmlumen zugewandt. Die Permeation durch eine solche Zellschicht wird daher in beide Richtungen, a zu b (a-b) und b zu a (b-a) untersucht. Die Inhibitoren wurden dabei mit einer Konzentration von jeweils 10 µM, die Referenzverbindungen Testosteron und Erythromycin mit je 1 µM, eingesetzt. Auf der jeweils anderen Seite im Transwell wurden zum Zeitpunkt 0 und 90 Minuten jeweils Proben entnommen und die Konzentration der Verbindungen mittels LC-MS bestimmt. Aus dem Anstieg der Geraden zwischen den beiden Messpunkten (k), der Fläche der Membran auf der die Caco-2 Zellen sitzen (A) und der Ausgangskonzentration der Verbindungen (c_0) lässt sich die apparente Permeationsrate P_{app} über die Formel:

$$P_{app} = k \cdot A^{-1} \cdot c_0^{-1}$$

berechnen. Sie ist in der Abbildung 3.13 gezeigt. Aus der Ratio von b-a zu a-b wird zusätzlich der Efflux berechnet. Er trifft eine Aussage darüber, ob ein Transport aktiv oder passiv erfolgt. Der aktive Transport der Kontrollsubstanz Erythromycin wurde durch einen hohen Efflux von etwa 26 bestätigt.

Testosteron ist eine Verbindung, die sich durch einen sehr guten passiven Transport auszeichnet. Demnach ist der Efflux niedrig und die Permeationsraten (P_{app}) zeigen Werte von $7,4 \cdot 10^{-6}$ (a-b) bzw. $20,4 \cdot 10^{-6}$ (b-a) $\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$. Die Inhibitoren liegen mit $0,7 \cdot 10^{-6}$ (a-b; **Ic**) und $0,3 \cdot 10^{-6}$ (b-a; **Ic**) sowie $0,3 \cdot 10^{-6}$ (a-b; **Id**) und $0,4 \cdot 10^{-6}$ (b-a; **Id**) $\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$ deutlich unterhalb der Testosteronwerte. Daher wird eine niedrige Permeation der Inhibitoren durch die Darmepithelschicht angenommen (Abb. 3.13).

Das Maß der Stabilität einer Verbindung in Lebermikrosomen ist die Clearance. Sie gibt an, wie viel μl der Testlösung pro Minute und normiert auf ein mg mikrosomaler Proteine von der eingesetzten Verbindung befreit werden können. Dazu inkubierten je $1 \mu\text{M}$ Verbindung in je $0,125 \text{ mg}$ Protein aus murinen (MLM) und humanen (HLM) Lebermikrosomen in der Anwesenheit von NADPH. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die nichtabgebauten Mengen der Verbindung mittels LC-MS bestimmt und über die graphische Darstellung (verbleibende Verbindung über die Zeit) der Anstieg (k) der linearen Regression ermittelt. Die intrinsische Clearance berechnet sich über die Formel:

$$Cl_{int} = (-k) \cdot V,$$

wobei $V = 500 \mu\text{l}$ Inkubationsvolumen / $0,125 \text{ mg}$ Protein = 4000 ist. Die Abbildung 3.14 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Für die beiden Referenzverbindungen Detromethorphan (MLM) und Verpamil (HLM) ergaben sich Werte von über $150 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{mg})$. Die Inhibitoren **Ic** und **Id** liegen bei HLM mit einer Clearance von maximal 12 bzw. $26 \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ deutlich unterhalb der Werte der Referenzsubstanzen. Damit wird die Metabolisierung der Inhibitoren in Lebermikrosomen als langsam klassifiziert.

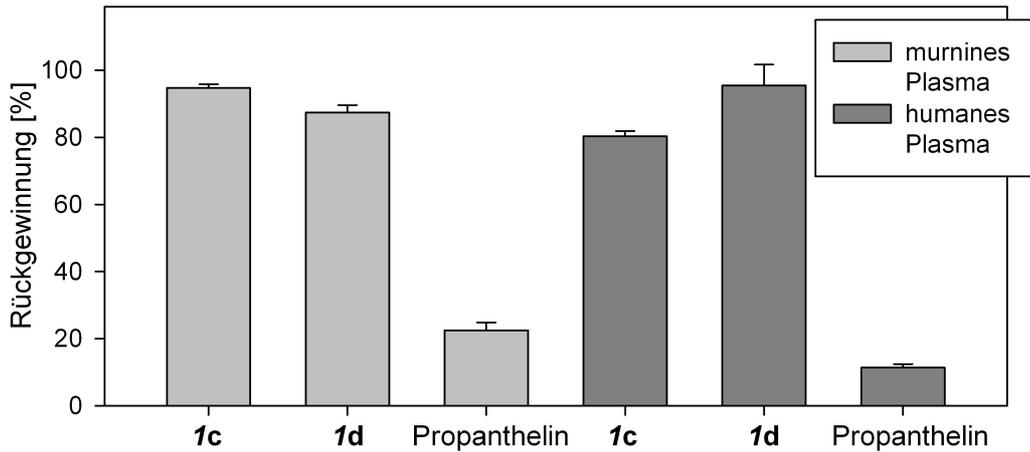


Abb. 3.11 Plasmastabilität der EVH1-Inhibitoren

Die Rückgewinnung der Inhibitoren **1c** und **1d** aus Blutplasma verschiedener Spezies nach einer Inkubationszeit von 240 Minuten ist dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Abbau von Propanthelin nach 60 Minuten betrachtet, der in einer etwa 80%-igen Reduktion der Rückgewinnbarkeit dieser Verbindung resultiert. Die Inhibitoren **1c** und **1d** sind hochstabil in murinem und humanem Blutplasma. Mittelwerte aus zwei Versuchen mit SD. Quelle: Pharmacelsus.

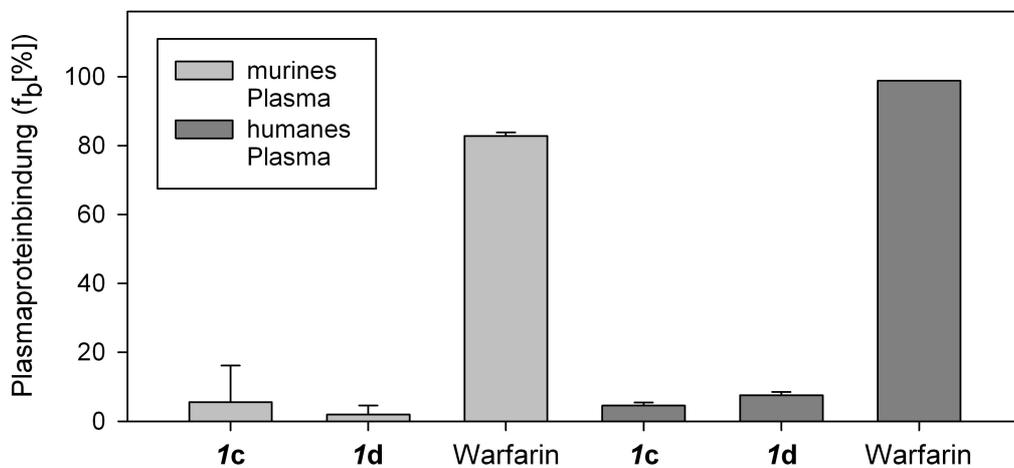


Abb. 3.12 Plasmaproteinbindung der EVH1-Inhibitoren

Die proteingebundene Fraktion f_b der Inhibitoren **1c** und **1d** wurde mittels Ultrazentrifugation von Inhibitor-inkubiertem murinen und humanen Blutplasma bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde Warfarin mituntersucht. Die Plasmaproteinbindung der Inhibitoren wird als extrem niedrig eingestuft. Mittelwerte aus zwei Versuchen mit SD. Quelle: Pharmacelsus.

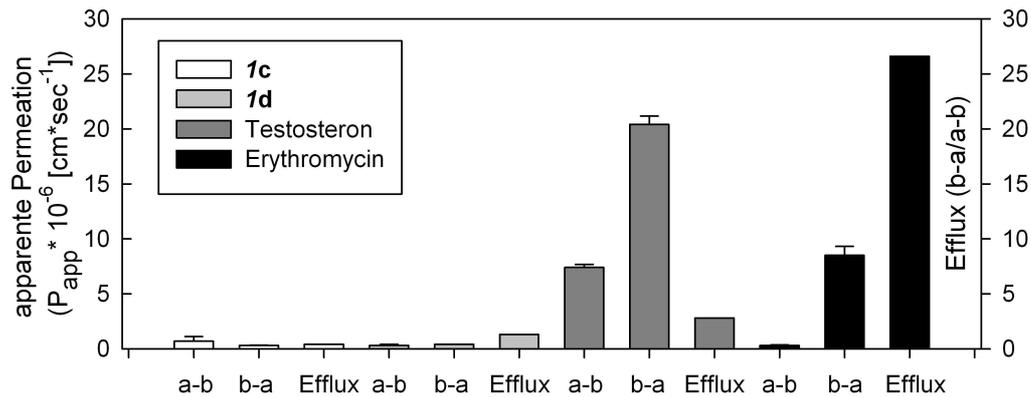


Abb. 3.13 Caco-2-Permeations-Versuch mit den EVH1-Inhibitoren

Die apparente Permeationsrate der Inhibitoren **1c** und **1d** wurden in zwei Richtungen untersucht. In apikaler zu basolateraler Richtung (a-b) der Darmepithelzelllinie Caco-2 und in umgekehrter Richtung (b-a). Aus beiden Permeationsraten ergibt sich der Efflux. Die Permeationsraten der Inhibitoren sind in beide Richtungen niedrig. Als Kontrollen wurden die Permeationsraten von Testosteron und Erythromycin bestimmt. Mittelwerte aus zwei Versuchen mit SD. Quelle: Pharmacelsus.

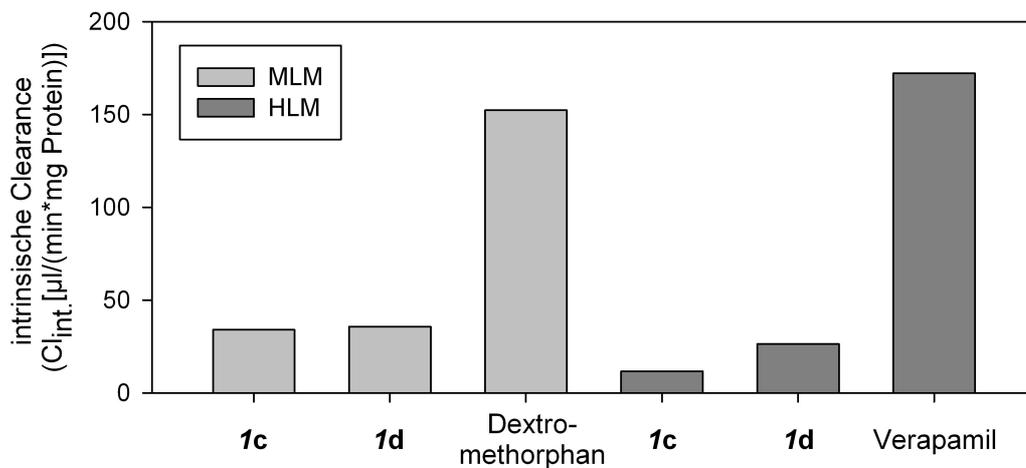


Abb. 3.14 Metabolische Stabilität der EVH1-Inhibitoren in Lebermikrosomen

Die intrinsische Clearance der Inhibitoren **1c** und **1d** wurden in murinen (MLM) und humanen (HML) Lebermikrosomen bestimmt. Als Referenzsubstanzen wurden Dextromethorphan in murinen und Verapamil in humanen Lebermikrosomen untersucht. Die Inhibitoren werden nur langsam in den Lebermikrosomen metabolisiert. Da der Anstieg der linearen Regression (verbleibende Verbindung über die Zeit) nur eine Zweipunktbestimmung war, weisen die hier dargestellten Daten keine Standardabweichung auf. Quelle: Pharmacelsus.

3.7 Interferenz der Protein-Protein-Wechselwirkung der Ena/VASP-Proteine mit ihren Zielproteinen durch die neuartigen Inhibitoren *in cellulo*

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die kompetitiven EVH1-Liganden natürliche Bindungspartner der EVH1-Domänen verdrängen, diese Inhibitoren durch Veresterung zellmembrangängig sind und keine toxischen Effekte aufweisen, sollen nun ihre Effekte auf die Zelle im Hinblick auf Phänotypen und Physiologie untersucht werden.

Genau wie in den Pulldown-Versuchen unter 3.3 beschrieben, soll nun hier untersucht werden, ob die EVH1-Inhibitoren dazu in der Lage sind, ihre Partner in der Zelle zu verdrängen. Hierzu wurden Immunofluoreszenzaufnahmen angefertigt, bei denen die Marker Zyxin und RAPH1 sowie der neu identifizierte Bindungspartner WAVE2 und das Ena/VASP-Protein VASP angefärbt wurden. Aussagen über die Verdrängung wurden durch die Kolo-kalisation getroffen. In den beiden Zelllinien HCT-116 und MDA-MB-231 konnte gezeigt werden, dass fokale Adhäsionspunkte, markiert durch Zyxin, bestehen bleiben, jedoch VASP aus ihnen verdrängt wird, wenn die Zellen den EVH1-Inhibitor inkubieren (Abb. 3.15 und 3.16). Im Falle der MDA-Zelllinie kam zum Inhibitor **1b** eine weiterentwickelte Verbindung hinzu. Der neue Inhibitor **2b** zeichnet sich durch eine 10-fach stärkere Bindung an die EVH1-Domänen aus. Während **1b** die Anzahl der Zellen mit VASP in den fokalen Adhäsionspunkten um etwa 50% reduziert, so vermag **2b** diese Anzahl um 90% zu reduzieren. In der Leitfront, markiert durch RAPH1, zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Inhibitoren **1b** und **2b**. Beide reduzieren die Anzahl der Zellen mit VASP in der Leitfront um etwa 50%. Dabei bleibt die Lokalisierung von RAPH1 selbst unbeeinflusst. Die Abbildung 3.17 zeigt die Lokalisationsstudien von WAVE2 an die Leitfront. Hier weisen **1b** und **2b** keine Reduktion von WAVE2 an der Leitfront auf. WAVE2 folgt demnach nicht dem VASP und wird vermutlich zusätzlich auf anderem Wege in der Leitfront gehalten. Es konnte gezeigt werden, dass die EVH1-Inhibitoren WAVE2 zwar nicht aus der Leitfront verdrängen, jedoch VASP als Aktivator

des WAVE2-Komplexes massiv aus der Leitfront delokalisiert. Vermutlich ist die WAVE2-Komplex-Aktivität damit eingeschränkt. Darauf beruhende Effekte sollen im nächsten Abschnitt betrachtet werden.

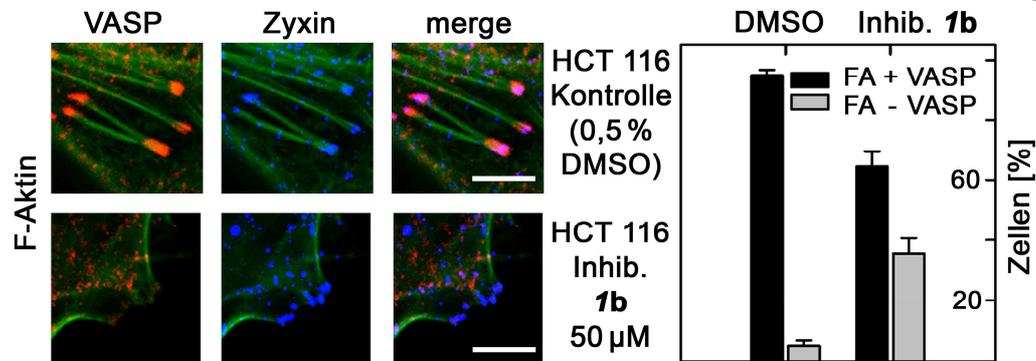
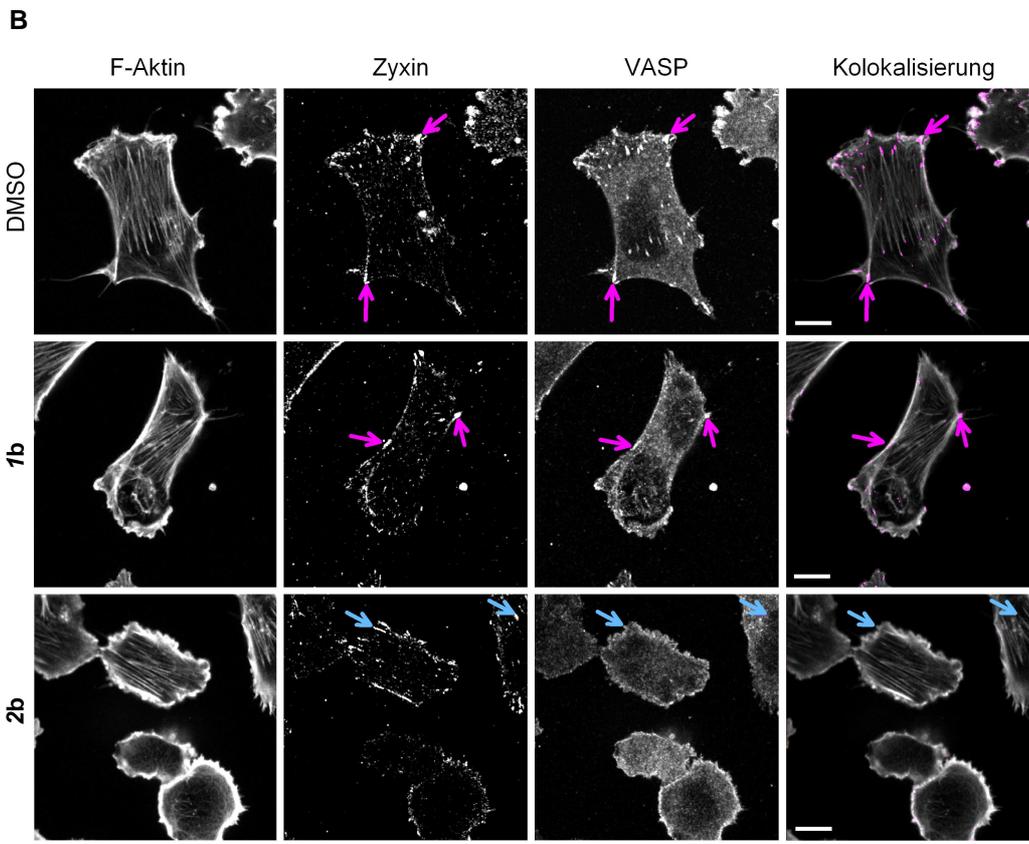
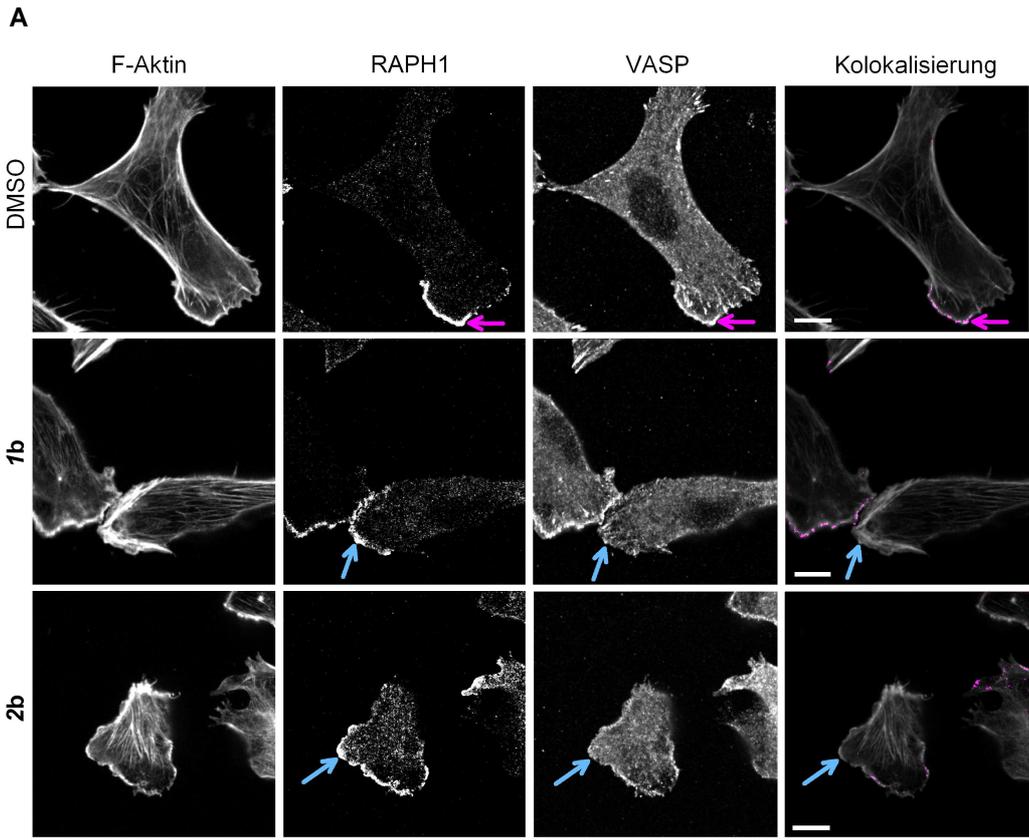


Abb. 3.15 Delokalisierung von VASP aus den fokalen Adhäsionspunkten in HCT-116

links: Immunofluoreszenzaufnahmen von HCT-116. F-Aktin (grün), VASP (rot), Zyxin (blau) und im merge (magenta). Die Kolokalisierung von VASP und Zyxin in der Kontrolle (obere Reihe) ist bei Inhibitor **1b** (50 μ M)-inkubierenden Zellen nicht mehr zu beobachten (untere Reihe). Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m; rechts: Auswertung der Zählung von Zellen mit (schwarze Balken) und ohne (graue Balken) VASP in den fokalen Adhäsionspunkten (FA). Während in der Kontrolle (DMSO) nahezu jede Zelle VASP in den FA hat, zeigt sich bei Inhibitor **1b**-behandelten Zellen eine Reduktion der FA mit VASP um etwa 30%. Drei unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, $P < 0.001$, Pearson's X^2 Test; Quelle: Opitz, Müller, Reuter und Barone *et al.* 2015; PNAS.



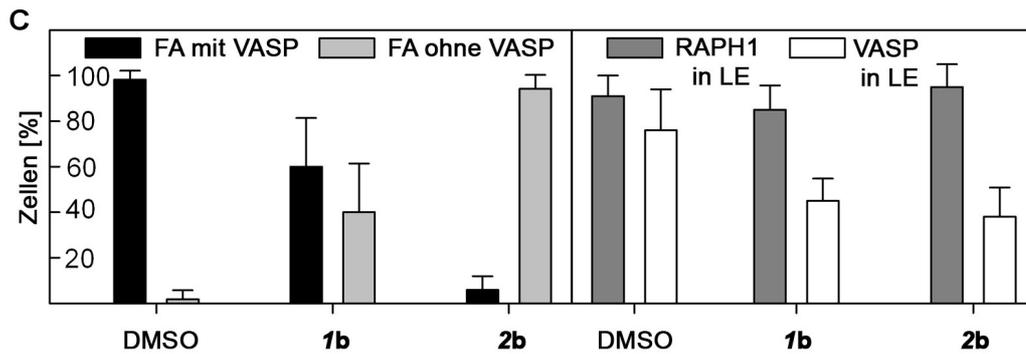


Abb. 3.16 Delokalisierung von VASP aus der Leitfront und den fokalen Adhäsionspunkten in MDA-MB-231

Immunofluoreszenzaufnahmen von MDA-MB-231. Spalten von links nach rechts: F-Aktin, Zyxin (A) und RAPH1 (B), VASP, Kolokalisierung mit VASP. Zeilen von oben nach unten: Kontrolle (DMSO), Inhibitor **1b** (100 μ M), Inhibitor **2b** (100 μ M). Pfeile in den Spalten Zyxin (A) / RAPH1 (B) zeigen die Lokalisation dieser Proteine in der Zelle und eine bestehende (magenta) oder nicht identifizierbare (blau) Kolokalisierung mit VASP. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m; (C) links: Auswertung der Zählung von Zellen mit (schwarze Balken) und ohne (graue Balken) VASP in den fokalen Adhäsionspunkten (FA). Während in der Kontrolle (DMSO) nahezu jede Zelle VASP in den FA hat, zeigt sich bei Inhibitor **1b**- bzw. **2b**-behandelten Zellen eine Reduktion der FA mit VASP um etwa 50% bzw. 90%. Drei unabhängige Replikate, $P < 0.001$, Pearson's X^2 Test.; rechts: Die Lokalisation von RAPH1 (graue Balken) und VASP (weiße Balken) in die Leitfront (LE). Während RAPH1 durch die Behandlung mit Inhibitor **1b** bzw. **2b** unverändert in der LE lokalisiert ist, so reduzieren beide Inhibitoren die Lokalisation von VASP in die LE um etwa 50%. Drei unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, $P < 0.001$, Pearson's X^2 Test. Quelle: Opitz, Müller, Reuter und Barone *et al.* 2015; PNAS und unveröffentlichte Daten.

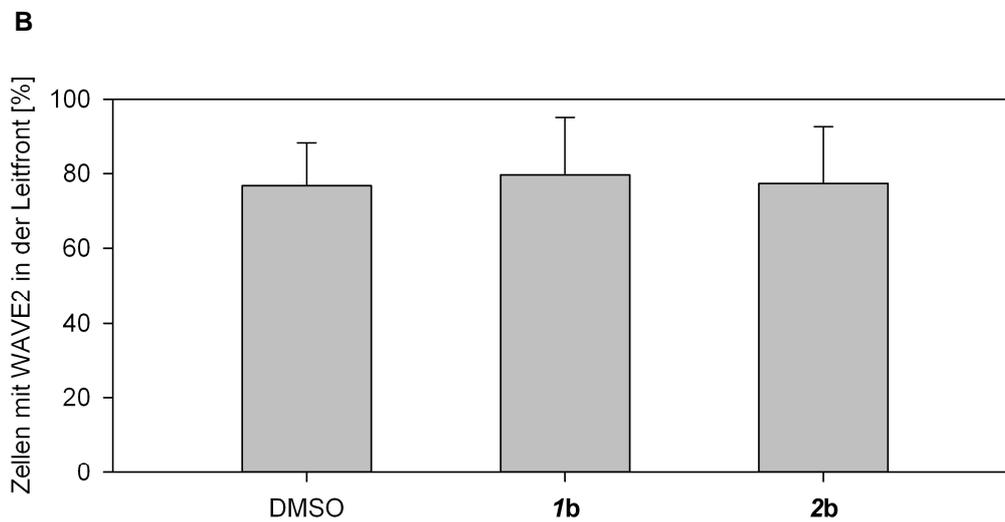
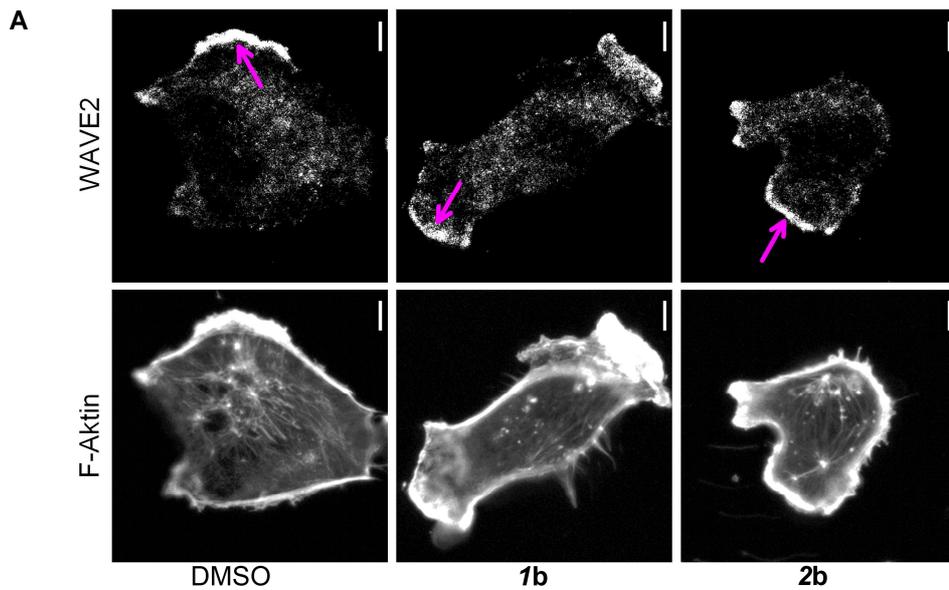


Abb. 3.17 WAVE2 in der Leitfront in MDA-MB-231

Immunofluoreszenzaufnahmen von MDA-MB-231. Spalten von links nach rechts: Kontrolle (DMSO), Inhibitor **1b** (100 μ M), Inhibitor **2b** (100 μ M). Zeilen von oben nach unten: WAVE2, F-Aktin. Pfeile in der Zeile WAVE2 zeigen die Lokalisierung dieses Proteins in die Leitfront. Der weiße Balken repräsentiert 10 μ m; (B) Auswertung der Auszählung von Zellen mit WAVE2 in der Leitfront in Prozent. Die Inhibitoren **4b** und **5b** zeigen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (DMSO). Drei unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

3.8 Charakterisierung phänotypischer Veränderungen der untersuchten Zelllinien durch die Inkubation mit den zellgängigen Inhibitoren der Ena/VASP-EVH1-Domäne

Es konnte gezeigt werden, dass die EVH1-Inhibitoren die zelluläre Lokalisierung von VASP beeinflussen. Es wird aus den Kompartimenten, in denen es über seine Bindungspartner gehalten wird, verdrängt. Nun soll untersucht werden, welchen Einfluss diese Delokalisierung auf den Phänotyp der Zellen hat.

3.8.1 Zell-Zell-Kontakte und das cortikale Aktinnetzwerk

Barrierekontakte lassen sich durch das Protein ZO1 (Zonula Occludens-1) immunologisch anfärben. Die invasive MDA-MB-231 unterscheidet sich hierbei von der schwachinvasiven HCT-116-Zelllinie. MDA-MB-231-Zellen, welche die epitheliale-mesenchymale Transition durchlaufen haben, zeichnen sich per se als Zellen aus, welche die Zell-Zell-Kontakte aufgeben und damit in ihrer Motilität bestärkt sind. HCT-116 dagegen lebt in Kolonien.

In der Abbildung 3.18 ist die Immunfluoreszenzanfärbung von ZO1 gezeigt. Um einzelne Zellen und damit den Kontakt zwischen ihnen zu zeigen, ist zusätzlich zum ZO1 auch der Zellkern mit angefärbt worden. Die Inhibierung der EVH1-Domänen in HCT-116 mit 50 μ M Inhibitor **1b** bewirkt keine Veränderung in der Lokalisierung von ZO1 zwischen den Zellen. Ena/VASP scheint also EVH1-unabhängig in diese Regionen rekrutiert zu werden.

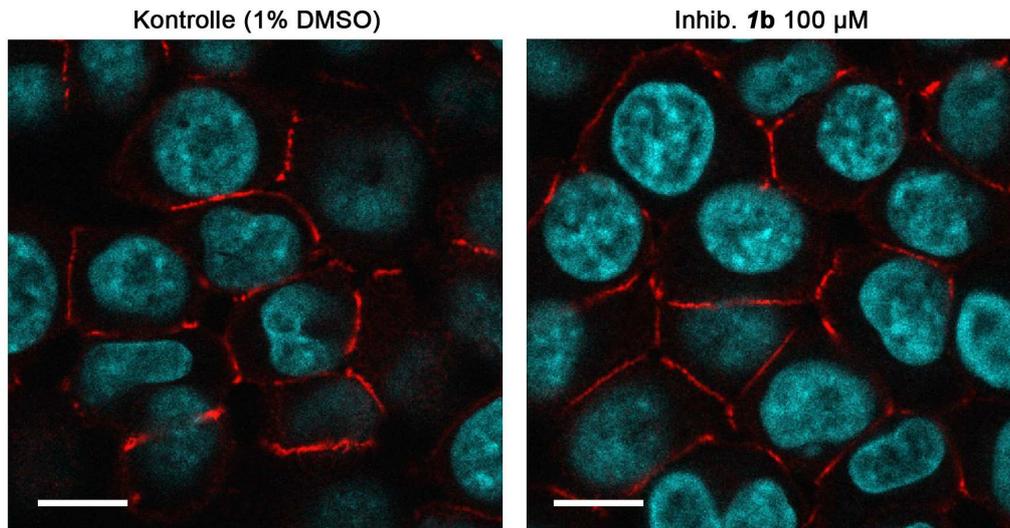


Abb.3.18 Zell-Zell-Kontakte und die EVH1-Inhibition

Immunofluoreszenzaufnahmen von HCT-116. Die Zellkerne (cyan) und das Barrierekontaktemarkierende Protein ZO1 (rot). Der weiße Balken repräsentiert 10 µm. Sowohl die Kontrollzellen (links) als auch die mit Inhibitor **1b** (50 µM)-behandelten Zellen (rechts) zeigen eine gleiche Lokalisation von ZO1 in die Membran zwischen den Zellen. Zell-Zell-Kontakte bleiben bestehen. Abb. nach: Opitz, Müller, Reuter und Barone *et al.* 2015.

3.8.2 Der Einfluss der Ena/VASP-Proteine auf Stressfasern von HCT-116

Die Zelllinie HCT-116 verfügt über sehr gut ausgeprägte und damit einfach zu quantifizierende Stressfasern. Zur Auswertung wurden die beobachteten HCT-116 Zellen in zwei Kategorien unterteilt. Zum einen in Zellen die ein gut ausgeprägtes Netzwerk von Stressfasern besaßen und zum anderen in Zellen ohne Stressfasern. Die Häufigkeiten der beiden Kategorien wurden für zwei Versuchsanordnungen, Zellen mit 50 µM Inhibitor **1b** und Zellen ohne Inhibitorbehandlung, ausgezählt. Es konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor **1b** die Anzahl der Zellen mit ausgeprägten Stressfasern um circa 50% senkt (Abb. 3.19). Dieser Befund lässt vermuten, dass die EVH1-Inhibitoren auch einen Einfluss auf andere Befähigungen der Zelle haben, an denen Aktinfilamente beteiligt sind. Diese sollen im nächsten Abschnitt behandelt werden.

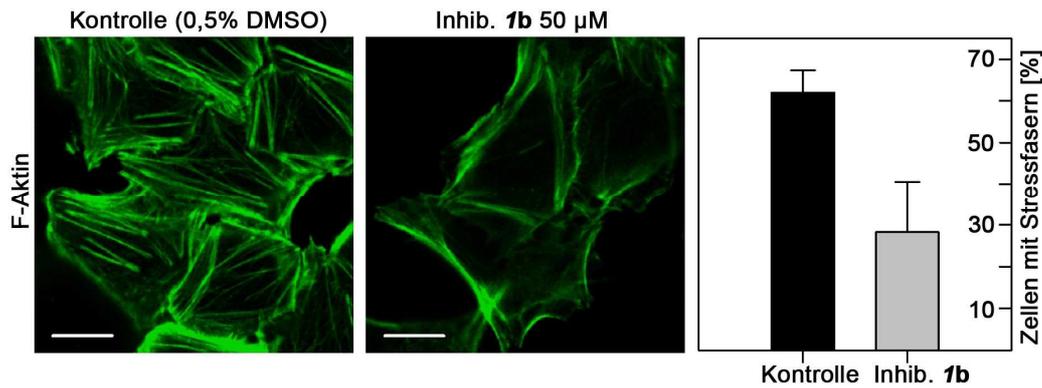


Abb. 3.19 Einfluss der EVH1-Inhibitoren auf Stressfasern

F-Aktin-Anfärbung (grün) in Immunofluoreszenzaufnahmen von HCT-116. Die Zellen zeigen Stressfasern (links), welche durch die Behandlung mit 50 μM Inhibitor **1b** (mitte) aufgelöst werden. Die Auszählung von Zellen ergab eine Reduktion von Stressfasern um 50% durch den Inhibitor **1b** (rechts). Die weißen Balken repräsentieren 10 μm . Drei unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung, $P < 0.001$, Pearson's χ^2 Test. Abb. nach: Opitz, Müller, Reuter und Barone *et al.* 2015.

3.8.3 Veränderung der beobachteten Zellfläche unter Einfluss der zellgängigen Inhibitoren

Es wurden MDA-MB-231-Zellen mit 100 μM in DMSO gelösten Inhibitoren **1b** oder **2b** behandelt, wobei die Behandlung der Zellen mit DMSO allein als Kontrolle diente. Danach wurde die Fläche (in Pixel) von je 80 Zellen pro Behandlung mittels ImageJ bestimmt. Die Verteilung der gemessenen Zellflächen deutete eine Verringerung der Zellfläche der mit Inhibitoren behandelten Zellen an (Abb. 3.20). So sind die Mediane der behandelten Zellen mit 6237 Pixel (Inhib. **1b**) und 5835 Pixel (Inhib. **2b**) gegenüber der Kontrolle mit 8652 Pixel um circa 30 % kleiner. Die Verteilung der Zellfläche war logarithmisch-normal verteilt. Daher wurde für den t-Test mit den logarithmierten Zellflächen gearbeitet, da dann die notwendige Normalverteilung der Daten gegeben war. So konnte ein statistisch signifikanter Unterschied beider Inhibitorbehandlungen zur Kontrolle jedoch nicht unter den Inhibitoren selbst belegt werden.

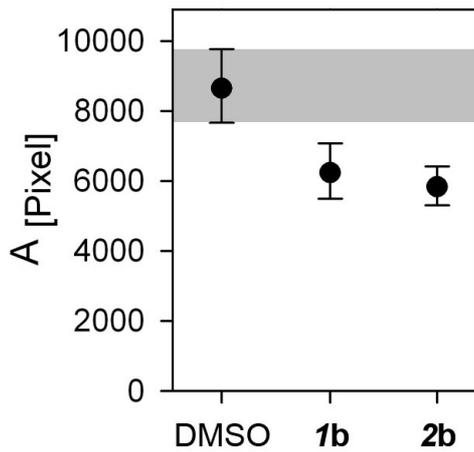


Abb. 3.20 Abnahme der Zellgröße durch die EVH1-Inhibitoren

Untersucht wurde die Zellfläche von jeweils 80 MDA-MB-231-Zellen für die Konditionen DMSO, Inhibitor **1b** und **2b**. Die Fläche wurde an Hand der F-Aktin-Anfärbung in der Immunfluoreszenz mittels ImageJ bestimmt. Gezeigt sind die Mediane der Zellfläche mit 95% Konfidenzintervall (95% KI). Da die Fläche nicht normalverteilt ist, wurde mit dem natürlichen Logarithmus der Daten gearbeitet.

Der t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der DMSO-Kontrolle und den beiden Inhibitoren (95% KI der Kontrolle DMSO (grauer Balken) überschneidet sich nicht mit den 95% KI der Inhibitor-behandelten Proben, $P < 0.001$), jedoch nicht zwischen den Inhibitoren.

3.9 Einfluss der Inhibitoren der Ena/VASP-EVH1-Domäne auf die Beweglichkeit der migrierenden Zelllinie MDA-MB-231

Für die Migration ist es unabdingbar, dass die Zelle Kontakt zu ihrer Umgebung hat. Sie stellt ihn über ihre Adhäsionspunkte her. Die untersuchten MDA-MB-231-Zellen zeichnen sich durch ein stark ausgeprägtes Adhärenzverhalten aus. Die Verdrängung von Ena/VASP-Proteinen aus diesen fokalen Adhäsionspunkten könnte das Adhärenzverhalten negativ beeinflussen. Eine nicht adhärenente Zelle ist per se schon nicht mehr zur Migration befähigt. Um Gewissheit darüber zu haben, wurde das Adhärenzverhalten von MDA-MB-231 beobachtet. Hierzu wurden die Zellen mittels Trypsinierung von ihrer Matrix abgelöst und eine definierte Anzahl erneut ausgesät. Nach eineinhalb stündiger Inkubation mit 100 μ M der Inhibitoren **1b** bzw. **2b** wurde ausgezählt, wie viele Zellen an der Matrix erneut adhärerten. Die Abbildung 3.21 zeigt, dass es keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und den Inhibitoren in Hinblick auf das Adhärenzverhalten gibt. Ein systemischer Verlust der Migrationsfähigkeit ist damit auszuschließen.

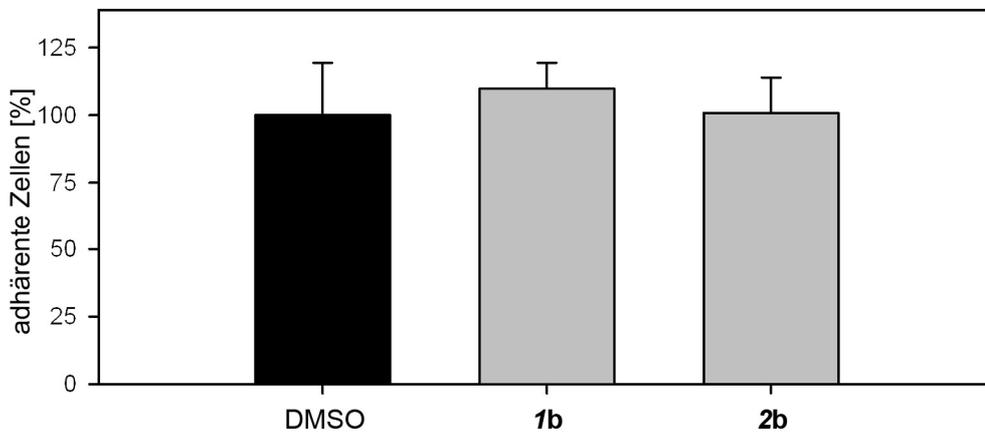


Abb. 3.21 Einfluss der EVH1-Inhibitoren auf das Adhärenzverhalten

Anzahl der adhärenenten Zellen nach 1,5-stündiger Inkubation nach tryptischem Ablösen und erneutem Einsäen. Die Kontrolle ist auf 100% gesetzt. Im Adhärenzverhalten konnte kein Unterschied zwischen der Kontrolle und den Inhibitoren **1b** und **2b** festgestellt werden. Drei unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Um den Einfluss der EVH1-Inhibierung auf die Migration zu untersuchen, wurde ein Invasionsexperiment in der Boydenkammer herangezogen. Hierbei migrieren MDA-MB-231-Zellen durch eine extrazelluläre Matrix und durch Poren mit einem Durchmesser von 8 μm von einer Kammer mit niedriger in eine andere mit hoher Lockstoffkonzentration. Die Abbildung 3.22A zeigt das Resultat dieses Versuches. Der EVH1-Inhibitor **1b** inhibierte die Invasion um 60%, **2b** um etwa 80%. Die Kontrollsubstanz Ac-F[ProM1][ProM1]-OEt, die trotz großer struktureller Ähnlichkeit zu den verwendeten Inhibitoren wegen des fehlenden Chlor-Atoms und einer ungeeigneten ProM-Zusammensetzung nur eine stark verringerte Affinität zu den Ena/VASP-EVH1-Domänen zeigt, hat bei 100 μM keinen Einfluss auf die Invasion. Der Inhibitor **2b** inhibierte die Invasion um etwa 20% stärker als **1b** bei jeweils 100 μM . Dies ist zu erwarten, da die Affinität zur EVH1-Domäne bei **2b** etwa 10-fach höher ist als bei **1b**. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob es einen Unterschied zwischen den verschiedenen Derivaten von Inhibitor **1** gibt. Die C-terminale Modifikation der Inhibitoren [Ethyl (**1b**), Amid (**1c**) und Methyl (**1c**)] hat keinen Einfluss auf die Inhibierung der Invasion. Alle Inhibitorvarianten zeigen den gleichen Effekt (Abb. 3.22B).

Ob jedoch Unterschiede zwischen **1b** und **2b** in der Wirkungsweise bestehen, ist in diesem Experiment nicht ersichtlich. Daher wurde ein weiterer Versuch vorgenommen - die Echtzeitbeobachtung der Migration entlang eines Lockstoffgradienten. Die daraus resultierenden Trajektorien und deren Auswertung sind in der Abbildung 3.23 dargestellt. Auch hier fällt auf, dass 100 μM der niederaffinen Kontrollsubstanz keinerlei Unterschied zur DMSO-Kontrolle ausweist. Anhand des Zentrums der Masse der migrierten Zellen ist festzustellen, dass sowohl **1b**- als auch **2b**-behandelte Zellen die Fähigkeit zur Betreibung der Chemotaxis verloren haben. Das gleiche Bild ist ersichtlich bei der DMSO-Kontrolle, bei der es keinen Lockstoffgradienten gibt. Sie alle bewegen sich zufällig ungerichtet. Wohl aber unterscheidet sich die Art der Bewegung. Während sich mit 100 μM **1b** inkubierte Zellen mit gleicher Geschwindigkeit bewegen und dabei einen gleichgroßen Abstand zum Ursprung der Migration, dem euklidischen Abstand, erreichen wie die DMSO-Kontrolle mit Lockstoffgradient, bewegen sich mit 100 μM **2b** inkubierte

Zellen nur halb so schnell und erreichen damit nur ein Fünftel des Abstandes. Setzt man den 10-fachen affineren Inhibitor **2b** bei 10-fach geringerer Konzentration ein, so ergibt sich phänotypisch das gleiche Bild wie für den Inhibitor **1b** bei 100µM. Ihre Unterschiede sind demnach auf ihre verschiedenen starken Verdrängungseigenschaften zurückzuführen. Vergleichend wurden zwei weitere Inhibitoren untersucht. Zum einen der PI3K-Inhibitor LY 294002, der die Lokalisierung des EVH1-Bindungspartners RAPH1 in die Leitfront verhindern soll und zum anderen der FAK-Inhibitor PF-573 228, der die Reifung der fokalen Komplexe zu fokalen Adhäsionspunkten inhibiert. Es wurde gezeigt, dass LY 294002 eine Inhibierung der Chemotaxis, vergleichbar mit der DMSO-Kontrolle ohne Lockstoffgradient, 100 µM **1b** und 10 µM **2b** zeigt. PF-573 228 inhibiert, wie 100 µM **2b**, die Migration an sich.

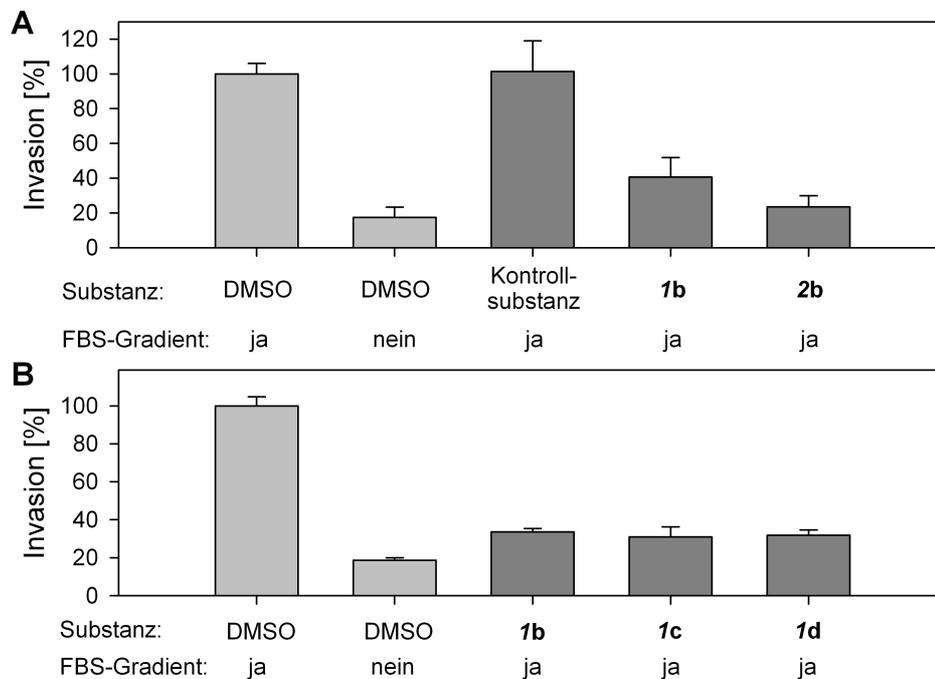


Abb. 3.22 EVH1-Inhibitoren und die Invasion von MDA-MB-231

Betrachtung der Invasion. Migration durch extrazelluläre Matrix (Matrigel™) entlang eines Lockstoff-Gradienten (FBS) in der Boyden-Kammer. Kontrollen (hellgraue Balken) in Anwesenheit eines Lockstoffgradienten (links) und ohne (rechts). Die Testsubstanzen (dunkelgraue Balken) zeigen keinen Einfluss auf die Invasion im Falle der Kontrollsubstanz bzw. eine Reduktion um etwa 60% (Inhibitor **1b**) und 80% (Inhibitor **2b**). Letztere ist vergleichbar mit der Invasion bei nichtvorhandenem Lockstoffgradienten. (A) Die C-terminale Modifikation der Inhibitoren [Ethyl (**1b**), Amid (**1c**) und Methyl (**1d**)] hat keinen Effekt auf die Wirksamkeit der Inhibitoren. Alle drei Varianten zeigen den gleichen Effekt. (B) Drei unabhängige Replikate, gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

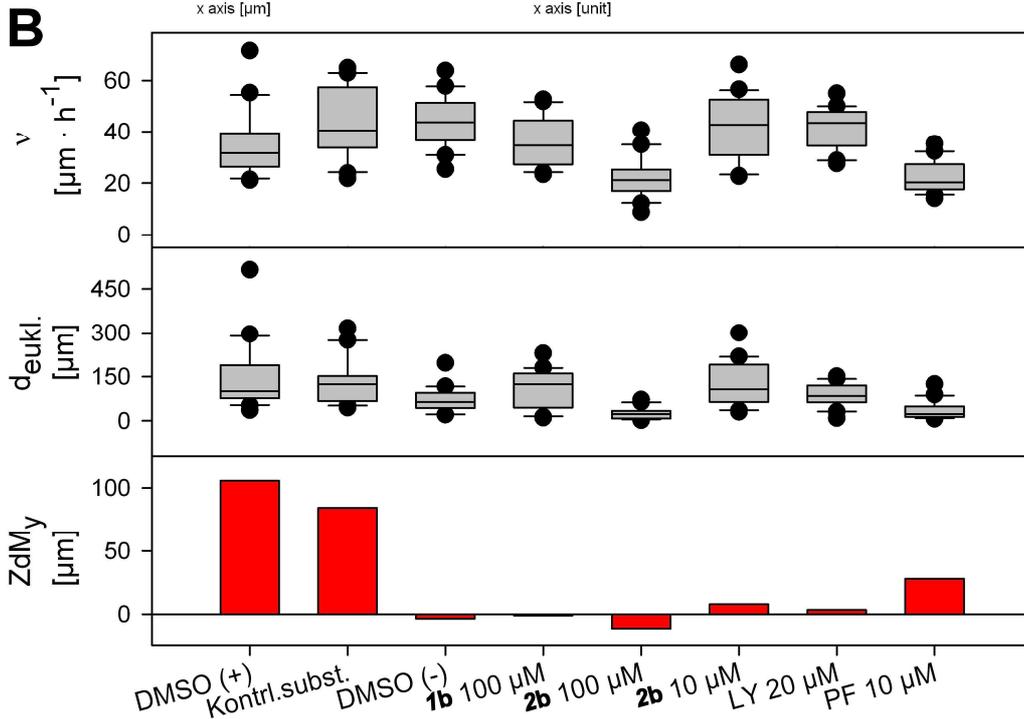
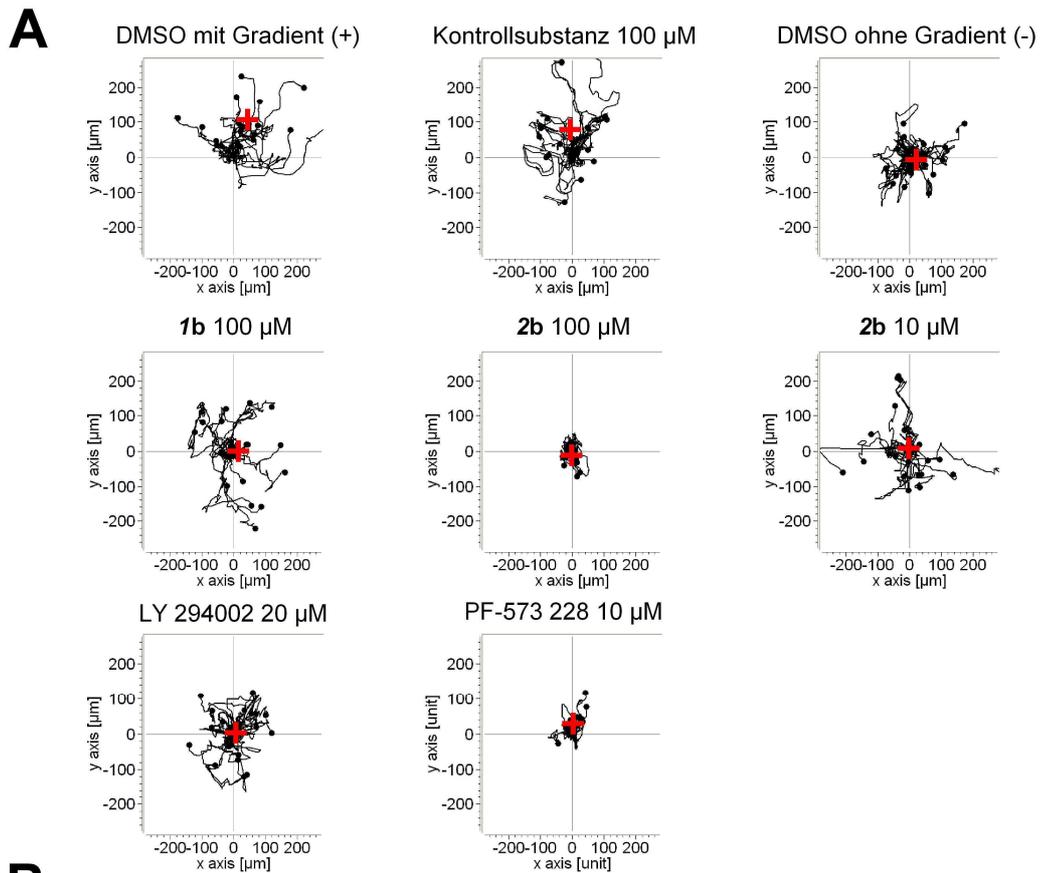


Abb. 3.23 Trajektorien der Migration

Echtzeitbeobachtung der Migration entlang eines Lockstoffgradienten. A: Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle mit ihrem migrierten Weg als schwarze Linie. Startpunkt der Migration ist der Koordinatenursprung. Das Zentrum der Masse (rotes Kreuz) ist der Mittelpunkt aus allen Messpunkten der Gesamtheit der gemessenen Zellen (20 Zellen pro Kondition). Die

Kontrollen mit Lockstoffgradient (DMSO [oben links] und Kontrollsubstanz [oben mitte]) migrieren entlang des Gradienten nach oben. Das Zentrum der Masse ist in Richtung des Lockstoffgradienten verschoben. Die Negativ-Kontrolle zur Chemotaxis ohne Lockstoffgradient (oben rechts) zeigt die ungerichtete Migration. Das Zentrum der Masse bleibt bei null. Die Inhibitoren **1b** bei 100 μm (Mitte links) und **2b** bei 10 μm (Mitte rechts) sowie der PI3K-Inhibitor LY 294002 (unten links) sind vergleichbar mit der Probe der Negativ-Kontrolle zur Chemotaxis (oben rechts). Diese Verbindungen inhibieren die Chemotaxis. Das Zentrum der Masse bleibt gegen null. Der Inhibitor **2b** bei 100 μm zeigt ebenso keine Chemotaxis. Das Zentrum der Masse bleibt gegen null. Jedoch weist sie im Vergleich zu den restlichen, bisher genannten Konditionen auch eine deutlich verringerte Migration selbst auf. Dies ist vergleichbar mit dem FAK-Inhibitor PF-573 228 (unten Mitte). Diese Kondition jedoch zeigt einen Anstieg im Zentrum der Masse; B: Auswertung der Trajektorien. Bei der mittleren Geschwindigkeit der Zellen (oben) und dem euklidischen Abstand, dem erreichten Abstand der Zellen zum Koordinatenursprung, (Mitte) zeigen nur der Inhibitor **2b** bei 100 μM und der FAK-Inhibitor signifikante Unterschiede. Das Zentrum der Masse (unten) bleibt gegen null bei der Negativ-Kontrolle zur Chemotaxis, den Inhibitoren **1b** und **2b** bei 100 μM bzw. 10 μM und dem PI3K-Inhibitor. Der FAK-Inhibitor zeigt eine geringe Tendenz zur Chemotaxis. Drei unabhängige Replikate, Daten im Box-Whisker-Diagramm (grauer Kasten [50% der Messpunkte] mit durchgezogener Linie [Median]. Der Bereich zwischen den Whiskern beinhaltet 95% der Messpunkte. Schwarze Punkten stellen Ausreißer dar.).

3.10 Die neuartigen Inhibitoren der Ena/VASP-EVH1-Domäne als *chemical tool*: Validierung neuer Interaktionspartner

Unter Verwendung des Inhibitors *I*, wurde im ^{18}O -Massenspektrometrie-Versuch (3.4) neben bereits bekannten Interaktionspartnern auch der WAVE2-Proteinkomplex gefunden. Unklar ist jedoch, wie dieser Komplex mit EVH1 interagiert. WAVE2 ist das einzige Protein in diesem Komplex, das wahrscheinliche EVH1-bindende Sequenzen enthält. Gemäß dem Kernmotiv [F/W/L/Y]P. ϕ P, das von EVH1 erkannt wird, weist WAVE2 zwei LPPPP, ein FPPHP und ein YPPPP Motiv auf. Mittels Epitopkartierung soll die genaue Interaktionssequenz ermittelt werden. Zur Validierung dieser Interaktion soll die Bindungskonstante vom identifizierten WAVE2-Peptid mit der eines bekannten EVH1-Interakteurs verglichen werden.

3.10.1 Epitopkartierung

Zur Identifizierung der EVH1-Domänen-bindenden Sequenz in WAVE2 wurde eine Epitopkartierung herangezogen. Hier wird die prolinreiche Sequenz von WAVE2 in Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren zerlegt, wobei ein Peptid immer zwei Aminosäuren mit dem vorhergehenden Peptid überlappt. Diese Peptide wurden punktweise auf einer Papiermembran synthetisiert. Die so genannten Spot-Arrays werden mit der jeweiligen EVH1-Domäne inkubiert. Die durch Bindung an eine Peptidsequenz angereicherten Proteine werden immunologisch nachgewiesen. Im Ergebnis zeigt sich, dass EVH1 direkt mit der Sequenz SEDNLPPPPAEFS von WAVE2 interagiert (Abb. 3.24A). Unter allen möglichen Motiven ist es das einzige, das negativ geladene Aminosäuren vor und hinter dem Kernmotiv als flankierende Epitope aufweist. Die Spots in Abbildung 3.24B zeigen, wie wichtig diese flankierenden Epitope für die EVH1-Bindung sind. Die anderen beiden WAVE-Familienmitglieder (WAVE1 und 3) weisen die identifizierte Sequenz nicht auf.

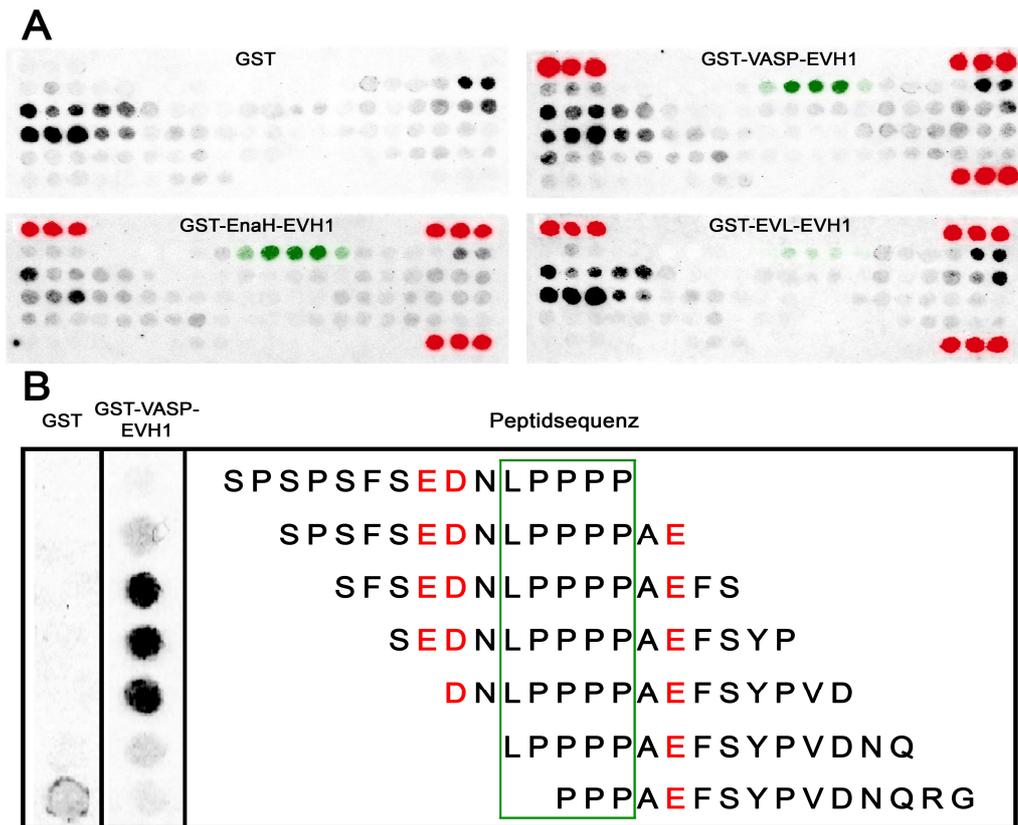


Abb. 3.24 Epitopkartierung der prolinreichen Sequenz von WAVE2 mit EVH1-Domänen
 (A) Far-Western Blot von Spotmembranen. GST allein als Negativ-Kontrolle. Positiv-Kontrollspots ActA (rot) und EVH1-spezifische Interaktionen (grün). (B) Ausschnitte aus einem Far-Western Blot. Von links nach rechts: Kontrollspots mit GST inkubiert; Spots mit GST-VASP-EVH1 inkubiert; korrespondierende Peptidsequenzen. In rot sind negativ geladene Aminosäuren in flankierenden Epitopen gekennzeichnet. Der grüne Rahmen markiert das EVH1-Kernmotiv.

3.10.2 Bestimmung von Bindungskonstanten

Die Epitopkartierung zeigte die direkte Interaktion einer Peptidsequenz von WAVE2 mit den EVH1-Domänen. Mittels ITC wurden hier die K_D -Bestimmungen für die Peptide aus RAPH1, einem natürlichen Bindungspartner, und WAVE2 an die VASP-EVH1-Domäne durchgeführt (Tab. 3.3; Abb. 3.25). Im Rahmen der gegebenen Messunsicherheit (95%CI) unterscheiden sich die beiden Bindungskonstanten von $100 \mu\text{M}$ für das RAPH1-Peptid und $240 \mu\text{M}$ für das WAVE2-Peptid nicht voneinander. Es ist davon auszugehen, dass WAVE2 mit der hier gefundenen Sequenz direkt mit EVH1 unter natürlichen Bedingungen interagiert.

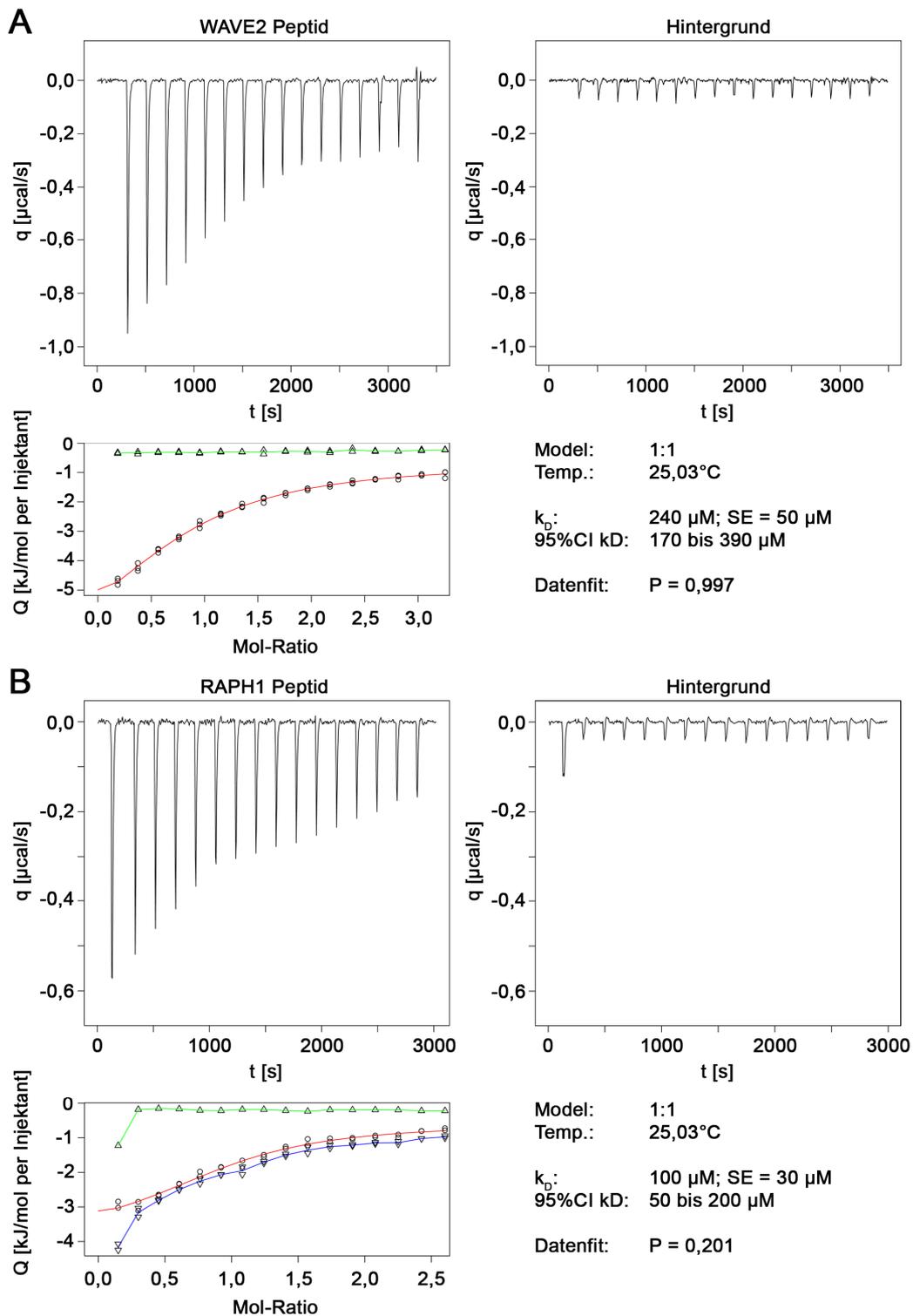


Abb. 3.25 ITC Daten des WAVE2- und RAPH1- Peptids

(A) WAVE2-Peptid: Ac-SFSEDNLPPPPAEFS-NH₂ und (B) RAPH1-Peptid: Ac-SDFPPPPPETEL-NH₂. (oben) Titration: Peptid in VASP-EVH1 (links) und Peptid in Puffer als Hintergrund (rechts); (unten links) Wärmediagramm mit Datenfit: Hintergrund (grün), Messung (blau) und Differenz (rot); (unten rechts) statistische Daten. Die Auswertung erfolgte mittels R und einem Script von R. Opitz.

Protein	Peptid	$K_{D, \text{VASP-EVH1}}$
WAVE2	Ac-SFSEDNLPPPPAEFS-NH ₂	240 (50) μM
RAPH1	Ac-SDFPPPPPETEL-NH ₂	100 (30) μM

Tab. 3.3 Bindungskonstanten ermittelt via ITC

Vergleich der Bindungskonstante des identifizierten WAVE2-Peptids mit einem Peptid aus dem bekannten Bindungspartner RAPH1.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 EVH1-Bindungspartner: Charakterisierung und Konkurrenz mit den neuen EVH1-Inhibitoren *in vitro* und *in cellulo*

Zur Untersuchung der Bindungspartner und deren Verdrängung von der EVH1-Domäne wurden die rekombinant hergestellten, GST-markierten Proteine GST-EnaH-EVH1, GAST-VASP-EVH1 und GAT-EVL-EVH1 herangezogen. In einem initialen Funktionstest (Abb. 3.3) zeigte sich, dass alle Proteine an ihr Epitop, eine Peptidsequenz aus ActA, binden können, jedoch GST-EVL-EVH1 das einzige Protein ist, das von diesen Peptiden auf einer Spotmembran nicht wieder verdrängt werden kann. Affinitätsunterschiede innerhalb der Domänen an die Peptidsequenz sind hierbei auszuschließen, da sowohl das ActA-Peptid als auch die Liganden mit nur sehr geringen Unterschieden an alle drei Domänen binden (Abb. 1.8). Es wird vermutet, dass das Protein bei der Aufkonzentration, sowohl an den ActA-Spots als auch später an den im Pulldown verwendeten Glutathionsepharosebeads aggregiert und für die Bindung an seine Partner nicht mehr zur Verfügung steht.

Das Oberflächenprotein ActA von *Listeria monocytogenes* ist der natürliche Bindungspartner mit der höchsten Affinität an die EVH1-Domänen. FPPPP-

beinhaltenden ActA-Peptide sind dazu in der Lage, die natürlichen Bindungspartner der EVH1-Domänen zu kompetitieren (Niebuhr *et al.* 1997; Prehoda *et al.* 1999). Während ActA-Peptide mit etwa 20 μ M an die EVH1-Domänen binden (Opitz *et al.* 2015), ist die Affinität der hier gezeigten EVH1-Inhibitoren (Abb. 1.8) an die EVH1 etwa 30-fach höher. Wie es demnach zu erwarten stand, sind auch diese Inhibitoren dazu befähigt, natürliche Bindungspartner wie Zyxin und RAPH1 von den Domänen zu verdrängen, was der Pulldownversuch in Abbildung 3.6 zeigt.

In einem Pulldownexperiment mit proteomweitem Ansatz und dem Inhibitor **I** wurde weiterhin das Interaktionsmuster der EVH1-Domänen in der metastasierenden Zelllinie MDA-MB-231 untersucht. Neben bekannten Interaktionspartnern (Tab. 3.1) konnten hierbei auch die Formine INF2 und DIAPH1 sowie der gesamte WAVE2-Komplex als durch den Inhibitor **I** von der EVH1 verdrängte Proteine identifiziert werden.

Es ist bekannt, dass die EVH1-Domäne der Ena/VASP-Proteine direkt mit der FH2-Domäne der Formine Dia und mDia2 interagiert (Bilancia *et al.*, 2014; Barzik *et al.* 2014). Ena/VASP-Proteine regulieren so die Länge, protrusive Persistenz und Zell-Substrat-Kontakte und damit die Entstehung von fokalen Adhäsionen in den Filopodien. Das Formin mDia2 ist jedoch auch gebunden am WAVE2-Komplex. Dieser wirkt inhibierend auf die Funktion von mDia2 zur Filopodienbildung (Beli *et al.* 2008, Schirenbeck *et al.* 2005; Block *et al.* 2008). Es ist zu klären, ob die Formine INF2 und DIAPH1 ebenso direkt mit der EVH1 oder mit WAVE2 interagieren wie das mDia2. Wären sie WAVE2 assoziiert, so würde die Verdrängung von WAVE2 im Pulldownexperiment ebenso zu einer Forminverdrängung führen. Diese Untersuchung ist jedoch nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit und stellt ein interessantes, zukünftiges Projekt dar.

Die Interaktion der EVH1 mit dem WAVE2-Komplex wird bestätigt durch kürzlich erschienene Publikationen. Zum einen konnte Chen *et al.*, 2014 zeigen, dass der WAVE2-Komplex mit EVH1 interagiert, wobei das Augenmerk auf Abi1 lag, das mit seiner prolinreichen Sequenz und einem

atypischen EVH1-Motiv Ena/VASP-Proteine in den WAVE2-Komplex rekrutiert und so die Zellmigration fördert. Über die Abi1-SH3-Domäne und die EVH1-Domäne kann diese Maschinerie an RAPH1 binden und so an die Leitfront rekrutiert werden (Krause *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2013). Eine Abi1-Mutante, die keine Interaktion zu EVH1 herstellen kann, führt jedoch nicht zu einer Delokalisierung von Ena/VASP aus der Leitfront der untersuchten Zellen. Folglich ist diese gefundene Interaktion nicht allein verantwortlich für die Rekrutierung von Ena/VASP in die Leitfront migrierender Zellen. Kürzlich konnte Havrylenko *et al.*, 2015 die in dieser Arbeit identifizierte, direkte Interaktion zwischen WAVE2 und EVH1 bestätigen. Die Autoren vermuten, dass WAVE2 mit seiner prolinreichen Sequenz direkt mit EVH1 interagiert und so die Arp2/3-basierte Aktinpolymerisation und die damit verbundene Migration verstärken. Unklar blieb in dieser Arbeit jedoch, welches WAVE-Sequenzmotiv mit der EVH1 interagiert. Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen, und so konnte mittels Epitopkartierung des prolinreichen Segmentes des WAVE2 das Peptid SFSEDNLPPPPAEFS als EVH1-interagierende Sequenz gefunden werden (Abb. 3.24). Innerhalb der WAVE-Familie ist WAVE2 allerdings das einzige Protein mit dieser Sequenz. Demnach könnten WAVE1 und 3 nicht mit EVH1 interagieren. Diese Proteine wurden in der proteomweiten Untersuchung auch nicht gefunden. Andere potentiell EVH1 bindende Peptide im WAVE2 mit dem Kernmotiv [F/W/L/Y]P.ϕP zeigten jedoch keine Interaktion mit der EVH1. Ihnen fehlt die negative Ladung vor und hinter dem Kernmotiv. Diese Ladungen sind ebenfalls wichtig für die EVH1-Interaktion (Ball *et al.* 2000).

Beim Far-Western Blot der Epitopkartierung werden jedoch unnatürlich hohe Konzentrationen der beteiligten Proteine eingesetzt. Damit bleibt es fraglich, ob eine so identifizierte Interaktion auch unter natürlichen Konzentrationen besteht. Um eine Information darüber zu erhalten, ob die gefundene Interaktion auch von biologischer Bedeutung ist, wurde die Affinität des WAVE2-Peptides verglichen mit der eines Peptides aus RAPH1, dessen Bindung biologisch bestätigt ist. Die mittels ITC bestimmten Affinitäten (Abb. 3.25) unterscheiden sich unter der gegebenen Messunsicherheit nicht voneinander. Es ist demnach davon auszugehen, dass die hier gefundene Interaktion auch unter natürlichen Bedingungen zu Stande kommen kann.

Mittels der Immunfluoreszenztechnik konnte die Lokalisierung der Ena/VASP-Proteine auch *in cellulo* untersucht werden. Dazu wurde in den Zelllinien HCT-116 (Darmkrebs) und MDA-MB-231 (Brustkrebs) das Protein VASP angefärbt. VASP befindet sich bei beiden Zelllinien in den fokalen Adhäsionspunkten und bei MDA-MB-231 zusätzlich in der Leitfront der Scheinfüßchen. Um eine Verdrängung aus diesen Kompartimenten beurteilen zu können, wurden bestimmte Marker mit angefärbt. Dies sind im Falle der fokalen Adhäsionspunkte das Protein Zyxin und in der Leitfront das Protein RAPH1, welche beide auch direkte Bindungspartner der EVH1-Domänen sind. Die Behandlung der Zellen mit den EVH1-Inhibitoren führte zu keiner Veränderung in der Lokalisierung der Markerproteine in den Zellen, wohl aber in der Lokalisierung von VASP. Es konnte sowohl aus den fokalen Adhäsionspunkten als auch aus der Leitfront verdrängt werden. Der neu identifizierte Bindungspartner WAVE2, dessen Lokalisierung ebenfalls betrachtet wurde, blieb jedoch unbeeinflusst in der Leitfront der Scheinfüßchen. Wie bei RAPH1 auch, ist bekannt, dass WAVE2 über die Bindung an Phospholipide in die Leitfront rekrutiert werden kann. Die Fähigkeit des WAVE2-Komplexes, gemeinsam mit Arp2/3 bestehende Aktinfilamente an die Membran zu binden, zu verzweigen und zu verlängern wird durch die Anwesenheit der Ena/VASP-Proteine massiv verstärkt und so lamellipodiale Protrusionen ausgebildet (Havrylenko *et al.*, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die EVH1-Inhibitoren WAVE2 zwar nicht aus der Leitfront verdrängen, jedoch VASP als Aktivator des WAVE2-Komplexes massiv aus der Leitfront delokalisiert. Die WAVE2-Komplex-Aktivität ist damit vermutlich eingeschränkt.

4.2 Phänotypische Veränderungen von EVH1-Inhibitor-inkubierenden Zellen

Ein bedeutender Phänotyp fiel beim *Knockout* aller Ena/VASP-Proteine in der Maus auf. Er führte zu mangelhafter Endothelbarrierefunktion und damit einhergehend zu Einblutungen und embryonaler Letalität der Tiere (Furman *et al.* 2007). Ena/VASP-Mitglieder scheinen also eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten zu spielen. Zell-Zell-Kontakte sind

wichtige Kompartimente und kommen bei allen mehrzelligen Lebewesen vor. Sie werden durch Zelladhäsionsmoleküle gebildet und spielen eine wichtige Rolle für das Zusammenhängen von Gewebe, bei der Weiterleitung von Signalen zwischen den Zellen und bei der Ausbildung der Polarität einer Zelle. Es handelt sich hierbei um transmembrane Proteinkomplexe, welche auf der Außenseite mit den Komplexen anderer Zellen interagieren und auf der Innenseite mit dem corticalen Aktinnetzwerk verknüpft sind. Bei den so entstehenden Kontakten unterscheidet man drei Arten. Dies sind Barrierekontakte (*Tight junctions*), welche den Zellzwischenraum verschließen, Adhäsionskontakte (*Adherens junctions*), sie verankern die Zellen eines Gewebes und schließlich die Kommunikationskontakte (*Gap junctions*), sie ermöglichen die Signalweiterleitung. Da diese Komplexe auf der Zellinnenseite mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind, ist es interessant zu prüfen, ob die Inhibition der Ena/VASP-EVH1-Domäne einen Einfluss auf die Ausbildung dieser Kontakte hat.

Die Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte, in diesem Falle der Barrierekontakte, mittels Lokalisationsstudie des Barrierekontaktproteins ZO1 zeigte bei HCT-116-Zellen keinen Unterschied in der Rekrutierung von ZO1 in Regionen der Zell-Zell-Kontakte zwischen EVH1-Inhibitorbehandelten Zellen und der Kontrolle (Abb. 3.18). Die Interaktion zwischen α II-Spectrin-SH3 und der prolinreichen Sequenz von VASP selbst in den Zell-Zell-Kontakten ist beschrieben (Benz *et al.*, 2008). Ena/VASP scheint also EVH1-unabhängig in diese Regionen rekrutiert zu werden. Dies wird durch den vorliegenden ZO1-Versuch mit den HCT-116 Zellen bestätigt. Wir erwarten daher, dass die Inhibierung der EVH1-Domänen mittels unserer Liganden im Tierexperiment nicht zu den oben beschriebenen dramatischen phänotypischen Effekten führt.

Da die Ena/VASP-Proteine Aktinpolymerisierung bewirken, ist das Erscheinungsbild der Aktinfilamente im Aktinzytoskelett ein weiteres phänotypisches Merkmal, das hier beobachtet werden konnte. Stressfasern sind ein wesentlicher Bestandteil des Aktinzytoskeletts. Sie sind kontraktile Strukturen in Nicht-Muskelzellen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Morphogenese und Mechanotransduktion. Damit nehmen sie auch Einfluss auf die Migrationseigenschaften einer Zelle. Entstehung, Ausbau

und Reparatur dieser Fasern werden durch die Proteine Palladin und Zyxin reguliert. Beide sind stressfaserassoziiert und rekrutieren Ena/VASP-Familienmitglieder via EVH1-Interaktion. Durch Anticapping und Aktinfilamentelongation leisten Ena/VASP-Proteine ihren Beitrag zum Erhalt der Stressfasern (Gateva *et al.*, 2014; Smith M.A. *et al.* 2010; Drees, B. *et al.* 2000). Die Auswertung der Stressfasern in HCT-116-Zellen ergab, dass die Hälfte der beobachteten Zellen keine Stressfasern mehr aufweisen, wenn sie mit EVH1-Inhibitoren inkubiert werden (Abb. 3.19). Die EVH1-Domäne ist demnach direkt, regulatorisch in diesem Prozess involviert.

Die Größe einer Zelle wird durch ihr Aktinzytoskelett bestimmt. Scheinfüßchen an der Zelle vergrößern sie. Lamellipodien sind eine besondere Art der Scheinfüßchen. Es handelt sich hierbei um Ausstülpungen der Zellmembran, welche aus einem dichten und stark verzweigten Aktingerüst bestehen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zellpolarität von migrierenden Zellen und beeinflussen die Richtung der Migration. Gebildet werden sie durch die Kopplung von Aktinfilamenten an die Zellmembran in der so genannten Leitfront. Die weitere Verlängerung und vor allem Verzweigung des neu entstehenden Aktingerüsts schiebt dabei die Membran voran. Dieser Prozess der Protrusion wird reguliert durch einen Multiproteinkomplex in der Leitfront der Lamellipodien. Die Lamellipodien-dynamik wird kontrolliert über RAPH1. Im Zuge der Signaltransduktion wird RAPH1 phosphoryliert und über PI(3,4)P₂ an die Membran rekrutiert. Hier bringt RAPH1 über die Bindung an Ena/VASP die Synthesemaschinerie in Gang (Krause *et al.*, 2004). Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Ausbildung von fokalen Komplexen im Lamellipodium. Sie verbinden es mit der Matrix und geben ihm Stabilität. Ena/VASP aktiviert sowohl den WAVE2-Komplex, der via Arp2/3 die starke Verzweigung des Aktins bewirkt, als auch die Bildung fokaler Komplexe zusammen mit RIAM (Goult *et al.*, 2013). RIAM interagiert mit Ena/VASP über eine prolinreiche Sequenz an EVH1. Im Pulldown-Versuch konnte gezeigt werden, dass auch diese Interaktion mit den EVH1-Inhibitoren unterbunden wird (Tab. 3.1). Die Inhibierung der Ena/VASP-Interaktionen zu RAPH1, WAVE2 und RIAM lässt eine verringerte Ausbildung der Lamellipodien und damit einhergehend eine kleinere Zellgröße

erwarten. In der Abbildung 3.20 ist die Größe der Zellen dargestellt. Sie verringert sich bei Behandlung mit **1b** sowie **2b** gleichermaßen um etwa 30%. Die Abnahme der Zellgröße korreliert damit mit der Delokalisierung von Ena/VASP aus der Leitfront. Hier zeigt sich, dass die Inhibitoren **1b** und **2b** ebenso gleichermaßen VASP verdrängen (Abb. 3.16). Die Abnahme der Zellgröße geht nicht einher mit der Verdrängung von VASP aus den fokalen Adhäsionspunkten, denn hier unterscheidet sich der Effekt zwischen **1b** und **2b**. Es ist demnach davon auszugehen, dass die Protrusion der Leitfront die Hauptrolle bei der Kontrolle der Zellgröße übernimmt, nicht die fokalen Adhäsionspunkte.

Um die Rolle der fokalen Adhäsionspunkte bei der Migration der Zelle betrachten zu können, muss untersucht werden, ob die beobachtete Verdrängung von VASP aus den fokalen Adhäsionspunkten einen Einfluss auf die Zelle in Bezug auf ihre Adhärenz an extrazelluläre Matrix hat. Eine nicht adhärenzte Zelle ist per se schon nicht mehr zur Migration befähigt und Prozesse in der Zelle könnten nicht mehr beurteilt werden. Die Abbildung 3.21 zeigt, dass es keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und den Inhibitoren in Hinblick auf das Adhärenzverhalten gibt.

4.3 Ena/VASP-Proteine als zentraler Knotenpunkt in der Migration

Die Migration einer Zelle benötigt die Protrusion der Membran durch so genannte Scheinfüßchen sowie die Verankerung dieser Protrusionen an ein stabilisierendes Substrat. Zwei Arten der Protrusion sind hierbei entscheidend und führen auch zu zwei Unterarten der Migration. Formine, welche gebündeltes und unverzweigtes F-Aktin produzieren, bringen die Filopodien hervor und bewirken die filopodiengetriebene Migration. Der Arp2/3-Komplex hingegen ist verantwortlich für ein breit gefächertes und verzweigtes Aktinnetzwerk in den Lamellipodien und führt zur lamellipodiengetriebenen Migration. Dies erklärt, warum sowohl der Arp2/3-Inhibitor CK-666 als auch der Formin-Inhibitor SMIFH2 eine Zelle in ihrer Migration nicht effektiv inhibiert (Suraneni *et al.* 2014; Isogai *et al.* 2015). Interessant ist nun neben

den Forminen und dem Arp2/3-Komplex die Funktion der dritten Proteinfamilie, welche die Aktinpolymerisierung bewirkt, die Ena/VASP-Familie.

Mit der EVH1-Domäne interagieren Ena/VASP-Proteine mit RIAM, um in einem Komplex mit Rap1 und dem Integrin $\beta 1$ die Bildung eines fokalen Komplexes zu initiieren (Worth *et al.* 2010). Weitere Proteine, die dem Komplex beitreten, wie etwa das ebenfalls mit EVH1 interagierende Zyxin (Zaidel-Bar *et al.* 2004) und die fokale Adhäsionskinase (FAK) (Wang *et al.* 2005) bewirken die Reifung des Komplexes zu einem fokalen Adhäsionspunkt (FA) in den Lamellipodien. An der Wurzel eines Filopodiums wird die Bildung eines FA zusätzlich durch die Interaktion der Formine mit der EVH1 reguliert. Ohne Ena/VASP sind Filopodien zwar länger, dafür aber instabil, ohne protrusive Persistenz und ohne FA (Barzik *et al.* 2014; Goult *et al.*, 2013).

In den Lamellipodien reguliert das Protein WAVE2 die Arp2/3-Aktivität (Sarmiento *et al.* 2008). Wie in dieser Arbeit gezeigt, interagiert es direkt mit EVH1. Über das Protein Abi1, mit dem es im WAVE2-Komplex kooperiert, bindet es RAPH1. Diese Interaktion ist mitverantwortlich für die Rekrutierung des Komplexes an die Plasmamembran (Law *et al.* 2013). RAPH1 wiederum bindet ebenfalls EVH1 (Krause *et al.* 2004). Die Aktivierung und Rekrutierung von RAPH1 und WAVE2 erfolgt über kleine GTPasen und die Bindung an Phospholipide in der Membran (Krause *et al.* 2004; Suetsugu *et al.* 2003) und gehören damit zu den Effektoren der Signalkaskaden von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen.

Ena/VASP-Proteine und speziell ihre EVH1-Domäne ist also an jedem genannten Schritt beteiligt. Sowohl bei der Verankerung der Protrusionen in fokalen Komplexen und in Adhäsionspunkten als auch bei der Protrusion der Scheinfüßchen in der filopodien- und lamellipodiengetriebenen Migration spielen sie eine Rolle.

Inhibiert man die EVH1-Domänen in der metastasierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-231, so ist zu beobachten, dass Ena/VASP sowohl aus den FA als

auch aus der Leitfront der Scheinfüßchen delokalisiert. Innerhalb der Inhibitoren gibt es jedoch Unterschiede. Beide Inhibitoren **1b** und **2b** verdrängen zwar VASP gleichstark aus der Leitfront, jedoch ist **2b** bedeutend effektiver in der Verdrängung von VASP aus den FA (Abb. 3.16). Ena/VASP muss also mit unterschiedlichen Affinitäten in der Leitfront und in den fokalen Adhäsionspunkten lokalisiert sein. Die Invasion der Zellen durch eine extrazelluläre Matrix wird durch den Inhibitor **2b** ebenfalls stärker beeinflusst als durch **1b** (Abb. 3.22). Die Echtzeitbeobachtung der Migration gibt mehr Aufschluss darüber wie die Inhibitoren wirken. Während **1b** die Chemotaxis, also die gerichtete Migration der Zellen, nicht aber die Beweglichkeit selbst inhibiert, so vermag **2b** sowohl die Chemotaxis als auch die Migration per se zu beeinflussen (Abb. 3.23).

Gemein ist beiden Inhibitoren, mit gleicher Stärke VASP aus der Leitfront zu verdrängen sowie die Inhibition der Chemotaxis. Aus den fokalen Adhäsionspunkten verdrängt **2b** VASP bedeutend stärker als **1b**. Nur **2b** ist auch dazu in der Lage die Bewegung der Zellen an sich zu inhibieren. Diese Befunde lassen die Interpretation zu, dass Ena/VASP in der Leitfront die Chemotaxis steuert und in den fokalen Adhäsionspunkten die Migration selbst. Zum Beweis dieser These wurden zwei weitere Inhibitoren eingesetzt. LY 294002 ist ein Inhibitor der PI3K. Sie generiert Phospholipide in der Zellmembran, an welches RAPH1 bindet und die Maschinerie der Aktinsynthese rekrutiert. Sein inhibierender Einfluss auf die Invasion von MDA-MB-231 ist bereits beschrieben worden (Takahashi und Suzuki, 2011). Da die PI3K *upstream* der Ena/VASP in der Leitfront liegt, ist zu erwarten, dass dieser Inhibitor vergleichbar mit **1b** nur die Chemotaxis inhibiert. Der zweite Inhibitor ist der PF-573 228. Er verhindert die Autophosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase am Tyrosin 387 und damit die Reifung von fokalen Adhäsionspunkten. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass dieser Inhibitor die Metastasierung von Brustkrebszellen in die Lunge inhibiert (Wendt und Schiemann, 2009). Dieser Inhibitor sollte ähnliche Effekte zeigen wie die Verdrängung von VASP aus den fokalen Adhäsionspunkten mittels **2b**. Die Ergebnisse dieses Vergleiches sind in der Abbildung 2.23 dargestellt. Beide EVH1-Inhibitoren sowie LY 294002 inhibieren die Chemotaxis. **2b** und

PF-573 228 inhibieren die Migration, wobei nur **2b** auch die Chemotaxis unterbindet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Verbindung **2b** bei geringerer Konzentration das gleiche Bild liefert wie **1b**. Die eingangs aufgestellte These konnte somit bewiesen werden. EVH1-Inhibitoren sind dazu in der Lage sowohl die Chemotaxis als auch die Migration selbst zu unterbinden. Die EVH1-Domänen der Ena/VASP-Proteine sind damit möglicherweise aussichtsreiche Zielproteine zur Inhibierung der initialen Metastasierung, die im nächsten Schritt in Tiermodellen weiter validiert werden sollten. Ein Vorteil der Ena/VASP-Proteine gegenüber anderen, eingangs diskutierten Zielen der Metastasierungsinhibition, ist ihre Stellung als letzter Regulator in den zusammenlaufenden Signalkaskaden von Rezeptortyrosinkinasen und Integrinen.

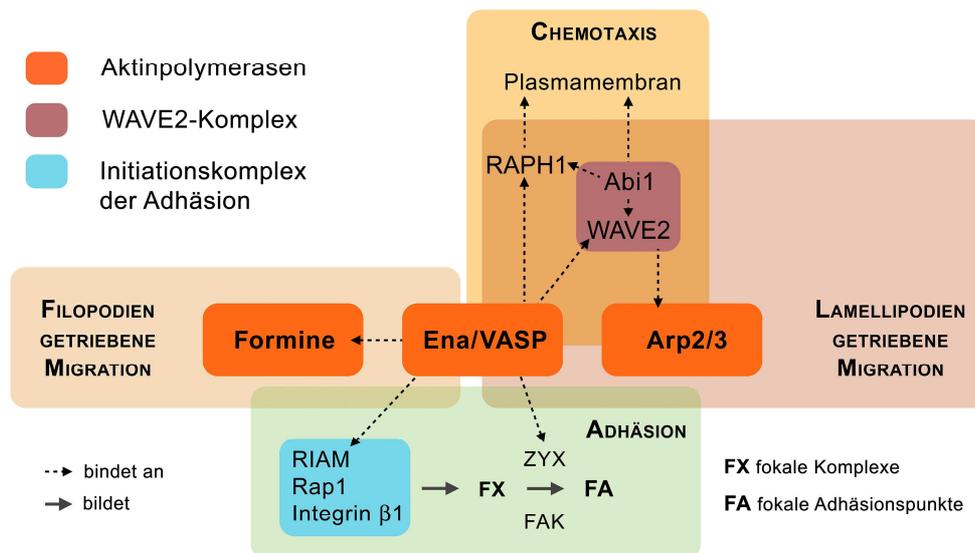


Abb. 4.1 Ena/VASP-Proteine als zentraler Knotenpunkt in der Migration

Einfluss der Ena/VASP-Proteine auf die Adhäsion und die Filopodien bzw. Lamellipodien getriebenen Migration. *Abelson interactor 1* (Abi1), Aktin-bezogenes-Protein 2 und 3 (Arp2/3), fokale Adhäsionskinase (FAK), *Ras-related protein 1* (Rap1), *Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1* (RAPH1), Zyxin (ZYX).

4.4 Pharmakologische Parameter der EVH1-Inhibitoren

In ihrer ursprünglichen Form waren die EVH1-Inhibitoren nicht zellgängig, was die Kopplung des Inhibitors *I* an das Fluorophor NBD zeigte (Abb. 3.8). Verantwortlich dafür schien die freie Carboxygruppe am C-terminus des Inhibitors zu sein. Einerseits ist es möglich, dass Zellen über Exportmechanismen für Verbindungen mit freien Carboxygruppen verfügen, welche diese mit einer höheren Geschwindigkeit aus der Zelle herausschleusen als sie hineindiffundieren können. Andererseits besteht die Möglichkeit der verhinderten Aufnahme durch Proteoglykane. Diese besitzen Glykosaminoglykane als Seitenketten, welche zu einem großen Teil aus Glucuronsäure und Sulfat-Anion verknüpften Zuckermolekülen bestehen. Sie tragen eine negative Ladung und werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Elektrostatische Abstoßung zwischen den negativen Gruppen in der Verbindung NBD-*I* und der Proteoglykane auf der Zelloberfläche könnte ein wahrscheinlicher Grund für die Störung der Zellmembranpermeabilität dieser Substanz sein. Durch Veresterung dieser freien Carboxygruppe wird die negative Ladung umgangen und die Zellgängigkeit erreicht (Abb. 3.8).

Betrachtet man sich die Kristallstruktur des Inhibitors *I* im Komplex mit der EnaH-EVH1 (Abb. 4.2), so fällt auf, dass die C-terminale Carboxygruppe von der Proteinoberfläche abgewandt in das Solvent zeigt. Prinzipiell sollten verschiedene Arten der Maskierung daher keinen Einfluss auf die Affinität zu den EVH1-Domänen haben und damit auf die Eigenschaften als Inhibitoren. Vergleichend wurde daher die Inhibierung der Invasion durch die Modifikationen als Ethyl (*Ib*), Amid (*Ic*) und Methyl (*Ic*) untersucht. In der Abbildung 3.22 wird belegt, dass die Modifikation des C-terminus keinen Einfluss auf die Wirksamkeit des Inhibitors hat.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit die EVH1- Inhibitoren sich in einem Zellmilieu als stabil erweisen. Dazu wurden Lysate von NBD-*Ib* (Ethylesterderivat) inkubierenden Zellen mittels HPLC untersucht (Abb. 3.9). Es stellte sich heraus, dass in diesem Lysat der NBD-markierte Inhibitor *Ib* in Abhängigkeit der Zeit zu der nicht zellpermeablen, aber dennoch aktiven Form

I entestert wird. Für die hier gezeigten *in vitro*-Versuche ist dies nicht als problematisch anzusehen, da diese in einem kurzen Zeitraum durchgeführt wurden. Bei zukünftig geplanten *in vivo*-Modellen jedoch wäre es angezeigt, eine stabilere Modifizierung der Inhibitoren zu verwenden. Es sei an dieser Stelle auch anzumerken, dass in den HPLC-Untersuchungen nur die Inhibitoren *I* und *Ib* identifiziert werden konnten. Neben den Peaks dieser beiden Verbindungen waren im Chromatogramm keine weiteren ersichtlich, was einer generellen Stabilität des Grundgerüsts der Inhibitoren gleichzusetzen ist.

Um zu verifizieren welche Form der Maskierung der freien Ladung an den Inhibitoren die höchste Stabilität aufweist, wurde die Bestimmung der *in vitro*-ADME-Parameter herangezogen. Hierbei zeigten sich nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Inhibitoren *Ic* und *Id* (Abb. 3.11-3.14). Die Verbindungen sind hochstabil gegenüber murinem und humanem Blutplasma. Sowohl das Amid als auch der Methylester scheinen damit stabiler zu sein als das eingehend untersuchte Ethylderivat. Weiterhin war festzustellen, dass sich die Inhibitoren durch eine sehr geringe Plasmaproteinbindung und langsame Metabolisierung in Lebermikrosomen auszeichnen. Im Caco-2-Versuch, der eine Darmepithelpermeabilität voraussagt, zeigte sich eine niedrige Permeation der beiden Inhibitoren und ein aktiver Transport konnte ausgeschlossen werden. Inwieweit die Inhibitoren jedoch in die Zellen hineindiffundieren und nicht wieder heraus, konnte bei diesem Versuch nicht betrachtet werden. Da allerdings alle Verbindungen den gleichen Effekt auf die Invasion von metastasierenden Krebszellen haben, muss davon ausgegangen werden, dass auch die Inhibitoren *Ic* und *Id* in das Zellinnere vordringen können. Für einen Tierversuch bedeutet es, dass die perorale Gabe dieser Inhibitoren kontraindiziert ist, sie sich jedoch sonst durch ein sehr stabiles Profil auszeichnen.

Ein weiterer, wichtiger Parameter der EVH1-Inhibitoren ist die Toxizität dieser Verbindungen. In einem Resazurin-Test wurde die Vitalität der Inhibitorinkubierenden Zellen untersucht (Abb. 3.10). Hierbei zeigten sowohl die Inhibitoren *Ib* und *2b* als auch die Kontrollsubstanz keinerlei Effekte auf die

Vitalität von MDA-MB-231-Zellen in der untersuchten Konzentration bis 150 μM .

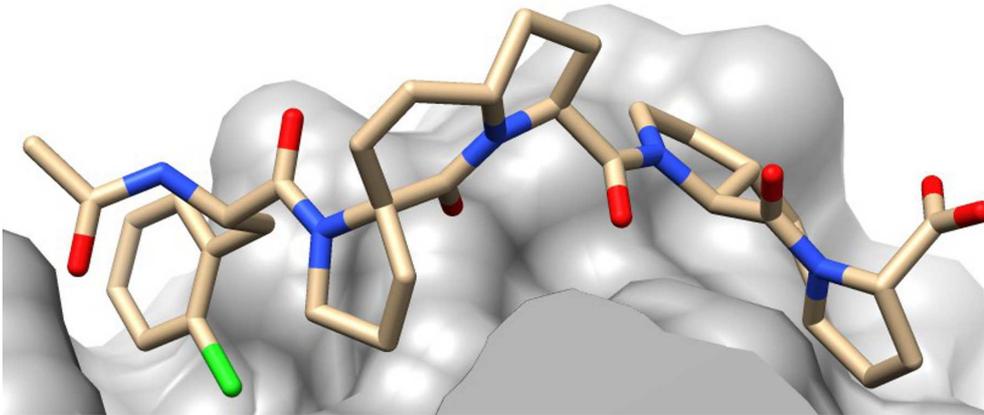


Abb. 4.2 Modifizierbarkeit der C-terminus der EVH1-Inhibitoren

Kristallstruktur von EnaH-EVH1 mit dem Inhibitor **1b** (4my6, Opitz *et al.* 2015). Die Carboxygruppe des C-terminus ist solventexponiert und damit frei modifizierbar, ohne einen Einfluss auf die Affinität an die EVH1-Domäne erwarten zu müssen.

4.5 Fazit

Tumoren, die laut histologischem Befund die Rezeptortyrosinkinase HER2 und Ena/VASP-Proteine überexprimieren, nicht jedoch den Estrogenrezeptor, zeichnen sich durch eine besonders hohe Invasivität aus (Modungo *et al.* 2012 und 2006). Bei malignen Erkrankungen mit hoher Risikowahrscheinlichkeit zur Metastasenbildung zeigte sich, dass 67% dieser Neoplasien Ena/VASP überexprimieren (Modungo *et al.* 2012). Im Gegensatz dazu zeigen nur 9% der benignen Erkrankungen mit niedriger Risikowahrscheinlichkeit Ena/VASP Überexpression (Modungo *et al.* 2006) In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass 90% der untersuchten metastasierenden Karzinome Ena/VASP-Proteine überexprimieren (Modungo *et al.* 2004). Die Familie der Ena/VASP-Proteine kann daher als Marker für die Metastasierungswahrscheinlichkeit eines Tumors angesehen werden.

Diese Arbeit zeigt, dass die Inhibition der Ena/VASP-EVH1-Domänen die Migration von Krebszellen unterbinden kann. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann so aber auch die Migration anderer Zelltypen inhibiert werden. Zum

einen können dies Zellen des Immunsystems sein, zum anderen aber auch Zellen wie Perizyten oder Endothelzellen. Letztere sind verantwortlich für die Angiogenese. Während der Morphogenese von Kapillaren ist die VASP-Expression hochreguliert (Salazar *et al.* 1999). Dies wird stimuliert durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor und Interleukin 8 (Kayisli *et al.* 2002). Diese Zellen migrieren in Tumoren und bilden neue Kapillaren zur Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die Antiangiogenesetherapie ist daher eine effektive Strategie in der Krebstherapie (siehe 1.3), da ab einer Tumorgröße von ein bis zwei Millimeter das Wachstum durch Nekrose und Apoptose aufgehalten wird (Parangi *et al.* 1996).

Die Migrationsinhibierung durch die EVH1-Inhibitoren hätte so mehrere Aspekte. Einerseits könnte verhindert werden, dass migrierende Zellen ihr Zielorgan erreichen und überhaupt erst Metastasen formen können. Andererseits haben die EVH1-Inhibitoren auch Potential, die Angiogenese und damit das Wachstum von bereits existierenden, ruhenden Mikrometastasen zu neoplastischen Läsionen im Zuge der Kolonisation (siehe 1.1.2) aufzuhalten.

Die Effekte der hier präsentierten Inhibitoren auf andere Zelltypen sowie das große Experiment des *in vivo*-Tumormodells in der Maus stehen aus und sind ein wichtiges und spannendes Vorhaben für die Zukunft. Die Optimierung der Inhibitoren für das Tiermodell ist meiner Meinung nach so weit vorangeschritten, dass sie dort ihren Einsatz finden können. Die Inhibitoren zeichnen sich aus durch eine hohe Affinität zu den Domänen, Membranpermeabilität, Blutplasma- sowie Lebermikrosomenstabilität und sind zudem nicht toxisch.

Zusammenfassung

Ein Kennzeichen der neoplastischen Erkrankung Krebs ist die Fähigkeit Metastasen auszubilden. Hierbei erfahren Zellen des Primärtumors eine Änderung in ihrem entwicklungsregulatorischen Programm. Eine bestimmte genetische Signatur dieser Änderung namens EMT beinhaltet das Hochregulieren von Proteinen, welche die Aktin-Zytoskelett-Modulierung regulieren und der Zelle damit die Fähigkeit geben zu migrieren. Eine zentrale Rolle spielt bei diesen Proteinen die Ena/VASP-Familie. Es handelt sich hierbei um Proteine, welche die Aktinfilamentsynthese regulieren. Über ihre EVH1-Domäne werden sie in bestimmte Bereiche der Zelle wie Lamellipodien, Filopodien, Invadopodien und fokale Adhäsionskontakte lokalisiert, wo sie ihren Wirkungsort haben. Eben diese Bereiche sind so essentiell für die Migration. EVH1-Domänen stellen daher ein interessantes Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren dar. Bisher ist es jedoch noch nicht gelungen, geeignete Inhibitoren zu finden. In dieser Arbeit soll ein neuer Ansatz zur Entwicklung von EVH1-Inhibitoren vorgestellt werden. Es handelt sich hierbei um neue chemische Entitäten. Zwei Proline sind hier über eine Vinyliden-Brücke in ihrer Sekundärstruktur der Polyprolin-II-Helix, dem Erkennungsmotiv der EVH1-Domänen, fixiert. Das flankierende Epitop dieses Motivs konnte gegen die unnatürliche Aminosäure 2-Chlor-Phanylalanin ersetzt werden. In Pulldown-Versuchen konnten die so erhaltenen neuen Inhibitoren die natürlichen Bindungspartner Zyxin und RAPH1 von den EVH1-Domänen verdrängen. In einem proteomweiten Ansatz dieses Versuches mit angeschlossener MS-Analyse konnten neben den bekannten EVH1-Interakteuren auch WAVE2 und die Formine DIAPH1 und INF2 als Partner identifiziert werden, die mit den Inhibitoren von den Domänen verdrängbar sind. Im Falle von WAVE2 konnte eine Epitopkartierung eine Peptidsequenz identifizieren, welche direkt mit EVH1 interagiert, was mittels ICT validiert wurde. In Zellexperimenten wurde eine Zellmembranpermeabilität erreicht, indem die negative Ladung des freien C-Terminus der peptidoiden Verbindungen mit einem Ethylester maskiert wurde. HPLC-Untersuchungen der Lysate von Zellen, welche den Inhibitor

inkubierten, zeigten einen zeitabhängigen Abbau der Inhibitoren hin zur entesterten Form. Immunofluoreszenzaufnahmen von invasiven Krebszellen wiesen signifikante Veränderungen in der Lokalisierung von Ena/VASP auf. Durch die Inhibitoren konnte das Ena/VASP-Mitglied VASP aus den Lamellipodien und fokalen Adhäsionspunkten delokalisiert werden, während die jeweiligen Bindungspartner in diesen Regionen keine Veränderung in ihrer Lokalisation erfuhren. Phänotypische Effekte der Inhibitoren sind die verminderte Anzahl von Stressfasern, eine verringerte Zellgröße sowie die Inhibition der Invasion im Boyden-Kammer-Versuch um bis zu 80%. Echtzeitbeobachtungen der migrierenden Zellen entlang eines Lockstoffgradienten zeigten, dass sowohl die Fähigkeit Chemotaxis zu betreiben, wie auch die Migration selbst durch die EVH1-Inhibitoren zum Erliegen kommen. Die Inhibition der Chemotaxis ist dabei vergleichbar mit dem Effekt eines PI3K-Inhibitors, welcher weiter oben in der Signalkaskade der Regulation der Lamellipodien wirkt. Die Migration selbst konnte genauso inhibiert werden wie durch einen Inhibitor der FAK, welcher die fokalen Adhäsionspunkte in ihrer Reifung behindert und ebenfalls weiter oben in der dazugehörigen Signaltransduktionskaskade wirkt. Bei den Ena/VASP-Proteinen handelt es sich um Proteine, die als letzte Stufe in der Aktinsynthese und Regulation der Migration und Invasion agieren. Der Vorteil der EVH1-Inhibitoren gegenüber allen anderen derzeit in der Krebsmedikation zugelassenen Medikationen und den PI3K- sowie FAK-Inhibitoren ist die Stellung der Ena/VASP-Proteine in den behandelten Signalkaskaden. Sie befinden sich am zusammenlaufenden Ende der einzelnen Kaskaden und sind somit weder durch andere Signalwege noch durch ausweichende Wege in den Kaskaden selbst umgehbar. Eventuell erwartete Effekte auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten konnten ausgeschlossen werden. Ebenso wurden die Inhibitoren hinsichtlich ihrer Toxizität untersucht, was zum Ergebnis hatte, dass keinerlei toxische Effekte zu beobachten waren. Diese Arbeit kommt zu dem Schluss, dass EVH1-Domänen der Ena/VASP-Proteine geeignete Ziele zur Entwicklung von Migrations- und Invasions-Inhibitoren sind. Ob diese Inhibitoren jedoch auch *in vivo* ihre Wirkung zeigen und die Bildung von Metastasen inhibieren können, bleibt abzuwarten und muss in entsprechenden Tierversuchen validiert werden.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Gutachtern, Prof. Dr. Christian Freund und Dr. Ronald Kühne, die es mir ermöglicht haben, an diesem spannenden Projekt zu arbeiten und die mich mit sehr guter fachlicher Betreuung in den letzten Jahren begleitet haben.

Bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für den wissenschaftlichen und auch nicht-wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Prof. Dr. H.-G. Schmalz und seinen Mitarbeitern an der Universität zu Köln danke ich für die angenehme Kooperation und die Synthese unserer Inhibitorbausteine. Der Arbeitsgruppe um Dr. Michael Beyermann und Dr. Rudolf Volkmer für die Synthese der Liganden, Peptide und Spotmembranen. Der Arbeitsgruppe um Dr. Eberhard Krause für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen. Heike Nikolenko für die Betreuung an der HPLC und ganz besonders bei Dr. Burkhard Wiesner und Jenny Eichhorst bedanke ich mich sowohl für die unendliche Betreuung in Mikroskopiefragen als auch für die Organisation der Klausurtagungen in Schmilka.

Anhang

I Publikationen

Erstautorschaft (geteilt)

Robert Opitz¹, Matthias **Müller**¹, Cédric Reuter¹ and Matthias Barone¹, Arne Soicke, Yvette Roske, Kirill Piotukh, Peter Huy, Monika Beerbaum, Burkhard Wiesner, Michael Beyermann, Peter Schmieder, Christian Freund, Rudolf Volkmer, Hartmut Oschkinat, Hans-Günther Schmalz, Ronald Kühne (2015). A modular toolkit to inhibit proline-rich motif-mediated protein-protein interactions. PNAS. 12 (16), 5011-5016.

¹ contributed equally

Koautorschaft

Zaminer J, Brockmann C, Huy P, Opitz R, Reuter C, Beyermann M, Freund C, **Müller** M, Oschkinat H, Kühne R, Schmalz HG (2010). Addressing protein-protein interactions with small molecules: a Pro-Pro dipeptide mimic with a PPII helix conformation as a module for the synthesis of PRD-binding ligands. Angew Chem Int Ed Engl. 49 (39), 7111-5.

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Aktinpolymerisierung in der Zellmigration	6
Abb. 1.2	Spontane Aktinpolymerisation	8
Abb. 1.3	Nukleationsfaktoren der Aktinpolymerisierung	10
Abb. 1.4	Elongationsfaktoren der Aktinpolymerisierung	12
Abb. 1.5	Aktinfilament-Elongation durch Ena/VASP-Proteine	15
Abb. 1.6	Schema zur systemischen Behandlung von metastasierendem Mammakarzinom	20
Abb. 1.7	Übersicht der systemischen Therapie bei Metastasierung	22
Abb. 1.8	ProM's - Strukturen und Bindungskonstanten von EHH1-Liganden	26
Abb. 3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der EVH1-Domänen.	62
Abb. 3.2	Western Blot Analyse der EVH1-Domänen	62
Abb. 3.3	Spot-Array-Analyse der EVH1-Domänen	63
Abb. 3.4	Expression von Zyxin und RAPH1 in HCT-116 und MDA-MB-231	64
Abb. 3.5	Immunofluoreszenzaufnahmen von HCT-116 und MDA-MB-231	65
Abb. 3.6	Verdrängung natürlicher Bindungspartner von den EVH1-Domänen	66
Abb. 3.7	Veranschaulichung der Identifizierung der Proteine, welche von EVH1-Domänen mittels des Inhibitors <i>I</i> verdrängt werden können	68
Abb. 3.8	Zellmembranpermeabilität	71
Abb. 3.9	Entesterung des Inhibitors NBD- <i>Ib</i> durch HCT-116	72
Abb. 3.10	Vitalitäts- Assay	72
Abb. 3.11	Plasmastabilität der EVH1-Inhibitoren	76
Abb. 3.12	Plasmaproteinbindung der EVH1-Inhibitoren	76
Abb. 3.13	Caco-2-Permeations-Versuch mit den EVH1-Inhibitoren	77
Abb. 3.14	Metabolische Stabilität der EVH1-Inhibitoren in Lebermikrosomen	77
Abb. 3.15	Delokalisierung von VASP aus den fokalen Adhäsionspunkten in HCT-116	79
Abb. 3.16	Delokalisierung von VASP aus der Leitfront und den fokalen Adhäsionspunkten in MDA-MB-231	80
Abb. 3.17	WAVE2 in der Leitfront in MDA-MB-231	82
Abb.3.18	Zell-Zell-Kontakte und die EVH1-Inhibition	84
Abb. 3.19	Einfluss der EVH1-Inhibitoren auf Stressfasern	85
Abb. 3.20	Abnahme der Zellgröße durch die EVH1-Inhibitoren	86
Abb. 3.21	Einfluss der EVH1-Inhibitoren auf das Adhärenzverhalten	87
Abb. 3.22	EVH1-Inhibitoren und die Invasion von MDA-MB-231	89
Abb. 3.23	Trajektorien der Migration	90
Abb. 3.24	Epitopkartierung der prolinreichen Sequenz von WAVE2 mit EVH1-Domänen	93
Abb. 3.25	ITC Daten des WAVE2- und RAPH1- Peptids	94
Abb. 4.1	Ena/VASP-Proteine als zentraler Knotenpunkt in der Migration	106
Abb. 4.2	Modifizierbarkeit der C-terminus der EVH1-Inhibitoren	109

III Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Liste der verwendeten Enzyme	30
Tab. 2.2	Liste der Oligonukleotide	31
Tab. 2.3	Liste verwendeter Proteine	31
Tab. 2.4	Liste der verwendeten Antikörper und Zellfarbstoffe	33
Tab. 2.5	Zusammensetzung von SDS-Gelen	47
Tab. 2.6	Einstellungen für Anregung und Emission am LSM 710 Mikroskop	59
Tab. 2.7	Verwendete Kanäle für die Anfärbungen in den einzelnen Experimenten	60
Tab. 3.1	Identifizierte Bindungspartner der EVH1-Domänen mittels Inhibitor <i>I</i>	69
Tab. 3.2	Bindungskonstanten der Inhibitoren als Ethylester-Derivate	70
Tab. 3.3	Bindungskonstanten ermittelt via ITC	95

IV Abkürzungsverzeichnis

#	Anzahl der Identifikationen der Proteine
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
2-Cl-F	2-Chloro-Phenylalanin
Abb.	Abbildung
Abi1	Abelson <i>Interactor</i> 1
Abl	Tyrosinkinase Abelson
ADAP	Adapterprotein
ADF	Aktin-Depolymerisations-Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Tyrosinkinase Abelson- <i>related gene</i>
Arp2/3	Aktin-bezogenem-Protein 2 und 3
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL5	Chemokin-Ligand 5
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanidinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
C-KIT	Tyrosinkinase-KIT (Stammzellfaktorrezeptor)
Clint	intrinsische Clearance
Cobl	Cordon-bleu
CSF-1	Kolonie stimulierender Faktor 1
C-terminal	carboxyterminal
CXCL12	Chemokin-Ligand 12
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4
DMSO	Dimethylsulfonoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	epitheliale-mesenchymale-Transition
Ena	<i>Drosophila enabeled</i>
Ena/VASP	<i>Enabeld</i> /Vasodilatator-stimulierende Phosphoprotein
EnaH	<i>Enabeld</i> human
ER	Estrogenrezeptor
Erk/MAPK	MAP-Kinase Signalweg
ESI	Eletrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EVH1	Ena/VASP-Homologie-Domäne 1
EVH2	Ena/VASP-Homologie-Domäne 2
EVL	<i>Ena/VASP like</i>
φ	aliphatische Aminosäure

FAB	F-Aktin bindendes Segment
FAK	fokale-Adhäsions-Kinase
F-Aktin	filamentöses Aktin
f _b	Plasmaproteingebundene Fraktion
FBS	fötale Kälberserum
Fe65	Amyloid beta A4 <i>precursor protein-binding family B member 1</i>
FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FH1	Formin-Homologie-Domäne 1
FH2	Formin-Homologie-Domäne 2
FLT3	fötaler-Leber-Tyrosinkinase-Rezeptor
FMP	Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GAB	G-Aktin bindendes Segment
G-Aktin	globuläres Aktin
GST	Glutathion (S)-Transferase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HER2	humaner-epidermier-Wachstumsfaktor-Rezeptor-2
HGFR	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
K _D	Dissoziations-Konstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lmod	Leiomodin
Lyn	Lck/ <i>Yes-related novel</i> Protein Tyrosinkinase
m	milli
M	Molarität (l^{-1})
mA	Milliampère
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
mDia2	<i>Mammalian Diaphanous 2</i>
MEK	<i>Mitogen-Activated-Protein-Kinase</i>
MET	mesenchymale-epitheliale-Transition
mg	Milligramm
min.	Minute
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>Mammalian-Target-Of-Rapamycin</i>
mW	Milliohm
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NBD	7-nitro-2,1,3-benzoxa-diazol-4-yl-
NIH	<i>Natioal Institutes of Health</i>
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
N-WASP	neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
OD _{280/600}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 bzw. 600 nm
P _{app}	Permeationsrate
PBS	Phosphat-Puffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	Thrompozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
PH	Pleckstrin-Homologie

Pi	anorganischem Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	cAMP-abhängige Protein-Kinase
PKB/Akt	Proteinkinase B (Akt)
PKG	cGMP-abhängige Protein-Kinase
PPII	Polyprolin II
PRD	PRS-erkennende Domäne
ProM	Prolinmimetikum
PRS	prolinreichen Sequenz
R	Rest
RAF	<i>Rat-Fibrosarcoma</i>
RAPH1	<i>Ras-Associated and Pleckstrin-Homology-Domains-containing-Protein-1</i>
RAS	<i>Rat-Sarcoma</i>
RIAM	<i>Rap1-GTP-interacting adapter molecule</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-interferenz
RT	Raumtemperatur (25°C)
SD(geo)	von der Software Mascot Distiller ermittelte Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec.	Sekunde
SH3	Src-Homologie-Domäne 3
Src	Tyrosinkinase <i>sarcoma</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TBS	Tris-Puffer
TBS-T	Trispuffer mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
U	<i>Unit</i>
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VEGF	Gefäßwachstumsfaktor
VEGFR	Vaskular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor
VEGFR	vaskulärer-endothelialer-Wachstumsfaktor-Rezeptor
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Verprolin-Homologie-Protein
WAVE2	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Verprolin-Homologie-Protein 2
WH2	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)- Homologiedomäne 2
Wt	Wildtyp
WW	WW-Domäne
WW	Domänenname, abgeleitet von zwei konservierten Tryptophanresten innerhalb der Domäne
ZO1	Zonula Occludens-1

V Literaturverzeichnis

Ahern-Djamali SM, Bachmann C, Hua P, Reddy SK, Kastenmeier AS, Walter U, Hoffmann FM (1999). Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila enabled. PNAS 96, 4977–4982.

Ahuja, R. *et al.* (2007) Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. Cell 131, 337–350.

Applewhite DA, Barzik M, Kojima S, Svitkina TM, Gertler FB, Borisy GG (2007). Ena/VASP proteins have an anticapping independent function in filopodia formation. Mol Biol Cell 18, 2579–2591.

Arden, Lavik, Rubinic, Chiaia, Khuder, Howard, Nestor-Kalinoski, Alberts, and Eisenmann (2015). Small-molecule agonists of mammalian Diaphanous-related (mDia) formins reveal an effective glioblastoma anti-invasion strategy. Molecular Biology of the Cell, 26(1), 3704-3718.

Aszodi, A. *et al.* (1999). The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. EMBO J. 18, 37-48.

Bachmann C, Fischer L, Walter U, Reinhard M (1999). The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. J Biol Chem. 274, 23549–23557.

Bae YH, *et al.* (2010). Profilin1 regulates PI(3,4)P2 and lamellipodin accumulation at the leading edge thus influencing motility of MDA-MB-231 cells. PNAS 107 (50), 21547–21552.

Ball LJ, Kühne R, Hoffmann B, Häfner A, Schmieder P, Volkmer-Engert R, Hof M, Wahl M, Schneider-Mergener J, Walter U, Oschkinat H, Jarchau T. (2000). Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *EMBO J.* 19 (18), 4903-14.

Ball LJ, Kühne R, Schneider-Mergener J, Oschkinat H (2005). Recognition of proline- rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew Chem Int Ed Engl.* 44 (19), 2852–2869.

Barkan, D., Green, J.E., and Chambers, A.F. (2010). Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur. J. Cancer* 46, 1181–1188.

Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, Gertler FB, Schafer DA (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem.* 280, 28653–28662.

Barzik, McClain, Gupton, Gertler (2014). Ena/VASP regulates mDia2-initiated filopodial length, dynamics, and function. *Molecular Biology of the Cell* 25, 2604-2619.

Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, *et al.* (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell.* 109, 509–521.

Bear and Gertler (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *Journal of Cell Science.* 122, 1947-1953.

Beli P, Mascheroni D, Xu D, Innocenti M. (2008). WAVE and Arp2/3 jointly inhibit filopodium formation by entering into a complex with mDia2. *Nat Cell Biol.* 10, 849–857.

Benz, Blume, Moebius, Oschatz, Schuh, Sickmann, Walter, Feller, and Renné (2008). Cytoskeleton assembly at endothelial cell–cell contacts is regulated by α II-spectrin–VASP complexes. *The Journal of Cell Biology*, 180(1), 205–219.

Bilancia, C.G. *et al.* (2014). Enabled negatively regulates diaphanous-driven actin dynamics in vitro and in vivo. *Dev. Cell* 28, 394-408.

Block J, Stradal TE, Hanisch J, Geffers R, Kostler SA, Urban E, Small JV, Rottner K, Faix J. (2008). Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *J Microsc.* 231, 506–517.

Boëda, Briggs, Higgins, Garvalov, Fadden, McDonald, and Way (2007). Tes, a Specific Mena Interacting Partner, Breaks the Rules for EVH1 Binding *Molecular Cell* 28, 1071–1082.

Bosch, M. *et al.* (2007) Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Mol. Cell* 28, 555–568.

Boukhelifa M, Parast MM, Bear JE, Gertler FB, Otey CA (2004). Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members. *Cell Motil Cytoskeleton.* 58, 17–29.

Brindle NP, Holt MR, Davies JE, Price CJ, Critchley DR (1996). The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J.* 318 (3), 753–757.

Bundschu *et al.* (2006). The VASP-Spred-Sprouty domain puzzle. *J Biol Chem*, 281, 36477-36481.

Carl, Pollmann, Orr, Gertler, Chakraborty, Wehland (1999). Aromatic and basic residues within the EVH1 domain of VASP specify its interaction with proline-rich ligands. *Curr Biol*, 9, 715-718.

Cavallaro and Christofori (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.

Chen, and Sudol, M. (1995). The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *PNAS* 92, 7819-7823.

Chen, X.J. et al. (2014). Ena/VASP proteins cooperate with the WAVE complex to regulate actin cytoskeleton. *Developmental Cell* 30, 569-584.

Chesarone and Goode (2009). Actin Nucleation and Elongation Factors: Mechanisms and Interplay. *Curr Opin Cell Biol.*, 21(1), 28-37.

Chhabra and Higgs (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9, 1110–1121.

Conley, C.A. (2001) Leiomodulin and tropomodulin in smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C1645–C1656.

Cox. and Mann (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*, 26(12), 1367-1372.

Cuzick, Sestak, Forbes, Dowsett, Knox, Cawthorn, Saunders, Roche, Mansel, von Minckwitz, Bonanni, Palva, Howell (2013). Anastrozole for prevention of breast cancer in high-risk postmenopausal women (IBIS-II): an international, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 383, 1041-48.

Davenport RW, Dou P, Rehder V, Kater SB (1993). A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature* 361, 721–724.

Dinke , Van Roey, Michael, Davey, Weatheritt, Born, Speck, Krüger, Kuban, Strumillo, Uyar, Budd A, Altenberg, Seiler, Chemes, Glavina, Sánchez, Diell , Gibson (2014). The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res.* 42:D259-66.

Drees B, et al. (2000) Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins. *J Biol Chem* 275(29), 22503–22511.

Fedorov et al. (1999). Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function. *Nat Struct Biol*, 6, 661-665.

Ferron F, Rebowski G, Lee SH, Dominguez R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J.* 26, 4597–4606.

Freund, C., Dotsch, V., Nishizawa, K., Reinherz, E.L. and Wagner, G. (1999). The GYF domain is a novel structural fold that is involved in lymphoid signaling through proline-rich sequences. *Nat. Struct. Biol.* 6, 656-660.

Friedl and Wolf (2008). Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res.* 68, 7247–7249.

Friedl and Wolf (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188, 11–19.

Craig **Furman**, Alisha L. Sieminski, Adam V. Kwiatkowski, Douglas A. Rubinson, Eliza Vasile, Roderick T. Bronson, Reinhard Fässler, and Frank B. Gertler (2007). Ena/VASP is required for endothelial barrier function in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 179 (4), 761–775.

Galbraith CG, Yamada KM, Galbraith JA (2007). Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science* 315, 992–995.

Gates, Mahaffey, Rogers, Emerso, Rogers, Sottile, □Van Vactor, Gertler, Peifer (2007). Enabled plays key roles in embryonic epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Development* 134, 2027–2039.

Gateva, Sari Tojkander, Sami Koho, Olli Carpen and Pekka Lappalainen (2014). Palladin promotes assembly of non-contractile dorsal stress fibers through VASP recruitment. *Journal of Cell Science* 127, 1887–1898.

Gertler, Bennett, Clark, (1989). *Drosophila* abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell*, 58, 103-113

Gertler FB, Comer AR, Juang JL, Ahern SM, Clark MJ, Liebl EC, Hoffmann FM (1995). enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev.* 9, 521–533.

Gertler, Niebuhr, Reinhard, Wehland, Soriano (1996). Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, 87, 227-239.

Gertler and Condeelis (2011). Metastasis: tumor cells becoming MENAcing. *Trends in Cell Biology.* 21 (2), 81-90.

Gocheva, V., Wang, H.W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., and Joyce, J.A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 24, 241–255.

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

Goult, Zacharchenko, Bate, Tsang, Hey, Gingras, Elliott, Roberts, Ballestrem, Critchley, and Barsukov (2013). RIAM and Vinculin Binding to Talin Are Mutually Exclusive and Regulate Adhesion Assembly and Turnover. *The Journal of Biological Chemistry* 288(12), 8238–8249.

Grubbs RH, Chang S (1998). Recent advances in olefin metathesis and its application in organic synthesis. *Tetrahedron.* 54 (18), 4413–4450.

Halbrugge, Walter (1989). Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem*, 185, 41-50.

Halbrugge, Friedrich, Eigenthaler, Schanzenbacher, Walter (1990). Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J Bio Chem*, 265, 3088-3093.

Han YH, Chung CY, Wessels D, Stephens S, Titus MA, Soll DR, Firtel RA (2002). Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in dictyostelium. *J Biol Chem* 277, 49877–49887.

Hanahan and Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Harbeck, Huttelmaier, Schluter, Jockusch, Illenberger (2000). Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem*, 275, 30817-30825.

Harmer, Sivak, Amaya, Blundell (2005). A crystal structure of the *X. tropicalis* Spred1 EVH1 domain suggests a fourth distinct peptide-binding mechanism within the EVH1 family. *FEBS Lett* 579, 1161-1166.

Havrylenko, Noguera, Abou-Ghali, Manzi, Faqir, Lamora, Guérin, Blanchoin, and Plastino (2015). WAVE binds Ena/VASP for enhanced Arp2/3 complex-based actin assembly. *Molecular Biology of the Cell* 26, 55-65.

Homem, Peifer (2009). Exploring the roles of diaphanous and enabled activity in shaping the balance between filopodia and lamellipodia. *Mol Biol Cell* 20, 5138–5155.

Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., and Thompson, E.W. (2007). Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.* 213, 374–383.

Huttenlocher, S. P. Palecek, Q. Lu, W. Zhang, R. L. Mellgren, D. A. Lauffenburger, M. H. Ginsberg, A. F. Horwitz: (1997). Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *Journal of Biological Chemistry.* 272, 32719–32722.

Huy P, Neudörfl JM, Schmalz H-G (2011). A practical synthesis of trans-3-substituted proline derivatives through 1,4-addition. *Org Lett.* 13 (2), 216–219.

Ilatovskaya, Nadezhdin, Pavlov, Shuyskiy, Tomilin, Palygin, Staruschenko, and Negulyaev (2013). Arp2/3 complex inhibitors adversely affect actin cytoskeleton remodeling in the cultured murine kidney collecting duct M-1 cells. *Cell Tissue Res.*; 354(3).

Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (Juli 2012). AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL Kurzversion 3.0. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.

Isogai, van der Kammen & Innocenti (2015). SMIFH2 has effects on Formins and p53 that perturb the cell cytoskeleton. *Science Reports*, 5, 9802.

Jordan, Singer, Koretzky, (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol*, 4, 110-116.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557–563.

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2006–2007). Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* 26, 75–85.

Kayisli, Demir, Erguler, Arici (2002). Vasodilator-stimulated phosphoprotein expression and its cytokine-mediated regulation in vasculogenesis during human placental development. *Mol Hum Reprod*, 8, 1023-1030.

Koestler SA, Auinger S, Vinzenz M, Rottner K, Small JV. (2008). Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat Cell Biol.* 10, 306–313.

Kovar, D.R. (2006). Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 11–17.

Krause, Sechi, Konradt, Monner, Gertler, Wehland (2000). Fyn-binding protein (Fyb/SLP-76-associated protein (SLAP)), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signalling to the actin cytoskeleton.

Krause M, Leslie JD, Stewart M, Lafuente EM, Valderrama F, Jagannathan R, Strasser GA, Rubinson DA, Liu H, Way M, Yaffe MB, Boussiotis VA, Gertler FB (2004). Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev Cell.* 7, 571–583.

Krebs in Deutschland (Kid). (2013). Robert-Koch Institut, 68-71.

Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J, Hall A (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol.* 11, 1645–1655.

Ladoux and Nicolas (2012). Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep. Prog. Phys.* 75, 116601 (25pp).

Lambrechts, Kwiatkowsky, Lanier, Bear, Vandekerckhove, Ampe, Gertler (2000). cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem*, 275, 36143-36154.

Lapetina, Christopher C. Mader, Kazuya Machida, Bruce J. Mayer, and Anthony J. Koleske (2009). Arg interacts with cortactin to promote adhesion-dependent cell edge protrusion. *JCB.* 185(3), 503-519.

Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359–369.

Law, Vehlow, Kotini, Dodgson, Soong, Theveneau, Bodo, Taylor, Navarro, Perera, Michael, Dunn, Bennett, Mayor, and Krause (2013). Lamellipodin and the Scar/WAVE complex cooperate to promote cell migration in vivo. *JCB.* 203(4), 673-689.

Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, Lanier LM, Krause M, Svitkina TM, Borisy GG, Gertler FB (2004). Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* 42, 37–49.

Lebrand, Dent, Lanier, Krause, Svitkina, Borisy, Gertler (2004). Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron*, 42, 37-49.

Lim WA, Richards FM, Fox RO (1994). Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*. 372 (6504), 375–379.

Loureiro, Rubinson, Bear, Baltus, Kwiatkowski, Gertler (2002). Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration. *Mol Biol Cell*, 13, 2533-2546.

Macias, M.J., Hyvönen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M. and Oschkinat, H. (1996). Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*. 382, 646-649.

Mader, Oser, Magalhaes, *et al.* (2011). An EGFR-Src-Arg-cortactin pathway mediates functional maturation of invadopodia and breast cancer cell invasion. *Cancer Res*. 71(5), 1730-41.

Madsen and Sahai (2010). Cancer dissemination - Lessons from leukocytes. *Dev. Cell* 19, 13–26.

Mahoney, N.M., Janmey, P.A. and Almo, S.C. (1997). Structure of the profilin-poly-L-proline complex involved in morphogenesis and cytoskeletal regulation. *Nat. Struct. Biol.* 4, 953-960.

Mejillano MR, Kojima S, Applewhite DA, Gertler FB, Svitkina TM, Borisy GG (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 118, 363–373.

Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 117–134.

Mihály, Sztupinszki, Surowiak and Györffy (2012). A Comprehensive Overview of Targeted Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Current Cancer Drug Targets*, 12, 857-872.

Modugno, Bronzi, Scanlan *et al.* (2004). Human Mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8+ T-cell immune response. *International Journal of Cancer*, 109(6), 909–918.

Modugno, Mottolese, Benedetto *et al.* (2006). The cytoskeleton regulatory protein hMena (ENAH) is overexpressed in human benign breast lesions with high risk of transformation and human epidermal growth factor receptor-2-positive/hormonal receptor-negative tumors. *Clinical Cancer Research*, 12(5), 1470–1478.

Modugno, Iapicca, Boudreau *et al.* (2012). Splicing program of human Mena produces a previously undescribed isoform associated with invasive, mesenchymal-like breast tumors. *PNAS*, 109(47), 19280–19285.

Murphy D. and Courtneidge M. (2011). The ‘ins’ and ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*. 12, 413–26.

K Niebuhr, F Ebel, R Frank, M Reinhard, E Domann, U D Carl, U Walter, F B Gertler, J Wehland, and T Chakraborty (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* 16, 5433-5444.

Nishizawa, K., Freund, C., Li, J., Wagner, G. and Reinherz, E.L. (1998). Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. *PNAS* 95, 14897-14902.

Nolen, Tomasevic, Russell, Pierce, Jia, McCormick, Hartman, Sakowicz, and Pollard (2009). Characterization of two classes of small molecule inhibitors of Arp2/3 complex. *Nature*, 460(7258), 1031–1034.

Dissertation Robert **Opitz** (2012). Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen: Peptidomimetika für VASP-EVH1. Freie Universität Berlin. 117.

Robert **Opitz**, Matthias Müller, Cédric Reuter and Matthias Barone, Arne Soicke, Yvette Roske, Kirill Piotukh, Peter Huy, Monika Beerbaum, Burkhard Wiesner, Michael Beyermann, Peter Schmieder, Christian Freund, Rudolf Volkmer, Hartmut Oschkinat, Hans-Günther Schmalz, Ronald Kühne (2015). A modular toolkit to inhibit proline-rich motif-mediated protein-protein interactions. *PNAS*. 12(16), 5011-5016.

Parangi, O'Reilly, Christofori, Holmgren, Grosfeld, Folkman, Hanahan (1996). Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *PNAS*, 93, 2002-2007.

Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 633–643.

Partridge MA, Marcantonio EE (2006). Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol Biol Cell* 17, 4237–4248.

Pellegrin, Mellor (2005). The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol* 15, 129–133.

Peng, Wallar, Flanders, Swiatek, Alberts (2003). Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42. *Curr Biol* 13, 534–545.

Peterson, Deng, Zettl, Prehoda, Lim, Way, Volkman (2007). Multiple WIP recognition motifs are required for a functional interaction with N-WASP. *J Biol Chem*, 282(11), 8446-8453.

Pollard *et al.* (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 451–477.

Pollard and Borisy (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112, 453–465.

Pollard and Cooper (2009). Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326, 1208–1212.

Prehoda, Lee, Lim (1999). Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell*, 97, 471-480.

Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, Boone C (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed end association. *Science* 297, 612–615.

Pula, Schuh, Nakayama K, Nakayama KI, Walter, Poole (2006). PKC δ regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood*, 108, 4035-4044.

Qian and Pollard (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.

Qualmann *et. al.* (2000). Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 150, F111–F116.

Qualmann and Kessels (2009). New players in actin polymerization – WH2-domain-containing actin nucleators. *Trends in Cell Biology.* 19(6), 276-285.

Reinhard M, Jouvenal K, Tripier D, Walter U (1995). Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). PNAS 92, 7956–7960.

Reinhard M, Rudiger M, Jockusch BM, Walter U (1996). VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. FEBS Lett. 399, 103–107.

Reuter C, Huy P, Neudörfl JM, Kühne R, Schmalz H-G (2011). Exercises in pyrrolidine chemistry: Gram scale synthesis of a Pro-Pro dipeptide mimetic with a polyproline type II helix conformation. Chemistry. 17(43), 12037–12044.

Reuter, M. Kleczka, S. de Mazancourt, J.-M. Neudoerfl, R. Kuehne, H.-G. Schmalz (2014). Stereoselective Synthesis of Proline- Derived Dipeptide Scaffolds (ProM-3 and ProM-7) Rigidified in a PPII Helix Conformation. Eur. J. Org. Chem., 13, 2664-2667.

Reuter, R. Opitz, A. Soicke, S. Dohmen, M. Barone, S. Chiha, M. T. Klein, J.-M. Neudörfl, R. Kühne, H.-G. Schmalz (2015). Design and Stereoselective Synthesis of ProM-2: A Spirocyclic Diproline Mimetic with Polyproline Type II (PPII) Helix Conformation. Chem. Eur. J., 21, 8464-8470.

Ridley AJ, *et al.* (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. Science. 302,1704.

Rizvi, Neidt, Cui, Feiger, Skau, Gardel, Kozmin, and Kovar (2009). Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Formin-Mediated Actin Assembly. Chem Biol; 16(11), 1158–1168.

Salazar, Bell, Davis (1999). Coordinate induction of the actin cytoskeletal regulatory proteins gelsolin, vasodilator-stimulated phosphoprotein, and profilin during capillary morphogenesis in vitro. *Exp. Cell Res*, 249, 22-32.

Sarmiento C, Wang W, Dovas A, Yamaguchi H, Sidani M, El-Sibai M, Desmarais V, Holman HA, Kitchen S, Backer JM, *et al.* (2008). WASP family members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *J Cell Biol.*180, 1245–1260.

Schäfer C, Born S, Möhl C, Houben S, Kirchgeßner N, Merkel R, Hoffmann B (2010). The key feature for early migratory processes: dependence of adhesion, actin bundles, force generation and transmission on filopodia. *Cell Adh Migr* 4, 215–225.

Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, Schleicher M, Faix J. (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol.* 7, 619–625.

Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Stradal TE, Schleicher M, Faix J (2006). The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *PNAS* 103, 7694–7699.

Schumacher, N. *et al.* (2004) Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expr. Patterns* 4, 249–255.

Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C. and Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature.* 365, 810-816.

Seano, G. and Primo, L.. (2015). "Podosomes and invadopodia: tools to breach vascular basement membrane,". *Cell Cycle.* 14(9), 1370–74.

Sept and McCammon (2001). Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys. J.* 81, 667–674

Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K (2002). The lamellipodium: where motility

begins. *Trends Cell Biol* 12, 112–120.

Smith MA, et al. (2010) A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. *Dev Cell* 19(3), 365–376.

Soicke, C. Reuter, M. Winter, J.-M. Neudörfl, N. Schlörer, R. Kühne, H.-G. Schmalz (2014). Stereoselective Synthesis of Tricyclic Diproline Analogues that Mimic a PPII, Helix: Structural Consequences of Ring-Size Variation. *Eur. J. Org. Chem.*, 29, 6467-6480.

Sparks, A.B., Rider, J.E., Hojman, N.G., Fowlkes, D.M., Quilliam, L.A. and Kay, B.K. (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *PNAS* 93, 1540-1544.

Suetsugu, Yamazaki, Kurisu, Takenawa (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell.* 5(4), 595-609.

Suranenia, Fogelsonb, Rubinsteina, Nogueraa, Volkmannc, Haneinc, Mogilnerb, and Lia (2014). A mechanism of leading-edge protrusion in the absence of Arp2/3 complex. *Molecular Biology of the Cell*, 26(1), 901-912.

Takahashi and Suzuki (2011). WAVE2, N-WASP, and Mena Facilitate Cell Invasion Via Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Local Accumulation of Actin Filaments. *Journal of Cellular Biochemistry.* 112, 3421–3429.

Takenawa and Suetsugu (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 37–48.

Talmadge and Fidler (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669.

Thiery and Sleeman (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.

van Zijl, Krupitza, Mikulits (2011). Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research* 728, 23–34.

Volkman, Prehoda, Scott, Peterson, Lim (2002). Structure of the N-WASP EVH1 domain-WIP complex: insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, 111, 565-576.

Wang, E. L. Botvinick, Y. Zhao, M. W. Berns, S. Usami, R. Y. Tsien, S. Chien (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature.* 434, 1040–1045.

Wang, Goswami, Lapidus, Wells, Wyckoff, Sahai, Singer, Segall, and Condeelis (2004). Identification and Testing of a Gene Expression Signature of Invasive Carcinoma Cells within Primary Mammary Tumors. *Cancer Res.* 64, 8585– 8594.

Wendt and Schiemann (2009). Therapeutic targeting of the focal adhesion complex prevents oncogenic TGF- β signaling and metastasis. *Breast Cancer Research* 11:R68.

Wilkins, Gasteiger, Bairoch, Sanchez., et al. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-552.

Worth, Hodivala-Dilke, Robinson, King, Morton, Gertler, Humphries, and Parsons (2010). $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration. *JCB* 189(2), 369-383.

Wu, Akinleye, and Zhu (2013). Novel agents for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 6:36.

Yang C, Czech L, Gerboth S, Kojima S, Scita G, Svitkina T. (2007). Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol.* 5, e317.

Yu, H., Chen, J.K., Feng, S., Dalgarno, D.C., Brauer, A.W. and Schreiber, S.L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell.* 76, 933-945.

R. **Zaidel-Bar**, M. Cohen, L. Addadi, B. Geiger (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society Transactions.* 32, 416-420.

Zaminer, C. Brockmann, P. Huy, R. Opitz, C. Reuter, M. Beyermann, C. Freund, M. Müller, H. Oschkinat, R. Kühne, H.-G. Schmalz (2010). Addressing Protein-Protein Interactions by Small Molecules: A Designed Pro-Pro Dipeptide Mimic with a PPII Helix Conformation as a Module for the Synthesis of PRD-binding Ligands. *Angew.Chem.*, 122, 7265-7269.

E. **Zamir**, B. Geiger: Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. (2001). *Journal of Cell Science.* 114, 3583-3590.

Zhang Y, Tu Y, Gkretsi V, Wu C (2006). Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration. *J Biol Chem.* 281. 12397-12407.

Zhongxing Liang, Younghyun Yoon, John Votaw, Mark M. Goodman, Larry Williams and Hyunsuk Shim (2005). Silencing of CXCR4 Blocks Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* 65, 967-971.

Zimmer and Steeg (2015). Meaningful prevention of breast cancer metastasis: candidate therapeutics, preclinical validation, and clinical trial concerns. *J Mol Med*, 93, 13-29.