

**Aus dem Institut für Experimentelle Biomedizin, Lehrstuhl II  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Alma Zerneck-Madsen**

**Generierung und funktionelle Charakterisierung von  
stabil transfizierten, induzierbar *LASP1* spezifische  
shRNA exprimierenden RT4- und T24-  
Blasenkarzinomzelllinien**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Martin Franz Orth  
aus Ruppertsberg**

**Würzburg, September 2017**

**Referentin:**

Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt

**Korreferent bzw. Korreferentin:**

Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Dekan:**

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 13.04.2018

**Der Promovend ist Arzt**

für

diejenigen, ohne die ich nicht leben würde

diejenigen, ohne die ich nicht mehr leben würde

diejenigen, die mein Leben lebenswert machten

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite	1
1.1. Transitionalzellkarzinom	Seite	1
1.2. <i>LIM and SH3 protein 1</i>	Seite	8
1.3. LASP1 im Transitionalzellkarzinom	Seite	16
2. Materialien und Methoden	Seite	20
2.1. Materialien	Seite	20
2.1.1. Zelllinien	Seite	20
2.1.2. Medien und -Zusätze für Zellkultur	Seite	20
2.1.3. siRNAs, lentivirale Vektoren und Transfektionsreagenzien	Seite	21
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien	Seite	21
2.1.5. Kits	Seite	22
2.1.6. Antikörper	Seite	23
2.1.6.1. Primärantikörper	Seite	23
2.1.6.2. Sekundärantikörper	Seite	23
2.1.6.3. Sekundärantikörper - Immunfluoreszenz	Seite	23
2.1.7. Verbrauchsartikel	Seite	24
2.1.8. Technische Hilfsmittel	Seite	25
2.1.9. Software	Seite	27
2.2. Methoden	Seite	28
2.2.1. Zellkulturbedingungen	Seite	28
2.2.2. Ernten von adhärenenten Zellen	Seite	28
2.2.3. Splitten adhärenenten Zellen	Seite	29
2.2.4. Zellen einfrieren und auftauen	Seite	30
2.2.5. Zellen zählen	Seite	31
2.2.5.1. Zellzählung mit Neubauerkammer	Seite	31
2.2.5.1. Zellzählung mit Scepter™ der Firma Millipore	Seite	32

2.2.6.	Transfektion mit small interfering RNA	Seite	32
2.2.7.	Lentivirale Transduktion	Seite	34
2.2.7.1.	Virusproduktion	Seite	36
2.2.7.2.	Bestimmung der <i>lowest lethal dosis</i> (LLD) für Puromycin	Seite	37
2.2.7.3.	Lentivirale Transduktion und Selektion	Seite	37
2.2.8.	Flourescence-activated Cell Sorting	Seite	38
2.2.9.	Adhäsionsassay	Seite	40
2.2.9.1.	Beschichtung der Platten und Aussäen der Zellen für Adhäsion mit späterer Fixierung und Färbung der Zellen	Seite	40
2.2.9.2.	Fixierung und Färbung der Zellen	Seite	40
2.2.9.3.	Absorptionsmessung	Seite	42
2.2.9.4.	Adhäsionsassay mit CellTiter-Glo	Seite	42
2.2.10.	Proliferationsassay	Seite	44
2.2.11.	Klonogenitätsassay	Seite	46
2.2.12.	Migrationsassay	Seite	46
2.2.13.	Urothelisolation	Seite	48
2.2.14.	Immunhistochemie	Seite	49
2.2.15.	Kern-Cytosol-Trennung	Seite	51
2.2.16.	Western Blot	Seite	52
2.2.16.1.	Ernten von Proben für Western Blot	Seite	52
2.2.16.2.	Denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli	Seite	53

2.2.16.3.	Western Blot	Seite	56
2.2.16.4.	Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran: Detektion mittels Ponceau S - Färbung	Seite	57
2.2.16.5.	Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran: spezifische Detektion mit Antikörper	Seite	57
2.2.16.6.	Membranen strippen	Seite	59
2.2.17.	Durchflusszytometrie	Seite	60
2.2.18.	BCA-Assay	Seite	60
2.2.19.	TCGA- und Microarrayanalysen	Seite	61
2.2.19.1.	Herunterladen und Prozessieren von TCGA- und Microarray-Daten	Seite	61
2.2.19.2.	Korrelation von Genexpression mit Überleben	Seite	63
2.2.19.3.	Korrelation von Genexpression mit Tumor-Parametern	Seite	63
2.2.19.4.	Analyse von Genexpressionsregulation durch microRNA	Seite	63
2.2.19.5.	Gene-Set Enrichment Analysis, Gene Ontology	Seite	64
2.2.20.	Statistische Methoden	Seite	65
3.	Ergebnisse	Seite	66
3.1.	T24 und RT4 überexprimieren <i>LASP1</i> im Vergleich zu normalem Urothel	Seite	66
3.2.	T24 und RT4 wurden erfolgreich mit einem induzierbar shLASP1 exprimierendem Konstrukt	Seite	69

	lentiviral transduziert		
3.3.	shLASP1- und shControl-transduzierte T24 und RT4 Zellen wurden entsprechend ihres tRFP Signals sortiert	Seite	71
3.4.	Funktionelle Analyse der Auswirkung von LASP1-KD auf Adhäsion von Blasenkarzinomzelllinien: LASP1-KD zeigt keinen Effekt	Seite	76
3.4.1.	Optimierung des Adhäsionsassays	Seite	76
3.4.2.	LASP1-KD zeigt keinen Effekt auf Adhäsion in T24 und RT4 Zellen	Seite	82
3.5.	Funktionelle Analyse der Auswirkung von LASP1-KD auf Proliferation von Blasenkarzinomzelllinien: LASP1-KD zeigt keinen Effekt	Seite	84
3.6.	Funktionelle Analyse der Auswirkung von LASP1-KD auf Migration von Blasenkarzinomzelllinien: LASP1-KD reduziert Migration	Seite	89
3.7.	LASP1 ist auch in Blasenkarzinomzelllinien nukleär lokalisiert	Seite	90
3.8.	LASP1 ist in Enrichment-Analysen im Blasenkarzinom mit Metastasierung assoziiert	Seite	95
3.9.	<i>LASP1</i> -Expression wird im Blasenkarzinom durch miR-203 reguliert	Seite	99
3.10.	In TCGA-Daten zum Blasenkarzinom ist keine klinische Relevanz der <i>LASP1</i> -Expression ersichtlich	Seite	100
3.11.	Die generierten induzierbar shLASP1 und shControl exprimierenden Zellen weichen in ihrem Proliferationsverhalten von wildtypischen Zellen ab und verlieren ihr Fluoreszenzsignal	Seite	103
4.	Diskussion	Seite	109
5.	Zusammenfassung	Seite	124
6.	Literaturverzeichnis	Seite	127

7. Abbildungsverzeichnis	Seite 137
8. Abkürzungen	Seite 143
Danksagung	
Lebenslauf	
Publikationsverzeichnis	



# 1. Einleitung

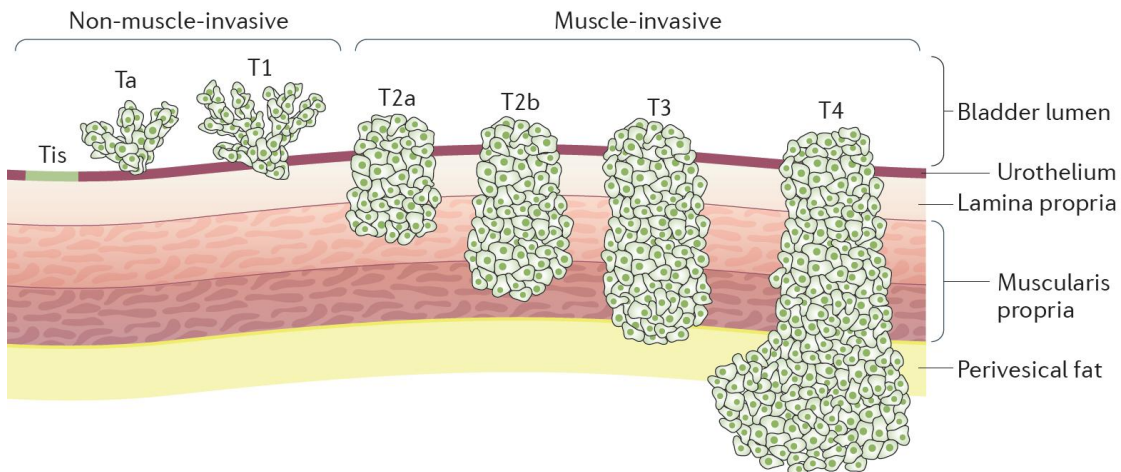
## 1.1. Transitionalzellkarzinom

Das Urothel- bzw. Transitionalzellkarzinom (Englisch *transitional cell carcinoma*, TCC) ist mit 95 % der Fälle der häufigste Harnblasenkrebs (Malats and Real, 2015). Seltener sind Adeno- und Plattenepithelkarzinom der Harnblase (Kaufman *et al.*, 2009). Im Vergleich zu diesen Blasenkarzinomen sind Blasensarkome Raritäten (Agaimy and Hartmann, 2016). Das Blasenkarzinom stellt in der westlichen Welt die vierthäufigste Krebserkrankung des Mannes dar. Die Inzidenz in Deutschland beträgt ca 30/100.000/Jahr für Männer (Burger *et al.*, 2013). Damit ist das Blasenkarzinom drei bis vier Mal so häufig in Männern wie in Frauen (Inzidenz 8/100.000/Jahr) (Burger *et al.*, 2013; Malats and Real, 2015). Im Jahr 2012 sind insgesamt über 28.000 Deutsche an Blasenkrebs erkrankt, mehr als 5.500 verstorben, und mehr als 100.000 Deutsche lebten mit der Diagnose Blasenkrebs (Leal *et al.*, 2016). Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr (Malats and Real, 2015).

Diverse chemische Verbindungen, etwa polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und aromatische Amine, wurden als Risikofaktoren des TCC beschrieben (Burger *et al.*, 2013; Malats and Real, 2015). Wegen deren Verwendung in der Industrie ist das TCC in entsprechenden Fällen eine Berufskrankheit (Brüske-Hohlfeld, 1999). TCC kann aber auch iatrogen durch Bestrahlung oder Medikamente wie Phenacetin oder Cyclophosphamid bedingt sein (Burger *et al.*, 2013; Malats and Real, 2015). Der wichtigste Risikofaktor ist aber der Zigarettenkonsum, welcher für circa 50 % aller TCCs verantwortlich gemacht wird. Im Vergleich zu Nichtrauchern haben Raucher ein mehr als vierfaches Risiko an TCC zu erkranken (Freedman *et al.*, 2011). Ein in Deutschland weniger relevanter Risikofaktor ist die Infektion mit *Schistosoma haematobium*, welche durch chronische Entzündung vor allem zu einem Plattenepithelkarzinom der Blase führt (Malats and Real, 2015).

Neben diesen äußeren Faktoren spielt auch die genetische Prädisposition eine Rolle in der Tumorgenese des TCCs. So ist das Risiko für eine TCC Erkrankung für erstgradig Verwandte von TCC Patienten zweifach höher als das von Menschen ohne TCC in der Familienanamnese. Verschiedene Keimbahnvariationen werden dabei als endogene Risikofaktoren angesehen, welche die Suszeptibilität für exogene weitere Risikofaktoren erhöhen (Burger *et al.*, 2013).

Meist führt eine schmerzlose Hämaturie als erstes Symptom die Patienten zum Arzt (Griffiths, 2013). Die Diagnose des TCCs wird durch Zystoskopie, transurethrale Abtragung des Tumors und histologische Aufarbeitung gestellt. Dabei wird eine Abtragung des Tumors bis zur Muscularis propria durchgeführt, um die Eindringtiefe des Tumors in die Harnblasenwand bestimmen zu können. Zusätzlich wird Urin-Zytologie und Bildgebung der oberen Harnwege mittels Computertomographie (CT) Urographie angewandt (Witjes *et al.*, 2017). Grundsätzlich sind zwei Formen des TCCs differenziert zu betrachten, die sich im Hinblick auf Therapie und Prognose deutlich unterscheiden: das oberflächliche, nicht-muskelinvasive und das muskelinvasive TCC (Kamat *et al.*, 2016). Mit 75 % der TCCs ist das nicht-muskelinvasive TCC weitaus häufiger als das invasive (Burger *et al.*, 2013). Zum nicht-muskelinvasiven TCC werden das flach wachsende Carcinoma in situ (CIS) und das papilläre Karzinom ohne (Ta) und mit (T1) Infiltration der Lamina propria gezählt (Babjuk *et al.*, 2017). Die muskelinvasiven Tumore werden eingeteilt in solche mit Infiltration der Muscularis propria (T2), zusätzlicher Infiltration des perivesikalen Gewebes (T3) und solche mit Infiltration von Prostata bzw. Uterus und/ oder Vagina oder Becken- oder Bauchwand (T4) (Abb. 1) (Sanli *et al.*, 2017). Das Grading der Tumore basiert hauptsächlich auf deren Differenzierung (Babjuk *et al.*, 2017).



**Abb. 1: T-Stadieneinteilung des Blasenkarzinoms.** Modifiziert aus Sanli *et al.*, 2017.

Bei der Diagnostik des CIS werden mehrere Biopsien durchgeführt, da dieses häufig an mehreren Stellen im Harntrakt gleichzeitig auftritt und optisch nicht gut von entzündlichem Gewebe zu unterscheiden ist (Babjuk *et al.*, 2017). Beim invasiven TCC wird hingegen als zusätzliche Diagnostik die Computertomographie oder Magnetresonanztomographie als Bildgebung zum Metastasennachweis verwendet (Witjes *et al.*, 2017).

Das wichtigste Element in der Therapie des nicht-muskelinvasiven TCCs besteht in der transurethralen Tumorresektion. Daher ist die Diagnostik gleichzeitig die Therapie (Babjuk *et al.*, 2017). Da nicht-invasive Tumore in der Zystoskopie übersehen werden können (Dalbagni *et al.*, 2009) und im Falle von T1 Tumoren von bis zu 55 % Patientenanteil mit persistierendem Tumor nach erster Tumorresektion ausgegangen wird (Divrik *et al.*, 2006), ist eine zweite Zystoskopie innerhalb von zwei bis sechs Wochen empfohlen (Babjuk *et al.*, 2017). Zusätzlich wird eine einmalige Instillation mit einem Chemotherapeutikum, meist Mitomycin C, direkt nach der Resektion empfohlen, angesichts einer damit verbundenen besseren Prognose. Das Standardmedikament zur adjuvanten intravesikalen Behandlung des TCC ist Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (Babjuk *et al.*, 2017). Dabei handelt es sich um attenuiertes *Mycobacterium bovis*, ein Tuberkulose Impfstoff, der wahrscheinlich sowohl direkt auf den Tumor als auch immunmodulatorisch wirkt und seit über 40 Jahren erfolgreich in der Therapie des TCCs eingesetzt wird.

(Saluja and Gilling, 2017). Zur Festlegung der definitiven Therapie werden Patienten anhand der Parameter Tumorgroße, T-Stadium, Grading, Tumorzahl, Anzahl von Rezidiven und gleichzeitiges Vorliegen von CIS in niedrig-, intermediär- und hoch-risiko Patienten eingeteilt (Babjuk *et al.*, 2017). Ab intermediärem Risiko wird die einjährige Gabe von BCG empfohlen, bei Hochrisikopatienten drei Jahre BCG (Babjuk *et al.*, 2017). Bei Patienten mit Hochrisiko-Konstellation für ein Rezidiv und Progression des Tumors zu einem muskelinvasiven Tumor kann die direkte radikale Zystektomie erwogen werden (Babjuk *et al.*, 2017).

Die radikale Zystektomie ist therapeutisches Mittel der Wahl beim muskelinvasiven TCC. Nach einer neoadjuvanten Cisplatin basierten Chemotherapie wird die Harnblase zusammen mit distaler Urethra, Prostata und Bläschendrüssen bzw. angrenzender Vagina und Uterus reseziert (Witjes *et al.*, 2017). Gleichzeitig erfolgt eine pelvine Lymphknotendissektion (Kamat *et al.*, 2016; Witjes *et al.*, 2017). Die definitive Behandlungsstrategie muss für jeden Patienten abhängig von den vorliegenden Risikofaktoren, wie etwa mehrseitiges Vorliegen des Tumors, und den Patientenwünschen, wie Erhalt der Sexualorgane, entschieden werden. Je nach Lokalisation, Komorbidität und Patientencompliance wird auch die Form der Harnableitung entschieden. Zur Harnableitung werden kontinente oder inkontinente Systeme über die Bauchwand, die Harnröhre oder das Rektum und Sigmoidum verwendet. Dabei ist die orthotopische Neoblase aus Ileum die bevorzugte Methode, Tumor-freie Ränder der Urethra natürlich vorausgesetzt, oder alternativ das Ileumkonduit (Witjes *et al.*, 2017).

Muskelinvasive TCCs weisen ein hohes Risiko für Metastasierung und damit verbundene Letalität auf (5-Jahres-Gesamtüberlebensrate ca. 60 %, im Falle einer Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose weit niedriger). Metastasen finden sich vorrangig in Lunge und Leber, seltener im Gehirn und in Knochen. Daher besteht die Nachsorge vor allem aus CT Bildgebung zur Früherkennung von Metastasen (Witjes *et al.*, 2017).

Das nicht-muskelinvasive TCC ist mit einer hohen Rezidivrate von 50-70 % in fünf Jahren und damit einhergehender Progressionsrate von 10-30 %

verbunden (Kamat *et al.*, 2016). Im Falle einer Progression bzw. eines Nichtansprechens auf BCG wird die radikale Zystektomie empfohlen, da die Prognose bei Progression zu einem invasiven TCC schlechter ist als bei einem invasiven TCC ohne vorheriges nicht-invasives Wachstum (van den Bosch and Alfred Witjes, 2011; Babjuk *et al.*, 2017). Um ein Rezidiv rechtzeitig erkennen zu können, ist eine engmaschige Nachsorge der Patienten unerlässlich. Die Harnröhre und die oberen Harnwege müssen dabei gründlich untersucht werden, da in über 50 % der Rezidivfälle nach BCG Therapie Tumoren in diesen Regionen lokalisiert sind (Giannarini *et al.*, 2014).

Hierbei ist der Goldstandard weiterhin die Zystoskopie (Babjuk *et al.*, 2017). Als invasives Verfahren birgt diese jedoch ein Infektionsrisiko. Außerdem wird eine Zystoskopie von den Patienten häufig als unangenehm empfunden (Yossepowitch *et al.*, 2007). Des Weiteren werden kleine und flache Tumore nicht zuverlässig mittels der üblichen Weißlicht-Zystoskopie erkannt, das CIS sogar nur in etwa 63 % der Fälle (Kołodziej *et al.*, 2016). Eine Weiterentwicklung der Weißlicht-Zystoskopie, um deren Schwäche in der Diagnostik kleiner Tumore zu umgehen, ist die photodynamische Diagnostik nach Instillation von Hexaminolävulinsäure, ein Derivat der 5-Aminolävulinsäure. Das maligne Urothel nimmt die Verbindung bevorzugt auf. Nach Auslastung des Enzymsystems des malignen Urothels durch den Überschuss an Hexaminolävulinsäure kommt es zur Anreicherung von Protoporphyrin IX. Dieses kann mit blauem Licht zu roter Fluoreszenz angeregt werden. Dadurch sind auch kleinere Tumore wesentlich besser erkennbar. Die bisherige Studienlage deutet auf eine Reduktion der Rezidivrate durch Anwendung der photodynamischen Diagnostik hin (Pietzak, 2017). Jedoch müssen beide Zystoskopische Verfahren ergänzend verwendet werden, da die photodynamische Diagnostik, im Gegensatz zur Weißlicht-Zystoskopie, nicht zwischen niedrig- und hochgradigen Läsionen unterscheiden kann und eine relativ hohe Falsch-positiv-Rate von 10-12 % aufweist. Dies ist wahrscheinlich durch die Eigenschaft von Hexaminolävulinsäure begründet, sich auch in entzündlichem Gewebe anzureichern und damit auch nach BCG Therapie im normalem Urothel (Kołodziej *et al.*, 2016). Weitere Verfahren zur Verbesserung

der Diagnostik, im Vergleich zur Zystoskopie mit weißem Licht, sind das *Narrow Band Imaging* oder Methoden basierend auf optischer Kohärenztomographie, Laser-Endomikroskopie, oder kombinierte Verfahren mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zur Differenzierung von krankem und gesundem Gewebe (Kołodziej *et al.*, 2016).

Ein weiterer Aspekt der Zystoskopie verlangt nach Alternativen zu dieser Methode: sie ist kostenintensiv. Entsprechend ist das TCC eine der kostenintensivsten Krebserkrankung (Yeung *et al.*, 2014), pro Patient betrachtet sogar die teuerste Krebserkrankung (Sievert *et al.*, 2009). Die jährlichen Kosten betragen in der EU im Jahr 2012 4,9 Milliarden Euro, davon gingen 2,9 Milliarden Euro zu Lasten des Gesundheitssystems, was 5 % der gesamten Gesundheitssystemkosten für Krebsbehandlungen entspricht (Leal *et al.*, 2016). Daher sind alternative Diagnose- und Nachsorgemethoden auch von gesundheitsökonomischer Relevanz.

Die alternative alleinige Anwendung von Urin-Zytologie anstatt Zystoskopie ist nicht ratsam angesichts einer geringen Spezifität von unter 70% (Lavery *et al.*, 2017). Während die Sensitivität für hochgradige Tumore sehr gut ist, beträgt sie für niedriggradige nur 4-31 % (D'Costa *et al.*, 2016). Daher wurde eine Vielzahl von Biomarkern entwickelt, von denen bessere Sensitivität und Spezifität und eine Verringerung der Kosten erwartet wurden (Sievert *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2014). Die am ausführlichsten untersuchten Biomarker basieren auf Proteinanalyse im Urin (D'Costa *et al.*, 2016). Beim Vergleich der Marker in den bisherigen Studien ist aber zu beachten, dass Patienten- und Kontrollkohorten teilweise sehr unterschiedlich sind, etwa was den Anteil an hochgradigen Tumoren angeht. Über 160 Proteine wurden bereits untersucht (D'Costa *et al.*, 2016). Bekannte und mehrmals validierte Marker sind das *Nuclear matrix protein 22* (NMP22), ein im Blasenkarzinom überexprimiertes Protein, das nach Apoptose in den Urin freigesetzt wird (Proctor *et al.*, 2010), *Bladder tumor antigen* (BTA, *Complement factor H related protein*) und die Zytokeratin basierten Tests *Urinary bladder carcinoma antigen* (UBC, *Cytokeratin 8* und *18* Fragmente) and *Cyfra21-1* (*Cytokeratin 19*). Bei allen liegt die Sensitivität bei ca. 61.8 bis 64.4 % und die Spezifität bei 76.6 bis 85.5 %. Die Marker weisen

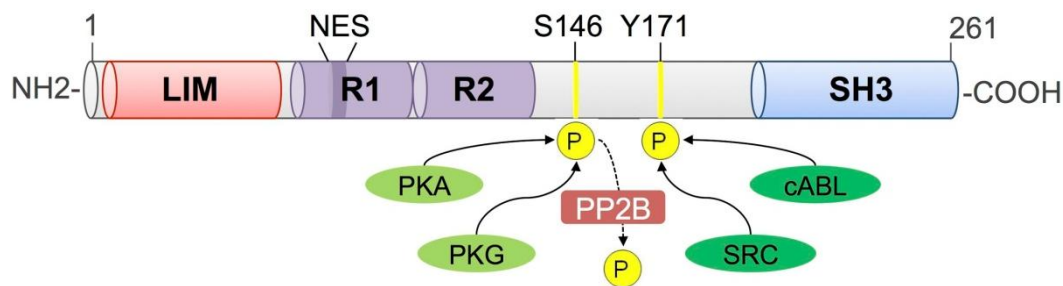
also eine eher geringe Sensitivität auf. Außerdem ist die Sensitivität meist für niedriggradige Tumore wesentlich schlechter als für hochgradige (D'Costa *et al.*, 2016). Auch in dem Zell-basierten Biomarkertests UCyt+ war bei der Erstdiagnose hochgradiger Tumore eine gute Sensitivität bestimmt worden, nicht aber in der Nachsorge, wenn bereits kleine Tumore erkannt werden müssen (Schmitz-Dräger *et al.*, 2016). Ein weiterer auf Zellen im Urin basierender Test ist *UroVysion Fluorescence in situ Hybridization* (Sokolova *et al.*, 2000), eine Methode, die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verschiedene chromosomale Veränderungen in Zellen im Urin untersucht. Auch dieser Test übertrifft nicht die Sensitivität und Spezifität von Urinzytologie im prospektiven Vergleich (Lavery *et al.*, 2017). Markerkombinationen erreichen zwar häufig eine verbesserte Sensitivität, aber zum Preis einer deutlich verschlechterten Spezifität (Schmitz-Dräger *et al.*, 2016). Wegen dieser Limitationen ist derzeit keiner der Marker in der Nachsorge empfohlen (Babjuk *et al.*, 2017). Neben Biomarkern, die vor allem in der Nachsorge zum Einsatz kommen könnten (wegen eingeschränkter Performance im Falle einer Hämaturie), wurde kürzlich eine Methode publiziert, die gerade bei Hämaturie die Diagnose von Blasenkrebs stellen soll. Die kombinierte Analyse von Patientenalter, Mutationen und Methylierungen im Urin von Patienten mit Hämaturie erreichte eine 93 %ige Sensitivität und 86 %ige Spezifität. Diese Methode könnte damit die Anzahl an diagnostischen Zystoskopien reduzieren (van Kessel *et al.*, 2017). Bisher wurde aber nicht untersucht, inwiefern dieser Assay auch in Patienten ohne Hämaturie, also vor allem in der Nachsorge, anwendbar ist.

Angesichts der Nachteile der Zystoskopie für den Patienten und im Hinblick auf Gesundheitsökonomie bei gleichzeitigem Mangel an zuverlässigen Alternativen ist die Entwicklung neuer diagnostischer Marker für das TCC wünschenswert.

## 1.2. LIM and SH3 protein 1

Das *LIM and SH3 protein 1* (LASP1) ist auf Grund seines besonderen Proteinaufbaus und seiner ubiquitären Expression ein Protein mit vielen Funktionen (Orth *et al.*, 2015).

*LASP1* wurde in einer cDNA Library von Mammakarzinom Lymphknotenmetastasen entdeckt (Tomasetto *et al.*, 1995a) und ist auf Chromosom 17q11-21.3 lokalisiert (Tomasetto *et al.*, 1995b). Das 261 Aminosäuren lange Protein besteht aus einer N-terminalen LIM Domäne, gefolgt von Nebulin-like Repeats (R1 und R2), einem Abschnitt mit Phosphorylierungsstellen und einer C-terminalen SH3 Domäne (Abb. 2) (Tomasetto *et al.*, 1995b; Butt *et al.*, 2003).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänen des LASP1 Proteins.** Aus Orth *et al.*, 2015.

Als Bindepartner der LIM Domäne wurde das *Chemokine receptor 2* Gen, *CXCR2* beschrieben, welches eine wichtige Rolle in der Zellmigration in verschiedenen Prozessen spielt (Raman *et al.*, 2010). Auch wird eine Bindung der LIM Domäne im Sinne einer Homodimerisation erwogen (Hammarström *et al.*, 1996); dies konnte bisher aber nicht für LASP1 gezeigt werden (Keicher *et al.*, 2004). Über die Nebulin-like Repeats interagiert LASP1 mit dem *Kelch-related protein 1* (Krp1), ein in der Elongation von Pseudopodien relevantes zytoskeletales Protein (Spence *et al.*, 2006; Gray *et al.*, 2009), sowie direkt mit Aktin-Filamenten (F-Aktin) (Schreiber *et al.*, 1998). Die SH3 Domäne ist Bestandteil vieler Struktur- und Signalproteine (Kay, 2012) und bindet an Prolin-



reiche Domänen verschiedener Proteine. Im Falle von LASP1 sind sechs Bindepartner beschrieben, Dynamin, LPP, Palladin, VASP, ZO-2 und Zyxin, alles Proteine mit Funktionen im Bezug auf das Zytoskelett (Okamoto *et al.*, 2002; Keicher *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Rachlin and Otey, 2006; Grunewald *et al.*, 2009; Mihlan *et al.*, 2013).

Die Interaktionen von LASP1 mit F-Aktin und zytoskelettalen Proteinen bedingen seine subzelluläre Verteilung und Bedeutung als Strukturprotein. LASP1 dient wahrscheinlich vor allem als Stabilisator von F-Aktin (Nakagawa *et al.*, 2006). Neben der Lokalisation direkt an F-Aktin und über Palladin an Aktin-Stressfasern (Rachlin and Otey, 2006), ist LASP1 vor allen in Zellkontakten und -Fortsetzten angereichert: In Fokalkontakten, Lamellipodien und Filopodien (Chew *et al.*, 1998; Bliss *et al.*, 2013), Pseudopodien (dort mit Krp1 interagierend) (Gray *et al.*, 2009) und Podosomen. In Podosomen ist LASP1 mit seinem Bindepartner Zyxin in einer Ringstruktur um den Aktinkern lokalisiert (Stölting *et al.*, 2012). Entsprechend liegt LASP1 vor allem in Strukturen mit Relevanz für Adhäsion, Migration und Invasion vor.

Die Phosphorylierung von LASP1 hat Einfluss auf dessen subzelluläre Verteilung. Tyrosin 171 kann durch SRC- und ABL-Kinase phosphoryliert werden (Lin *et al.*, 2004; Traenka *et al.*, 2009; Frietsch *et al.*, 2014). Während die Phosphorylierung durch ABL-Kinase zum Abwandern von LASP1 von Fokalkontakten führt, aber nicht von F-Aktin (Lin *et al.*, 2004), resultiert die Phosphorylierung via SRC-Kinase in Thrombozyten zu einer Translokation von LASP1 zu Fokalkontakten und Membranausstülpungen (Traenka *et al.*, 2009). Serin-146 wird durch die cGMP- oder cAMP abhängige Proteinkinase phosphoryliert (Butt *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierung führt zu einem Affinitätsverlust von LASP1 zu F-Aktin (Butt *et al.*, 2003) und induziert die Translokation von LASP1 in den Zellkern (Mihlan *et al.*, 2013). Hierbei löst LASP1 die Bindung nicht nur zu Aktin, sondern auch zu Bindepartnern wie Zyxin und LPP, und verbleibt als Komplex mit ZO2. ZO2 wird als Pendel-Partner verwendet, sodass LASP1, gebunden an ZO2, in den Zellkern gelangt. Der nukleäre Export ist über ein nukleäres Exportsignal im ersten Nebulin-like Repeat von LASP1 vermittelt. Serin-146 wird durch die Phosphatase PP2B

dephosphoryliert (Mihlan *et al.*, 2013). Die Funktion von LASP1 im Zellkern ist unklar. Eine DNA Bindung könnte möglich sein, da die LIM Domäne Zink-Bindemodule mit Ähnlichkeit zu DNA-Zinkfingerbindedomänen enthält (Hammarström *et al.*, 1996).

Die Funktion von LASP1 ist allerdings nicht auf die eines Strukturproteins beschränkt. Ein Beispiel, wie die Lokalisation und Interaktion von LASP1 mit dem Zytoskelett sich in eine physiologische Funktion übersetzt, sind Parietalzellen (Chew *et al.*, 2000). So konnte eine Säuresekretion korreliert mit LASP1 Phosphorylierung gezeigt werden (Chew *et al.*, 1998, 2000). LASP1 wird in humanen Parietalzellen über die cAMP-abhängige Kinase als Folge einer Histamin-Stimulation phosphoryliert. Dies führt zu einer Anreicherung im apikalen Bereich der Parietalzellen, dem Bereich des Protonentransportes (Chew *et al.*, 2000). Die Aktivität des Protonentransportes durch die  $H^+/K^+$ -ATPase wird über Einschluss selbiger in Vesikel und bedarfsmäßiger Integration in die apikale Zellmembran reguliert. Dynamin ist ein möglicher Vermittler zwischen LASP1 und Zytoskelett auf der einen Seite, und dem Transport von Vesikeln auf der anderen (Okamoto *et al.*, 2002). Hierzu passend ist eine Vasopressin abhängige Modulation der Häufigkeit von LASP1 in der apikalen Plasmamembran muriner Sammelrohrzellen, da auch Aquaporin-2 ähnlich zur  $H^+/K^+$ -ATPase reguliert wird (Loo *et al.*, 2013). Auch in Melanozyten scheint LASP1 zusammen mit Dynamin die Freisetzung von Vesikeln zu regulieren (Vaman V. S. *et al.*, 2015). Zusätzlich wird eine Relevanz im zentralen Nervensystem für LASP1 diskutiert, angesichts einer hohen Expression im ZNS und einer Anreicherung im Bereich von Synapsen (Phillips *et al.*, 2004).

Tatsächlich konnte eine Regulation von LASP1 im Hippocampus während der Entwicklung von Sprague-Dawley Ratten beobachtet werden (Weitzdörfer *et al.*, 2008). Dies deutet auf eine Bedeutung von LASP1 in der Entwicklung hin. Dazu passend wurde über eine Hochregulation von LASP1 in Beagle Knochenmarkstammzellen während osteogener Differenzierung durch Stimulation mit *Bone morphogenetic protein 2* (Hu *et al.*, 2014, p 2) und Fehlbildungen der Wirbelsäule nach transgener Insertion nahe der

Transkriptionsstartseite von *Lasp1* in der Mausmutante wavy tail Tg(CollalacZ)304ng (Hermann-Kleiter *et al.*, 2009) berichtet.

Das Hauptinteresse der LASP1 Forschung liegt aber derzeit bei dessen Rolle in diversen Krebsentitäten (Orth *et al.*, 2015; Ruggieri *et al.*, 2017). Die erste und am ausführlichsten untersuchte Krebsentität im Zusammenhang mit LASP1 ist das Mammakarzinom. Für diesen Tumor wurde erstmals eine Überexpression von LASP1 in einer Krebserkrankung versus nicht malignem Gewebe gezeigt (Tomasetto *et al.*, 1995b; Frietsch *et al.*, 2010). Eine Überexpression von LASP1 wurde daraufhin auch im Ovarialkarzinom (Grunewald *et al.*, 2007a), Colorektalkarzinom (Zhao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014), Ösophagus-Plattenepithelkarzinom (He *et al.*, 2013), oralem Plattenepithelkarzinom (Shimizu *et al.*, 2013), Prostatakarzinom (Hailer *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017a), klarzelligem Nierenzellkarzinom (Yang *et al.*, 2014), Magenkrebs (Zheng *et al.*, 2014), Pankreaskarzinom (Zhao *et al.*, 2015), hepatozellulärem Karzinom (Wang *et al.*, 2013a; Salvi *et al.*, 2015), nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Zheng *et al.*, 2016) und cholangiozellulärem Karzinom (Zhang *et al.*, 2016) nachgewiesen. Außer in dieser Vielzahl an Karzinomen, wurde LASP1 auch im Hochrisiko-Medulloblastom als eines der am stärksten hochregulierten Gene (Traenka *et al.*, 2010) und in der chronisch myeloischen Leukämie als überexprimiertes direktes BCR-ABL Substrat (Frietsch *et al.*, 2014) beschrieben. Ein erster Hinweis auf die Relevanz von LASP1 in Sarkomen ist eine Fusion mit *IFG2*, die in einer genomischen Analyse von gastrointestinalen Stromatumoren entdeckt wurde (Kang *et al.*, 2016).

Die Regulation der LASP1-Überexpression erscheint in den verschiedenen Krebsentitäten unterschiedlich. So wurden diverse LASP1 regulierende Mechanismen im hepatozellulären Karzinom beschrieben. Es konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen LASP1 und der Tumorgenese durch Hepatitisviren (Wang *et al.*, 2013a) und eine Hochregulation von LASP1 durch Urokinase (Salvi *et al.*, 2009) gezeigt werden. Des Weiteren konnte p53 die LASP1-Expression herunterregulieren, während Mutationen in *p53* diesen suppressiven Effekt eliminierten (Wang *et al.*, 2009b, 2009a). Im Ovarialkarzinom scheint LASP1 außerdem durch *Copy number* Zunahme

reguliert zu werden (Dimova *et al.*, 2009). Hingegen wurde für das Mammakarzinom eine Regulation durch veränderte *Copy number* und p53 ausgeschlossen (Frietsch *et al.*, 2010). Im Pankreaskarzinom wurde ein positiver regulativer Effekt von HIF-1 $\alpha$  auf die LASP1-Expression nachgewiesen (Zhao *et al.*, 2015). Im Prostatakarzinom wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten LASP1-Expression und einer niedrigeren Androgenrezeptoraktivität beschrieben (Dejima *et al.*, 2017). Im Endometriumkarzinom wurde eine Herunterregulation der *Long non coding RNA* LINC00672 gefunden, die als suppressiver Cofaktor mit p53 interagiert und so LASP1-Expression moduliert (Li *et al.*, 2017b). Wesentlich einheitlicher über die verschiedenen Krebsentitäten hinweg scheint eine Regulation von LASP1 durch microRNAs (miR) (Ruggieri *et al.*, 2017), vor allem miR-133a, die in den meisten colorektalen Karzinomen herunterreguliert ist (Wang *et al.*, 2013b), miR-1, die sowohl im colorektalen Karzinom (Chen *et al.*, 2012) als auch im Prostatakarzinom (Hudson *et al.*, 2012) und ösophagealem Plattenepithelkarzinom (Du *et al.*, 2016) LASP1 reguliert, sowie miR-203. miR-203 ist etwa im ösophagealen Plattenepithelkarzinom und Prostatakarzinom vermindert exprimiert (Takeshita *et al.*, 2012; Hailer *et al.*, 2014) und reguliert in diesen Entitäten LASP1 (Viticchiè *et al.*, 2011; Takeshita *et al.*, 2012; Hailer *et al.*, 2014), ebenso wie im Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (Benaich *et al.*, 2014), im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Zheng *et al.*, 2016) und in triple-negativen Mammakarzinomzelllinien (Wang *et al.*, 2012). Weitere LASP1 regulierende miRs sind miR-326 und miR-133b im hepatozellulären Karzinom (Hu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017a), miR-145 im Colonkarzinom (Wang *et al.*, 2016b), miR-29a im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Hu *et al.*, 2016) und miR-218 im Magenkrebs (Wang *et al.*, 2016a) und Prostatakarzinom (Nishikawa *et al.*, 2014).

In diversen Zelllinienmodellen konnte durch transienten LASP1-Knockdown (KD) und/oder LASP1-Überexpression ein Einfluss von LASP1 auf Tumoraggressivität beobachtet werden (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Übersicht über bisherige Studien zur funktionellen Relevanz von LASP1 in Zelllinienmodellen diverser Tumorentitäten.**

Entität	LASP1-KD oder -Über-expression	<i>in vitro</i> oder <i>in vivo</i>	Phänotyp	Quelle
Chorionkarzinom	KD	<i>in vitro</i>	Migration ↓ Proliferation ↓	(Segerer <i>et al.</i> , 2016)
Colorektales Karzinom	Über-expression	<i>in vitro</i>	Invasion ↓ Migration ↓ Proliferation ↓	(Zhao <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2013b, 2016b)
		<i>in vitro</i>	Invasion ↑ Migration ↑ Proliferation ↑ Klonogenität ↑	
		<i>in vivo</i>	Metastasierung ↑ Tumorstadium ↑	
Cholangiozelluläres Karzinom	KD	<i>in vitro</i>    <i>in vivo</i>	Invasion ↓ Migration ↓ Proliferation ↓ Klonogenität ↓ Tumorstadium ↓	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
Gallenblasenkarzinom	KD	<i>in vitro</i>    <i>in vivo</i>	Migration ↓ Proliferation ↓ Klonogenität ↓ Tumorstadium ↓	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Hepatozelluläres Karzinom	KD  Über-expression	<i>in vitro</i>  <i>in vitro</i>	Migration ↓ Proliferation ↓ Migration ↑ Proliferation ↑	(Tang <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2013a; Hu <i>et al.</i> , 2017)
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	KD	<i>in vitro</i>	Migration ↓	(Yang <i>et al.</i> , 2014)
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Über-expression	<i>in vitro</i>	Invasion ↓ Migration ↓ Proliferation ↓ Klonogenität ↓	(Hu <i>et al.</i> , 2016; Zheng <i>et al.</i> , 2016)
		<i>in vivo</i>	Metastasierung ↓ Tumorstadium ↓	
		<i>in vitro</i>	Invasion ↑ Migration ↑ Proliferation ↑ Klonogenität ↑	
		<i>in vivo</i>	Metastasierung ↑ Tumorstadium ↑	
Magenkrebs	KD	<i>in vitro</i>	Invasion ↓ Migration ↓ Proliferation ↓ Klonogenität ↓	(Zheng <i>et al.</i> , 2014)
		<i>in vivo</i>	Metastasierung ↓	

			Tumorwachstum ↓	
Mammakarzinom	KD	<i>in vitro</i>	Migration ↓ Proliferation ↓	(Grunewald <i>et al.</i> , 2006)
Orales Plattenepithelkarzinom	KD	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Proliferation ↓ Tumorwachstum ↓	(Shimizu <i>et al.</i> , 2013)
Ösophageales Plattenepithelkarzinom	KD	<i>in vitro</i>	Invasion ↓ Migration ↓ Proliferation ↓	(He <i>et al.</i> , 2013)
Ovariakarzinom	KD	<i>in vitro</i>	Migration ↓ Proliferation ↓	(Grunewald <i>et al.</i> , 2007a)
Pankreaskarzinom	KD  Über-expression	<i>in vitro</i> <i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	Invasion ↓ Migration ↓ Invasion ↑ Migration ↑ Metastasierung ↑ Tumorwachstum ↑	(Zhao <i>et al.</i> , 2015)
Prostatakarzinom	KD	<i>in vitro</i>  <i>in vivo</i>	Invasion ↓ Migration ↓ Proliferation ↓ Tumorwachstum ↓	(Hailer <i>et al.</i> , 2014; Dejima <i>et al.</i> , 2017; Sun <i>et al.</i> , 2017a)
Medulloblastom	KD	<i>in vitro</i>	Migration ↓ Proliferation ↓ Adhäsion ↑	(Traenka <i>et al.</i> , 2010)

Häufiger wird in letzter Zeit die Regulation von LASP1 durch miRs und der Effekt von LASP1 auf Tumoraggressivität gleichzeitig betrachtet, indem durch Überexpression einer LASP1 regulierenden miR ein LASP1-KD und ein Phänotyp erreicht wird, der durch LASP1-Reexpression aufgehoben wird, zum Beispiel im Falle von miR-29a im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Hu *et al.*, 2016).

Wie der Effekt von LASP1 auf Tumoraggressivität vermittelt wird, muss noch geklärt werden. Neben den zahlreichen Interaktionen von LASP1 mit dem Zytoskelett werden Interaktionen im Zellkern diskutiert. So wurde erstmals für das Mammakarzinom die bis dahin unbekannte nukleäre LASP1 Lokalisation gezeigt (Grunewald *et al.*, 2007b), gefolgt vom hepatozellulären Karzinom (Wang *et al.*, 2013a), ösophagealen Plattenepithelkarzinom (He *et al.*, 2013) und Prostatakarzinom (Hailer *et al.*, 2014). Duvall-Noelle *et al.* zeigten eine nukleäre LASP1 Anreicherung in Mammakarzinomzelllinien nach Chemokin- und Wachstumsfaktor-Behandlung und in Co-Immunopräzipitationsassays und

GST-Pulldown eine LASP1 Interaktion mit *Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1* (UHRF1), Histonmethyltransferase G9a, *DNA methyltransferase 1* (DNMT1) und dem Transkriptionsfaktor Snail1 (Duvall-Noelle *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse deuten auf eine Assoziation der nukleären LASP1 Lokalisation mit epigenetischer Regulation hin (Duvall-Noelle *et al.*, 2016). Zusätzlich ist ein positiver Effekt von LASP1 auf den MAPK Signalweg und epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschrieben (Wang *et al.*, 2013b; Xu *et al.*, 2014). Die durch LASP1-Expression bedingte erhöhte Invasion von Tumorzellen könnte auch durch die Regulation von Matrixmetalloproteinase-Transkription und -Sekretion durch LASP1 vermittelt sein (Endres *et al.*, 2016). Im colorektalen Karzinom konnte mittels Co-Immunopräzipitation eine Interaktion von LASP1 mit S100A11, ein Calcium Bindeprotein (Niu *et al.*, 2016), und mit 14-3-3 $\sigma$ , ein Tumorsuppressor (Shao *et al.*, 2016), gezeigt werden, wobei S100A11 erhöht exprimiert wird und für den bereits beschriebenen Effekt von LASP1 auf EMT notwendig ist, während 14-3-3 $\sigma$  ausschließlich auf dem Proteinlevel herunterreguliert wird (Niu *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2016). Im Gallenblasenkarzinom wurde ein negativ regulierender Effekt von LASP1 auf ein weiteres Protein der S100 Familie, S100P beschrieben (Li *et al.*, 2016).

Im Einklang mit der in Zelllinienmodellen beobachteten LASP1 vermittelten Tumoraggressivität sind klinische Studien, die LASP1-Überexpression mit aggressiveren Tumoren und/ oder schlechterem klinischem Ergebnis korrelieren, zum Beispiel im Mammakarzinom (Asaka *et al.*, 2006; Frietsch *et al.*, 2010), hepatozellulären Karzinom (Wang *et al.*, 2013a) und Pankreaskarzinom (Zhao *et al.*, 2015). Im Mammakarzinom konnte auch für nukleäres LASP1 eine Korrelation mit schlechterem Überleben bestimmt werden (Frietsch *et al.*, 2010). Für das Prostatakarzinom wurde ein *Genomic Classifier* entwickelt, bestehend aus 22 Markern, darunter LASP1, der innerhalb jedes Gleason Scores mit dem Überleben korreliert ist (Erho *et al.*, 2013). Im Magenkrebs und hepatozellulären Karzinom ist die LASP1-Expression sogar ein unabhängiger prognostischer Faktor für Überleben (Wang *et al.*, 2013a; Zheng *et al.*, 2014). Der Wert von LASP1-Expression als Biomarker ist daher

hauptsächlich ein prognostischer. Für die Anwendung von LASP1-Expression als prognostischen Marker wird ein OP-Präparat oder Biopsie-Material benötigt.

### **1.3. LASP1 im Transitionalzellkarzinom**

Auch für das Transitionalzellkarzinom wird LASP1 als Biomarker diskutiert, hier allerdings erstmals als diagnostischer Marker. Chiyomaru *et al.* untersuchten *Fascin homolog 1* (FSCN1) als Target von im Blasenkarzinom herunterregulierten microRNAs miR145 und miR133a (Chiyomaru *et al.*, 2010). Die Beschreibung einer Kolo-kalisation von FSCN1 und LASP1 an Aktinbündeln von Lamellipodien (Nakagawa *et al.*, 2006) machte erstmals auf eine mögliche Rolle von LASP1 im Blasenkarzinom aufmerksam. Es konnte mittels qPCR gezeigt werden, dass LASP1 auf mRNA Level in Blasenkrebs Proben im Vergleich zu normalem Urothel signifikant überexprimiert ist. Gleiches konnte für die drei TCC-Zelllinien BOY, KK47 und T24 gezeigt werden. Eine mögliche funktionelle Relevanz von LASP1 im TCC zeigte sich bei reduzierter Proliferation von BOY und KK47, nicht aber von T24, in einem XTT Assay nach siRNA vermitteltem LASP1-KD. Der gemessene Effekt auf Zellviabilität betrug zwischen 13,1 % und 11,5 % Reduktion im Vergleich zur Kontrolle. Im Wundheilungsassay und Matrigel Invasionsassay zeigte sich eine signifikante Verringerung von Wundverschluss und Invasion für T24 und BOY nach LASP1-KD. Des Weiteren konnte LASP1 als direktes Target der microRNAs miR-1, miR-133a, und miR-218 dargestellt werden, deren Bindeseiten in der 3'UTR liegen. Interessanterweise konnte nach miR-1 und miR-133a Transfektion für alle drei getesteten Zelllinien, auch T24, konsistent eine Reduktion der Zellviabilität, gemessen mit XTT Assay, festgestellt werden (Chiyomaru *et al.*, 2012).

Ardelt *et al.* bestätigten die funktionelle Relevanz von LASP1 in T24 TCC-Zellen durch eine signifikant reduzierte Migration im Transwellassay nach LASP1-KD. Jedoch konnte abermals keine Reduktion der Proliferation, hier in einem MTT Assay, durch LASP1-KD gezeigt werden. Allerdings führte LASP1-KD in T24 zu einer signifikant höheren Adhäsion (Ardelt *et al.*, 2013).



Neu war der Fokus auf LASP1 als möglichen diagnostischen Marker im TCC. Während die immunhistochemische Färbung für LASP1 nur eine gering höhere LASP1-Expression in malignem Urothel im Vergleich zu gesundem Urothel zeigte, konnte durch einen quantitativen Western Blot des Pellets von 500 µl Urin ein erhöhter LASP1 Gehalt in Patientenproben nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist eine niedrigere Adhäsion von LASP1 hoch-exprimierenden Urothelzellen und ein vermehrtes Abschilfern in den Urin, passend zu den Ergebnissen für T24 im Adhäsionsassay. Bei Anwendung eines Cut-Offs von >1 ng LASP1/500 µl Urin wurde eine Sensitivität von 83,1 % und eine Spezifität von 85,3 % berechnet. Der positive und negative Prädiktionwert in der Kohorte von 64 Transitionalzellkarzinompatienten und 68 gesunden Freiwilligen betrug 83,1 % und 80,6 % (Ardelt *et al.*, 2013). Daher überwindet der LASP1 Gehalt im Urinpellet als diagnostischer Marker für das Transitionalzellkarzinom das Dilemma anderer Marker und Markerkombinationen, entweder spezifisch oder sensitiv zu sein. Zusätzlich stellt diese Studie erstmals eine Verwendung von LASP1 als Marker dar, für die keinerlei invasive Maßnahmen notwendig sind.

Limitationen sind allerdings Harnwegsinfekte und eine Hämaturie mit mehr als 200 Zellen/µl Urin. Beides kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher wurden Fälle mit mehr als 250 Erythrozyten und 15 Leukozyten/µl Blut im Test auf LASP1 im Urinpellet ausgeschlossen (Ardelt *et al.*, 2013). Im Falle einer Infektion ist ein Test auf LASP1 erst nach Abklingen der Infektion angeraten. Im Falle einer Hämaturie wird meist die Zystoskopie empfohlen.

In einer Folgestudie beschäftigten sich Butt *et al.* mit dem Problem der falsch negativen Proben, suchten nach Alternativen zum Urinpellet-Western Blot und ermittelten den optimalen Cut-Off zum Ausschluss von Proben mit Leukozyt- und/oder Hämaturie (Butt *et al.*, 2017). Falsch negative Proben können eine Folge einer zu langen Lagerung bzw. eines langen Proben transports mit einhergehender LASP1 Degradation sein. Ohne Stabilisatoren ist bereits nach einem Tag eine Degradation sichtbar. Thimerosal verhindert die Degradation von LASP1 für mindestens vier Tage. Ein zusätzlicher Nutzen oder eine alternative Anwendung von LASP1 Detektion in der Zytologie oder im

Durchflusszytometer wurde nicht festgestellt, angesichts einer geringgradigen LASP1 Färbung auch in gesunden Proben bzw. eines zu geringen Zellgehalts im Urin für Durchflusszytometrie. In einer größeren Kohorte von 141 Patienten und 105 Kontrollen wurde nochmals der optimale Cut-Off für den Ausschluss von Patienten mit Erythrozyten und oder Leukozyten im Urin berechnet, um sowohl die besten prädiktiven Werte zu erhalten, als auch möglichst viele Patienten einzuschließen. Bei der Anwendung von 200 Erythrozyten und 25 Leukozyten/ $\mu$ l Urin als obersten Grenzwert, mussten lediglich 17 % der Fälle ausgeschlossen werden und es konnte eine Sensitivität und Spezifität von 59 % und 80 % und ein positiver und negativer Prädiktionswert von 80 % und 59 % erreicht werden (Butt *et al.*, 2017).

Insgesamt stellt der LASP1 Gehalt im Urinpellet also einen vielversprechenden diagnostischen Marker für das Transitionalzellkarzinom dar. Angesichts der hohen Rate an Patienten, die bei Erstvorstellung eine Hämaturie zeigen, ist die Bedeutung dieses Markers wahrscheinlich vor allem in der Nachsorge gegeben, und könnte damit die Rate von Zystoskopien reduzieren sowie die Nachsorge für Patienten angenehmer gestalten und Infektionen und hohe Kosten vermeiden.

Die funktionelle Relevanz von LASP1 im TCC ist aber durch die bisherigen *in vitro* Studien noch nicht detailliert aufgeklärt. Ebenso waren die in der LASP1 Forschung aktuellen Themen der nukleären Lokalisation als mögliche Voraussetzung für einen Effekt von LASP1 auf Tumorzellverhalten und der prognostische Wert von LASP1 im Transitionalzellkarzinom nicht untersucht.

Daher wurden als Ziele dieser Arbeit formuliert 1) die Generierung von stabil transfizierten, induzierbar *LASP1* spezifische shRNA exprimierenden Transitionalzellkarzinomzelllinien, 2) die funktionelle Charakterisierung eines LASP1-Knockdowns in selbigen *in vitro*, und 3) der Vergleich von Eigenschaften von LASP1 im Transitionalzellkarzinom mit denen in anderen Karzinomen.

Dadurch sollten Zelllinienmodelle für *in vivo* Versuche generiert werden, bisherige funktionelle Analysen für LASP1 im Transitionalzellkarzinom validiert werden, und das Verständnis von LASP1 als wichtiger Mediator von

Tumoraggressivität und dessen Relevanz im TCC erweitert werden. Dies kann als weiteres Puzzleteil im Gesamtbild von *LASP1* als wichtiger Effektor in einer Vielzahl von Krebserkrankungen dienen.

Hierzu wurden Microarray und Western Blot Analysen zur Bestimmung einer *LASP1*-Überexpression im TCC und in den TCC-Zelllinien T24 und RT4 durchgeführt. Diese bereits als für Xenotransplantation geeignet beschriebenen Zelllinien wurden lentiviral mit induzierbarer *LASP1* spezifischer shRNA transduziert. In den weiteren Versuchen wurde ein *LASP1*-KD durch Zugabe von Doxycyclin ins Medium induziert, was ebenso im Mausversuch durch Zugabe von Doxycyclin ins Trinkwasser möglich ist. Der Effekt eines *LASP1*-KD wurde in einem Adhäsionsassay, gezählten und metabolischen Proliferationsassay und Transwell-Migrationsassay evaluiert. Ein besonderer Fokus wurde auf den Adhäsionsassay gelegt, da eine erhöhte Adhäsion bei *LASP1*-KD zumindest partiell den erhöhten *LASP1* Gehalt im Urinpellet von Patienten erklären könnte. Zum Nachweis von nukleärem *LASP1* wurden Immunhistochemie und Kern-Zytosol-Trennung verwendet.

Weiterhin wurden bioinformatische Enrichment Analysen zur Identifikation mit *LASP1* assoziierter Phänotypen und zur Plausibilitätsprüfung eigener Ergebnisse durchgeführt. Auf Basis von Daten des The Cancer Genome Atlas (TCGA) Projekts wurde die Regulation von *LASP1* durch miRs und die prognostische Relevanz von *LASP1* untersucht.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Lieferant</i>
HEK293T	Humane embryonale Niere	American Type Culture Collection, USA
RT4	Humanes Transitionalzellpapillom	American Type Culture Collection, USA
T24	Humanes Transitionalzellkarzinom	American Type Culture Collection, USA

#### 2.1.2. Medien und -Zusätze für Zellkultur

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
DMEM+GlutaMAX-I	GIBCO, Deutschland
Doxycyclinhyclate (min. 98 %)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	GIBCO, Life Technologies GmbH, Deutschland
Fetales Bovines Serum (FBS)	GIBCO, Life Technologies GmbH, Deutschland
Keratinozyten Serum Freies Medium	Life Technologies GmbH, Deutschland
McCoy's 5A Medium	GIBCO, Life Technologies GmbH, Deutschland
Medium 199 (10x)	Sigma-Aldrich, Deutschland
MEM Non-Essential Amino Acid Solution (100x)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Plasmocin treatment	InvivoGen, USA
Puromycindihydrochlorid	Genaxxon Bioscience, Deutschland
RPMI1640+GlutaMAX-I	GIBCO, Life Technologies GmbH, Deutschland
SodiumPyruvate (100 nM; 100x)	GIBCO, Life Technologies GmbH, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution (1x)	Sigma-Aldrich, Deutschland

### 2.1.3. siRNAs, lentivirale Vektoren und Transfektionsreagenzien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
LASP(A)	Dharmacon, Thermo-Fisher-Scientific, USA
LASP(C)	Dharmacon, Thermo-Fisher-Scientific, USA
HiPerFect Transfection Reagent	QIAGEN, Deutschland
Polybrene Infection/Transfection Reagent	Merck, Deutschland
pTRIPZ lentiviraler Vektor mit nicht-interferierender Kontroll-shRNA	Thermo-Scientific, USA
pTRIPZ lentiviraler Vektor mit shRNA gegen LASP1 (V2THS-64686)	Thermo-Scientific, USA
si Control Non-Targeting siRNA # 2	Dharmacon, Thermo-Fisher-Scientific, USA

### 2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel30)	Carl Roth, Deutschland
Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich, Deutschland
Albumin Standard	Thermo-Scientific, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Calyculin A	Merck, Deutschland
Cholera Toxin von <i>Vibrio Cholerae</i>	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Diamino-Benzidin (Entwicklerlösung)	Dako, Deutschland
Ethanol (unvergällt)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Essigsäure (100 %)	J.T.Baker, MalinckrodtBaker B.V., Niederlande
Fibrinogen	Sigma-Aldrich, Deutschland
Fibronectin from bovine plasma	Sigma-Aldrich, Deutschland
Glycerin Rotipuran (min. 99,5 %)	Carl Roth, Deutschland
Glycine	Sigma-Aldrich, Deutschland
Goatserum	Sigma-Aldrich, Deutschland
HEPES Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Deutschland
Kollagen Typ I von Kälberhaut	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kollagen Typ I von Rattenschwanz	Santa Cruz Biotechnology, USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Deutschland

Leupeptin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Milchpulver (Blotting-Grade Blocker)	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumhydroxid Plättchen	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumhydroxid (5N)	Merck, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deutschland
PBS Dulbecco Pulver	Biochrom, Deutschland
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Deutschland
Pefabloc	Roche, Deutschland
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Poly-L-Lysine (0,1 % in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ponceau S	Roth, Deutschland
Proteingrößenstandard PageRuler	Thermo-Fisher-Scientific, USA
Prestained Protein Ladder	
Salzsäure (5N)	Merck, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sucrose (99+%)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sulforhodamin B Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylenediamine	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trichloressigsäure Rotipuran (>99%p.a.)	Carl Roth, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (TRIZMA Hydrochloride)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween	Serva Electrophoresis, Deutschland
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Wasser für Injektionszwecke	Aventis Behring, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 % Lsg. in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Deutschland

### 2.1.5. Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
CellTiter-Glo Luminescent Cell viability Assay	Promega Corporation, USA
Ne-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo-Fisher-Scientific, USA
Pierce BCA Protein Assay Reagenz A	Thermo-Fisher-Scientific, USA

und Reagenz B	
Trans-Lentiviral shRNA Packaging Kit with Arrest-In	Thermo Scientific ABgene, UK
Venor GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR	Minerva Biolabs, Deutschland

## 2.1.6. Antikörper

### 2.1.6.1. Primärantikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Typ</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
β-Aktin	Poly, Kaninchen	1:4.000	Santa Cruz Biotechnology, USA
GAPDH	Poly, Ziege	1:1.000	
Lamin	Mono, Maus	1:50	
LASP-1	Poly, Kaninchen	1:10.000	ImmunoGlobe, Deutschland
LASP anti-phosphoSerin146 IG566	Poly, Kaninchen	1:5.000	ImmunoGlobe, Deutschland
M4	Poly, Kaninchen	1:1.000	Nanotools, Deutschland
ZO-2	Poly, Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA
Zyxin	Mono, Maus	1:2.000	Synaptic Systems, Deutschland

### 2.1.6.2. Sekundärantikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Markierung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Donkey Anti-Goat IgG	Meerrettich-peroxidase	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Goat Anti-Mouse IgG	Meerrettich-peroxidase	1:5.000	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Goat Anti-Rabbit IgG	Meerrettich-peroxidase	1:5.000	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland

### 2.1.6.3. Sekundärantikörper - Immunfluoreszenz

<i>Bezeichnung</i>	<i>Markierung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Rabbit Cy3 IgG	Indocarbocyanin	1:500	Dianova, Deutschland
Oregon Green	Oregon Green	1:50	Life Technologies

**2.1.7. Verbrauchsartikel**

<i>Art</i>	<i>Bezeichnung, Hersteller bzw. Lieferant</i>
Combitips	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (5 ml) Combitipsadvanced, Eppendorf, Deutschland</li> <li>• (2,5 ml, 10 ml, 12,5 ml) Combitips plus, Eppendorf, Deutschland</li> </ul>
Cryovials	(2 ml) Cryovial, Simport, Kanada
Deckgläschen	24 mm, Hartenstein, Deutschland
FACS-Lösungen	BD FACS Flow, Rinse und Clean, Becton Dickinson, USA
FACS-Röhrchen	(5 ml) Rundboden-Röhrchen mit integriertem Zellsieb (12x75 mm), BD Falcom Deutschland
Filme für Chemilumineszenz	Fujifilm SuperRX 100NIF, Fujifilm Europe, Deutschland
Filter	(0,2 µm, 0,45 µm) Filtropur S, Sarstedt, Deutschland
Injektionskanüle	(20 Gx1 ½“) BD Microlance 3– Nr. 1, Becton Dickinson, USA
Kulturflaschen	(25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> ) Cellstar Zellkulturflaschen, Greiner Bio-One, Österreich
Kulturplatten	(10 cm) Cellstar Kulturplatte, Greiner Bio-One, Österreich
Multiwellplatten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (96 Well) Flachboden Multiwellplatte Lumitrac 200, Greiner Bio-One, Österreich</li> <li>• (96 Well) Costar Flachboden Multiwellplatte, Sigma-Aldrich, Deutschland</li> <li>• (48 Well, 24 Well, 12 Well, 6 Well) Cellstar Flachboden Multiwellplatte, Greiner Bio-One, Österreich</li> <li>• (48 Well) Flachboden Suspensionskultur Multiwellplatte, Greiner Bio-One, Österreich</li> </ul>
Nitrocellulose	Whatman Protran Nitrocellulose Transfermembran, Whatman, Deutschland
Objektträger	76x26 mm Objektträger, R.Langenbrinck, Deutschland
Parafilm Laborfilm	Parafilm M, American National Can, USA
pH-Indikatorpapier	Merck, Deutschland
Pasteurpipetten	230 mm, Brand, Deutschland
serologische Pipetten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (5 ml, 10 ml, 25 ml) Cellstar Pipetten, Greiner Bio-One, Österreich</li> <li>• (2 ml, 5 ml, 10 ml) Glaspipetten, Paul Marienfeld,</li> </ul>



Pipettenspitzen	Deutschland (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) Biosphere Filter Tips, Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (1,5 ml, 2 ml) Eppendorf Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Deutschland</li> <li>• (1,5 ml) Reagiergefäße, Sarstedt, Deutschland</li> <li>• (15 ml, 50 ml) Cellstar Polypropylen Tubes, Greiner Bio-One, Österreich</li> </ul>
Sensoren für Zellzähler	Scepter Sensors-60 µm, Merck, Deutschland
Skalpell	Chirurgische Einmal-Skalpelle, B.Braun, Deutschland
Spritzen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insulinspritze Omnican 40, B.Braun, Deutschland</li> <li>• (10, 20 ml) BD Discardit II, Becton Dickinson, USA</li> </ul>
Transwelleinsätze für Migration	Costar Transwell, Corning Incorporated, USA
Whatman-Papier	Whatman, Deutschland
Zellschaber	Cell Scraper, SPL Life Sciences, Korea

### 2.1.8. Technische Hilfsmittel

<i>Art</i>	<i>Bezeichnung, Hersteller</i>
Absaugpumpe	Laboport Vakuumpumpe, KNF Neuberger, Deutschland
Belichtungskammer für Chemilumineszenz	Dr. Goos-Suprema, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Calibur, Becton Dickinson, USA
Entwickler	X-OMAT M 35, Kodak, Deutschland
Gelkammern	Eigenbau
Heizlüfter	Certomat H, B.Braun, Deutschland
Kamerasystem für Immunhistochemie	Nikon Digital Sight DS-L1, Nikon Corporation, Japan
Werkbank, steril	sterilGard Glass II Type A/B3, The Bakor Company, USA
Kühlgeräte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gefrierschrank LiebherrMediLine, Liebherr International, Deutschland</li> <li>• ECU 5085-5 Labortiefkühlschrank, ProfiLine, National Lab GmbH, Deutschland</li> <li>• KryotankChronosBiosafe Cryomatik, Messer, Deutschland</li> <li>• Kühlschrank Kirsch, Philipp Kirsch, Deutschland</li> </ul>

Inkubator	Model3336, Labotect, Deutschland
Magnetrührer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MS-H-S, Dragon LAB, China</li> <li>• RCTbasic, IKA Werke, Deutschland</li> <li>• Variomag MonothermElectonikrührer, 2mag, USA</li> </ul>
Mikroinjektionsspritze	Hamilton Microliter Spritze, Hamilton Bonaduz, Schweiz
Mikroskop	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Axiovert 25, Carl Zeiss, Deutschland</li> <li>• Axiovert 200, Carl Zeiss, Deutschland</li> <li>• Axioskop, Carl Zeiss, Deutschland</li> </ul>
Netzgerät	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PowerPac300, Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland</li> <li>• PowerPacHC, Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland</li> </ul>
pH-Meter	PHM82 Standard pH-Meter, Radiometer Analytical, Frankreich
Pipette (elektrisch)	Accu-jet pro, Brand, Deutschland
Pipetten (manuell)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) Eppendorf Reference, Eppendorf, Deutschland</li> <li>• (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) Eppendorf Research, Eppendorf, Deutschland</li> <li>• (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) Pipet-Lite, Rainin Instrument, USA</li> <li>• Multipipette Multipipette, Eppendorf, Deutschland</li> </ul>
Pinzetten	Dumont Präzisionspinzette Medical Grade, Electron Microscopy Science, USA
Plattenlesegeräte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ThermoMaxMicroplate Reader, Molecular Devices, Deutschland</li> <li>• Victor2 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer, USA</li> </ul>
Schüttler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duomax1030, Heidolph Instruments, Deutschland</li> <li>• KS 10, Edmund Bühler, Deutschland</li> <li>• Orbitalshaker Rotamax 120, Heidolph Instruments, Deutschland</li> <li>• Vibro-Shaker L-40, Hartenstein, Deutschland</li> </ul>
Thermomixer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland</li> <li>• Thermomixer compact, Eppendorf, Deutschland</li> </ul>

Transferkammer für Western Blot	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Shaker TS100 mit Aufsatz SC-20, Eppendorf, Deutschland</li> </ul>
Vortexer	Trans-Blot Cell, Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Wasserbad	Vortex Genie 2, Bender&Hobein, Schweiz
Waagen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Köttermann, Deutschland</li> <li>• GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland</li> <li>• Analysewaage: Sartorius type 1801, Sartorius, Deutschland</li> <li>• Präzisionswaage: Sartorius universal, Sartorius, Deutschland</li> </ul>
Zellzählhilfe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neubauer Zählkammer improved 0,01mm, Paul Marienfeld, Deutschland</li> <li>• Scepter Handheld Automated Cell Counter, Merck, Deutschland</li> </ul>
Zellsorter	Sort Master (Smart Sampler), <i>DakoCytomation</i> , Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifuge 5415D, Eppendorf, Deutschland</li> <li>• Centrifuge 5417R (Kühlzentrifuge), Eppendorf, Deutschland</li> <li>• L-80 Ultracentrifuge, BeckmanCoulter, Deutschland</li> <li>• Mikro120, Andreas Hettich, Deutschland</li> <li>• Universal 16A und 320R, Andreas Hettich, Deutschland</li> </ul>

## 2.1.9. Software

### *Bezeichnung*

Adobe Photoshop CS2 Version 9.0.2  
 GIMP 2.6.11, GNU Image Manipulation Program  
 GraphPadPrism 2.01  
 ImageJ 1.43u, USA  
 Microsoft Office 2010  
 Zotero 5.0

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkulturbedingungen**

Die humanen Zelllinien wurden in einer 5 % CO<sub>2</sub>-haltigen, feuchten Atmosphäre bei 37°C in sterilen Kulturgefäßen gezüchtet.

Für die Transitionalzellkarzinomzelllinien T24 und RT4 wurde McCoy's 5A Medium verwendet, für die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).

Dem Medium wurden jeweils Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 ng/ml) zur Kontaminationsprophylaxe, 1 nM Pyruvat und 1X nichtessentielle Aminosäuren für verbessertes Wachstum und 10 % fetales Kälberserum (FCS) als Mitogen zugesetzt.

Mit dem Begriff Medium wird im Folgenden das Medium mit allen Zusätzen beschrieben, andernfalls wird der Begriff Basismedium verwendet.

Alle verwendeten Zelllinien wachsen adhärent.

Alle Zelllinien wurden auf Mykoplasmen getestet mittels PCR basierendem Detektions-Kit entsprechend der Herstellerangaben und maximal bis zur siebten Passage verwendet.

Mykoplasmen-positive Zellen wurden mit 25 mg/ml Plasmocin für zwei Wochen behandelt. Das Medium wurde dabei alle drei Tage erneuert. Die Eradikation der Mycoplasmen-Infektion wurde mittels Detektions-Kit bestätigt.

### **2.2.2. Ernten von adhärennten Zellen**

Um mit adhärennt wachsenden Zellen arbeiten zu können, müssen sie von der Wachstumsfläche abgelöst, geerntet werden.

Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Wachstumsfläche mit PBS gewaschen, um Zellschrott und an den Zellen haftendes FCS zu entfernen, und mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) dünn überschichtet. Hierbei baut Trypsin die Haftkomplexe der Zellen proteolytisch an, sowohl solche von Zelle zur Wachstumsoberfläche als auch interzelluläre, während EDTA als Chelatkomplexbildner Kationen bindet, welche Trypsin inhibieren würden. Für eine schnellere Proteolyse wurden die Zellen 5 min bei 37°C inkubiert.

Sobald sich die Zellen abkugelten und im Medium zu schwimmen begannen, wurden sie durch Klopfen am Kulturgefäß mechanisch gelöst. Daraufhin wurde das Trypsin mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt. Mit der daraus entstandenen Trypsin-PBS-Zellmischung wurde die Wachstumsfläche mehrmals gewaschen, um die übrigen Zellen zu lösen. Durch Zugabe des gleichen Volumens an Medium und dem darin enthaltenen FCS wurde die proteolytische Reaktion des Trypsins abgestoppt.

Die Zellen wurden bei 160 g 4 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert.

### **2.2.3. Splitten adhärenter Zellen**

Zum einen muss die Anzahl der Zellen in Kultur regelmäßig erhöht werden, um genügend für diverse Versuche zur Verfügung zu haben und aus speziell behandelten Zellen eine große Population zu generieren, zum anderen ist das Wachstum der Zellen, sobald sie konfluent sind, deutlich inhibiert; teils überwachsen sich die Zellen und werden dadurch apoptotisch. Daher wurden alle Zellen spätestens im konfluenten Zustand gesplittet, optimalerweise aber subkonfluent, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht in den Wachstumsarrest eingetreten waren.

Üblicherweise wurden die Zellen 1:3 gesplittet, also so viele Zellen auf eine Fläche, dass diese zu ca. 1/3 bedeckt war. Je nach Verwendung der Zellen wurden die Zellen aber angepasst an ihre Wachstumsgeschwindigkeit auch anders gesplittet. Hierbei wurde als Bezugspunkt genommen, dass die Zelllinien T24 und RT4 ca. zwei Tage in Kultur benötigten um sich zu verdoppeln, drei um sich zu verdreifachen und vier um sich zu verfünffachen.

Zum Splitten der Zellen wurden die Zellen geerntet, das Zellpellet in 1ml Medium aufgenommen und der gewünschte Anteil Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß mit vorgelegtem Medium überführt.

Sollten die Zellen lediglich zum Erhalt gesplittet werden, wurde die Zellwachstumsfläche mit PBS gewaschen, die Zellen wieder mit Trypsin bei 37°C gelöst, das Trypsin mit der doppelten Menge Medium abgestoppt und der

gewünschte Anteil der daraus entstandenen Trypsin-Medium-Zellsuspension in ein neues Kulturgefäß mit vorgelegtem Medium überführt.

#### **2.2.4. Zellen einfrieren und auftauen**

Werden Zellen mehrmals hintereinander gesplittet, kommen sie also in immer höhere Passagen, so besteht die Möglichkeit, dass sich ihr Verhalten in verschiedener Hinsicht ändert. Alle Zelllinien wurden daher maximal bis zur siebten Passage verwendet.

Um eine lange Verweildauer der Zellen in Kultur zu vermeiden und dennoch jederzeit genügend Zellen zur Verfügung zu haben, können Zelllinien eingefroren gelagert werden.

Hierzu, wurden die Zellen geerntet, pro ca.  $2 \times 10^6$  Zellen (für T24 und RT4 entspricht dies etwa einer halben dicht bewachsenen T75 Kulturf flasche) zu 1 ml Medium 125  $\mu$ l FCS und 125  $\mu$ l Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben, welches Zellschäden durch Eiskristalle verhindert. Die Zellen wurden in diesem Gemisch resuspendiert, und je 1,25 ml der Suspension in ein Cryoröhrchen überführt.

Die Cryoröhrchen wurden wegen der zytotoxischen Wirkung von DMSO schnellstmöglich in einem Styroporbehälter in einen  $-80^{\circ}\text{C}$ -Gefrierschrank überführt. Nachdem die Zellen so allmählich runter gekühlt wurden, konnten die Cryoröhrchen am Folgetag in flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

Zum Auftauen der Zellen wurde das jeweilige Cryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zuerst in einem auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgeheizten Wasserbad angetaut. Der aufgetaute Inhalt wurde mit einer Pipette in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml frischem warmen Medium überführt, der noch gefrorene Inhalt wurde mit dem warmen Medium aufgetaut und ins selbe Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann 4 min bei 160 g abzentrifugiert, der Überstand wurde vollständig abgesaugt, um die Restmenge DMSO minimal zu halten, die Zellen wurden in Medium resuspendiert und zuletzt in ein Kulturgefäß überführt.

Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Zellen, sobald adhärent, ca. 50 % konfluent waren. So sollte durch eventuelle parakrine Signale der Zellen ein

optimales Wachstum nach dem Zellstress durch Einfrieren und Auftauen gewährleistet werden.

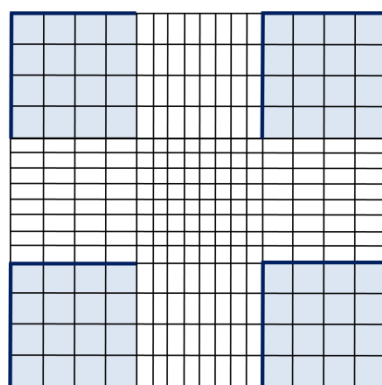
### 2.2.5. Zellen zählen

Für die verschiedenen funktionellen Assays, die mit den TCC-Zelllinien durchgeführt wurden, war es entscheidend, möglichst genau zu wissen, welche Zellzahl geerntet wurde.

Es wurden zwei verschiedene Methoden der Zellzählung verwendet:

#### 2.2.5.1. Zellzählung mit Neubauerkammer

Die geernteten Zellen wurden in exakt 1 ml Medium resuspendiert, 10  $\mu$ l Zellsuspension mit 90  $\mu$ l Medium 1:10 verdünnt, von der Verdünnung wurden 10  $\mu$ l in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl in vier großen Quadraten bestimmt, die jeweils aus 4x4 Quadraten bestehen. Zellen, die auf den äußersten Linien lagen, wurden bei jeder Zählung nur immer bei der gleichen horizontalen und vertikalen Linie beachtet, nicht aber auf der anderen horizontalen und vertikalen Begrenzungslinie (Abb. 3). Das arithmetische Mittel der Werte wurde berechnet, mit dem Faktor  $10^4$  (Faktor der Neubauer-Kammer) und dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert. Das Produkt entspricht der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.



**Abb. 3: Schema des Gitters einer Neubauer-Kammer.** Zellen im blau markierten Bereich und auf dicken blauen Linien werden gezählt.

Um besser lebende und tote Zellen unterscheiden zu können, kann anstatt Medium zum Verdünnen der Zellsuspension Trypanblau verwendet werden. Die Zellmembran von toten Zellen ist nicht integer, weshalb solche durch Trypanblau angefärbt werden.

#### **2.2.5.2. Zellzählung mit Scepter™ der Firma Millipore**

Die geernteten Zellen wurden in Medium resuspendiert. Üblicherweise wurden 20 µl Zellsuspension in 380 µl PBS 1:20 für die Zählung vorverdünnt, teilweise wurde die Verdünnung an die erwartete Zellzahl angepasst, da bei dem Scepter-Zählgerät nur bis zu einer Zellzahl von ca.  $5 \times 10^5$  von einem genauen Ergebnis ausgegangen werden darf. Die Zellverdünnung wurde dann nach Aufstecken eines 60 µm Sensors durch das Zellzählgerät aufgesogen. Die Zellzahl pro Milliliter Verdünnung wurde automatisch berechnet durch Messung von Widerstandsänderungen, welche von der Scepter-Software in Zellgröße verrechnet und gezählt werden. Anhand eines so entstehenden Diagramms von Zellgröße und Anzahl der Messungen bestimmt die Software die Zellzahl als Integral unter dem Peak bei Ausschluss der Ausreißer. So musste das Messergebnis lediglich mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten.

Hauptsächlich wurde die Methode mit der Neubauer-Zählkammer verwendet, da diese sehr günstig ist und vor allem in Kombination mit Trypanblau eine gute Unterscheidung von toten und lebenden Zellen erlaubt. Der klare Vorteil des Scepter-Zählgerätes lag in der Schnelligkeit, weshalb er vor allem beim parallelen Auszählen vieler verschiedener Zellsuspensionen verwendet wurde.

#### **2.2.6. Transfektion mit small interfering RNA**

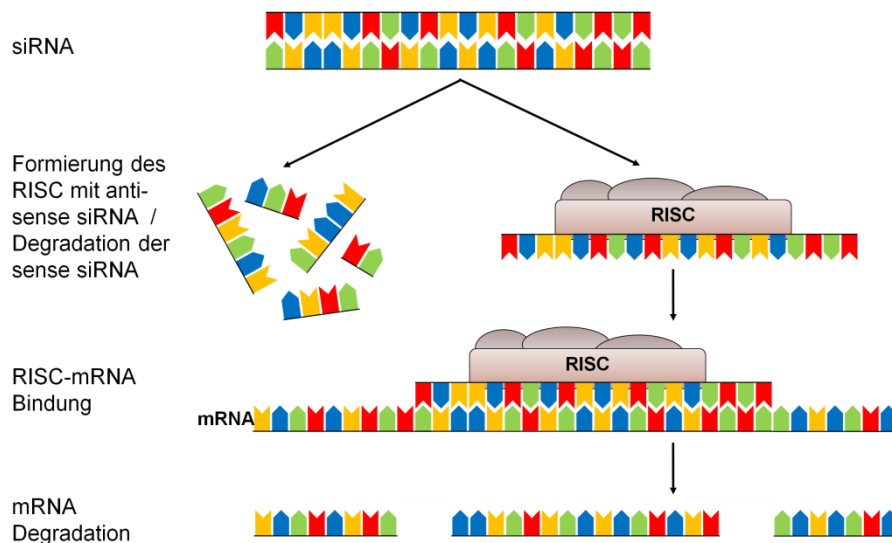
Small interfering RNA (siRNA) ermöglicht ein posttranskriptionelles Gen-Silencing:

siRNA, doppelsträngige Oligonukleotide, werden mittels eines Transfektionsreagenzes in Zellen eingebracht. Hier wurde das Transfektionsreagenz HiPerFect von Qiagen verwendet. Dieses besteht aus



kationischen und neutralen Lipiden, welche die siRNA ummanteln, durch die Zellmembran schleusen und dort wieder freigeben.

In der Zelle bildet die einzelsträngige siRNA zusammen mit anderen Proteinen den *RNA-induced-silencing complex* (RISC). Dieser bindet komplementäre transkribierte mRNA, die daraufhin deadenyliert und schrittweise degradiert wird (Abb. 4). Die siRNA verwendet also die gleichen Proteine und den gleichen Wirkmechanismus wie endogene microRNA (Novina and Sharp, 2004).



**Abb. 4: Schema zur Funktionsweise von siRNA.** siRNA ist ein doppelsträngiges Oligonukleotid. In der Zelle wird das Oligonukleotid zu Einzelsträngen aufgesplittet, der zur mRNA komplementäre Strang, der anti-sense Strang, bildet mit cytosolischen Proteinen den RISC und lagert an die mRNA an. Die mRNA wird daraufhin abgebaut.

In der Folge verarmt bei fehlender Nachproduktion die Zelle an dem Protein.

Diese Methode wurde verwendet, um einen transienten LASP1-Knockdown zu generieren. Die zu transfizierenden Zellen wurden geerntet, in einer Konzentration in ein Kulturgefäß überführt, die suffizient ist, um am Tag der Verwendung der Zellen eine genügende Anzahl zu erreichen.

Basismedium wurde in ein Reagiergefäß vorgelegt, dessen Volumen 10 % des Gesamtvolumens an Medium entspricht, in welchem die Zellen ausgesät wurden. Pro 500 µl Basismedium wurden 1,2 µl siRNA (20 µM) und 12 µl Transfektionsreagenz HiPerFect zugefügt (siRNA-Endkonzentration 4 nM). Die

Target-Sequenzen der siRNAs gegen LASP1 waren 5'-AAGGTGAACTGTCTGGATAAG-3' und 5'-AAGCATGCTTCCATTGCGAGA-3'. Acht Minuten wurde der Ansatz bei RT inkubiert, dabei mehrmals durch Anschnipsen gemischt, um eine Komplexierung der siRNA mit dem Transfektionsreagenz zu erreichen. Danach wurde der Transfektionsansatz den sich noch in Suspension befindenden Zellen zugesetzt.

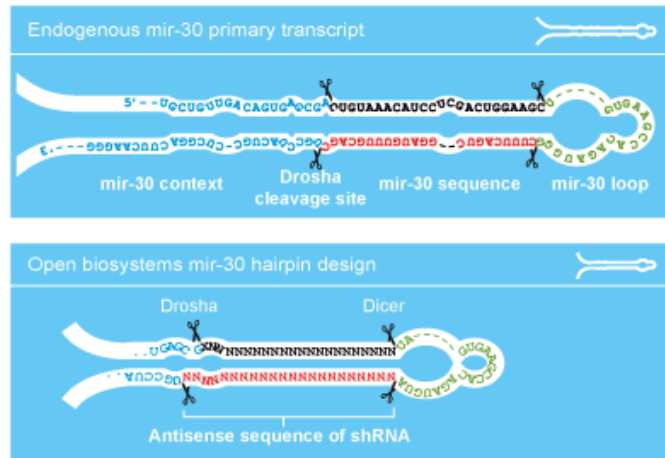
### **2.2.7. Lentivirale Transduktion**

Die lentivirale Transduktion ermöglicht einen stabilen Protein-Knockdown:

Will man einen Protein-Knockdown erreichen, in diesem Fall für LASP1, so gelingt das mittels siRNA nur transient. Sobald diese aufgebraucht bzw. abgebaut ist, geht der Effekt der siRNA verloren. Ein stabiler Knockdown kann erreicht werden, indem interferierende RNA von der Zelle selbst gebildet wird, entsprechend der endogenen microRNA.

Hierzu wurde ein small hairpin RNA-Konstrukt (shRNA) gerichtet gegen die 5' untranslatierte Region von LASP1 (shLASP1, Sequenz 5'-GGCAAGTGGAATATCTTATAT-3') und ein Kontroll-shRNA-Konstrukt (non silencing = nonsi bzw. shControl) in das Genom mittels lentiviraler Transduktion in die TCC-Zelllinien eingebracht.

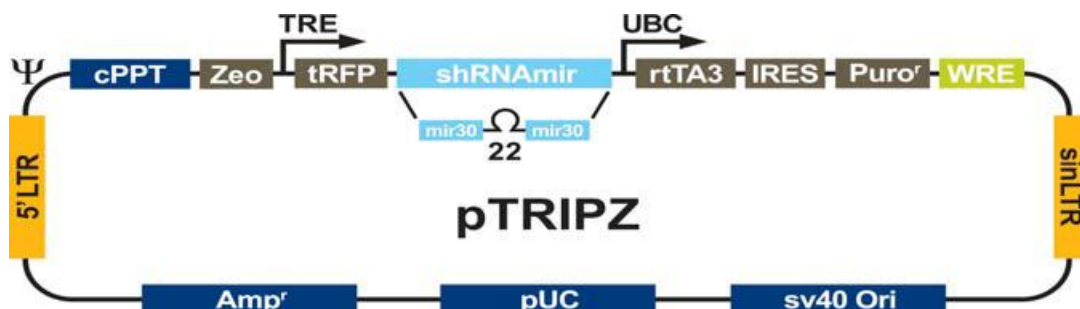
shRNA wird in der gleichen Art wie microRNA als eine Haarnadelstruktur transkribiert und prozessiert (Abb. 5), sodass ein Strang der Haarnadelstruktur im RISC zur komplementären Bindung von mRNA und dessen Degradierung führt.



**Abb. 5: Aufbau der endogenen microRNA-30 (oben) im Vergleich zum Aufbau der Haarnadelstruktur mit shRNA (unten).** Abbildung aus Handbuch des Herstellers.

Die shRNA wurde innerhalb eines pTRIPZ lentiviralen Vektors (Abb. 6) in die Zelle eingebracht.

Der hierbei eingebrachte Vektor hat mehrere besondere Eigenschaften:



**Abb. 6: Aufbau des Vectors, der bei der lentiviralen Transduktion in die Zielzellen eingebracht wird.** LTR: *Long terminal repeats*; TRE: Tetracyclin responsables Element zur Aktivierung der Expression; tRFP: turboRFP als Marker der Expression; Puro<sup>r</sup>: Puromycin-Resistenzkassette zur Selektion. Aus dem Handbuch des Herstellers.

Das zu integrierende Element ist von zwei *Long terminal repeats* umgeben. Solche Wiederholungssequenzen finden sich im humanen Genom üblicherweise in nicht kodierenden Bereichen. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass das Konstrukt innerhalb eines kodierenden DNA-Bereiches integriert wird.

Die Puromycin-Resistenzkassette, welche durch einen dauerhaft aktiven Promoter ständig abgelesen wird, erlaubt die transduzierten Zellen durch Zugabe von Puromycin zum Medium zu selektionieren.

Über ein Tetracyclin responsables Element ist das shRNA Konstrukt induzierbar. Der Knockdown kann also durch Zugabe von Doxycyclin (Dox) jederzeit aktiviert werden.

Ebenso ist als Reporter der shRNA-Expression turboRFP, ein Fluoreszenzfarbstoff, direkt vor der shRNA eingebracht.

Die lentivirale Transduktion nutzt zwei für Lentiviren typische Virus-Enzyme: Die Reverse Transkriptase und die Integrase. Die Reverse Transkriptase wandelt die genetische Information des Virus in der Zelle in DNA, die Integrase integriert diese DNA stabil ins Genom.

Für die Lentivirale Transduktion wurde der pTRIPZ Vektor in HEK293T Zellen mit einem Packaging-Kit eingebracht. Die Zellen bildeten aus dem Vektor und den Bestandteilen des Kits Lentiviren, mit denen dann die Zielzellen infiziert werden konnten.

#### **2.2.7.1. Virusproduktion**

Für jedes gewünschte Viruskonstrukt wurden  $4 \times 10^6$  HEK293T Zellen auf 10 cm Kulturplatte ausgesät, die mit Poly-L-Lysin (0,01 % Poly-L-Lysin in PBS) für 20 min beschichtet, danach 1x mit PBS gewaschen und getrocknet wurden.

Am Folgetag wurden 9 µg pTRIPZ-Vektor zusammen mit 28,5 µg Packaging Mix auf 1 ml mit Basismedium aufgefüllt und gemischt, ebenso 187,5 µg Arrest-In (Stock 1 µg/µl) mit 812,5 µl Basismedium auf 1 ml aufgefüllt und gemischt. Beides wurde in einem Reagiergefäß zusammengefügt und eine Minute mittels Luftstrom gemischt. Nach 20 min Inkubationszeit wurden 3 ml Basismedium zu den 2 ml Vektor-Packaging-Mix-Arrest-In-Gemisch pipettiert. Mit diesen 5 ml wurde das gesamte Medium auf den HEK293T Zellen ersetzt.

Nach etwa 5 h wurde der Vektor-Packaging-Mix-Arrest-In-Mix abgenommen und durch 12 ml Medium ersetzt.

Nach zwei Tagen wurde das Medium mit den enthaltenen Viren abgenommen und durch einen 0,45 µg Proteinfiter luftblasenfrei in ein Zentrifugenröhrchen überführt, darin bei 4°C gelagert. 12 ml frisches Medium wurde auf die HEK293T Zellen pipettiert.

Am Folgetag wurde nochmals der Virus-Überstand abgenommen und erneut durch einen 0,45 µg Proteinfiter in dasselbe Röhrchen wie am Vortag überführt. Danach wurden die Viren im Medium bei 150.000 g und 4°C für 2 h abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das nicht sichtbare Virus pellet mit 240 µl PBS überschichtet. Das Virus wurde über Nacht bei 4°C in PBS belassen, um sich besser in Suspension zu begeben.

#### **2.2.7.2. Bestimmung der lowest lethal dosis (LLD) für Puromycin**

Wildtypische Zellen wurden geerntet, gezählt, und aus einem Ansatz in 16 Wells einer 24-Wellplatte je  $8 \times 10^5$  Zellen in 1 ml ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurde am nächsten Tag das Medium gewechselt, bei je zwei Wells zu Medium mit 0 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml und 8 µg/ml Puromycin.

Nach zwei Tagen wurde das Medium zu frischem Medium mit Antibiotikum der ursprünglichen Konzentration gewechselt. Nach vier Tagen wurde mikroskopisch bestimmt, ab welcher Konzentration keine Zellen mehr vital waren, welche Konzentration also die niedrigste tödliche Dosis darstellt.

Die LLD ist die optimale Konzentration zur Selektion von Zellen mit Puromycin-Resistenzkassette, da zum einen die Selektion gewährleistet, zum anderen ein übermäßiger Zellstress verhindert wird.

#### **2.2.7.3. Lentivirale Transduktion und Selektion**

Üblicherweise wird die Konzentration der Viren aus dem HEK293T-Zellüberstand bestimmt, um die gewünschte Multiplizität der Infektion (Englisch *multiplicity of infection*, MOI), also das Verhältnis von Viren zu Zielzellen festlegen zu können. Auf Grund empirisch annähernd gleich effektiver Virusproduktion mit verschiedenen Konstrukten, wurde hier auf diesen Schritt verzichtet. Die Verwendung von der Hälfte der gesamten Virusmenge für  $5 \times 10^4$

Zellen sollte einem MOI von knapp unter 1 entsprechen, also weniger als ein Virus pro Zelle. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass viele Zellen infiziert werden, aber unwahrscheinlich, dass in viele Zellen multipel das Konstrukt eingebracht wird. Letzteres birgt die Gefahr, dass es zu ungewünschten Effekten auf das Zellverhalten wie Off-target-Effekte kommt.

Die zu transduzierenden Zellen wurden am Vortag der Transduktion ausgesät, ein Well einer 24-Wellplatte pro Viruskonstrukt und ein weiteres als Kontrolle, je  $5 \times 10^4$  Zellen.

Für die Transduktion wurde das Medium durch 130  $\mu$ l Basismedium mit 10  $\mu$ g/ml Polybrene als Transfektionsreagenz ersetzt, das Virus in PBS mehrmals resuspendiert, dabei der wahrscheinliche Ort des Pellets mehrmals überspült, und 120  $\mu$ l PBS-Virussuspension einem Well mit Zellen und Medium mit Polybrene zugefügt.

Als Kontrolle wurde ein Well mit 250  $\mu$ l Basismedium mit 10  $\mu$ g/ml Polybrene versetzt.

Nach 7 h wurde jedes Well mit 2 ml Medium aufgefüllt und so die toxische Wirkung des Polybrenes verdünnt.

Zwei Tage später wurde das Medium durch Medium mit der LLD von Puromycin (Selektionsmedium) ersetzt.

LLD von Puromycin:

T24: 1  $\mu$ g/ml

RT4: 1  $\mu$ g/ml

Das Selektionsmedium wurde so lange beibehalten, bis keine einzige Zelle der Kontrolle mehr vital war.

### **2.2.8. Fluorescence-activated Cell Sorting**

Nach Selektion der Zellen liegt eine heterogene Zellpopulation vor. Die Knockdown-Effizienz ist nicht bei allen Zellen dieselbe. Für die funktionelle Evaluierung des Targets des Knockdowns ist es optimal, Zellen mit einem maximalen Knockdown bis hin zum Knockout zur Verfügung zu haben. Um eine Dosisabhängigkeit des Effekts von einem solchen zu unterscheiden, für den die

Überschreitung eines Schwellenwertes nötig ist, lohnt sich eine zweite Zellpopulation mit geringerer Knockdown-Effizienz.

Üblicherweise werden hierzu Zellen derart verdünnt ausgesät, dass Klone aus nur einer Zelle entstehen und selektiv gezüchtet werden können. Unter diesen Klonen werden abhängig von der jeweiligen Knockdown-Effizienz die Zellen für weitere Analysen ausgewählt. Diese Methode birgt aber einige Nachteile: Neben dem hohen Zeitaufwand ist vor allem anzumerken, dass einige Zellen ohne parakrine Signale überhaupt nicht wachsen, die Methode also nicht auf solche Zellen angewandt werden kann. Ebenso ist zu bedenken, dass die Zellen durch Transduktion und Selektion Stress ausgesetzt waren und sich dementsprechend Zellen teilweise verändern. Die Verwendung einer Population aus Klonen einer solchen veränderten Zelle bedeutet ein wahrscheinliches Abweichen der Population vom Verhalten wildtypischer Zellen und ist entsprechend ungeeignet, wenn ausschließlich der Effekt eines Protein-Knockdowns beurteilt werden soll.

Daher wurde hier als Alternative das Fluoreszenz basierte Zellsortieren (Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS) verwendet: Da simultan mit dem Ablesen der shRNA turboRFP abgelesen wird, können solche mit viel und wenig shRNA Expression und damit korrelierendem Protein Knockdown anhand ihrer Fluoreszenz unterschieden werden. Gleichzeitig werden Zellen ohne Fluoreszenz, also nicht erfolgreich selektionierte Zellen, verworfen. Daraus resultieren heterogene Populationen mit verschiedenen Knockdown-Effizienzen.

Zur Aktivierung der Fluoreszenz wurde dem Medium der Zellen 0,5 µg/ml Doxycyclin für mindestens drei Tage zugefügt.

Danach wurden die Zellen geerntet, in PBS resuspendiert, und entsprechend der gemessenen Fluoreszenz gesortet, in die Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität ("high" gesortet) und niedrigerer Fluoreszenzintensität ("low" gesortet). Hierbei wurde das Gate des Zellsorters so gesetzt, dass die 20 % der fluoreszierenden Zellen mit der höchsten Fluoreszenz von den übrigen 80 % der fluoreszierenden Zellen getrennt wurden. Dieses Verfahren

wurde einheitlich sowohl auf shLASP1-transduzierte Zellen als auch shControl-transduzierte Zellen angewandt.

### **2.2.9. Adhäsionsassay**

Der Begriff Adhäsion beschreibt zwei Aspekte eines Zellverhaltens: Die Geschwindigkeit und die Stärke, mit der Zellen an einer Oberfläche anhaften. Außerdem muss eine Zell-Matrix bzw. Zell-Oberflächen Adhäsion von einer Zell-Zell-Adhäsion unterschieden werden.

Nur durch die Adhäsion, etwa an Gefäßwänden, ist eine Invasion einer Tumorzelle und damit Metastasenbildung möglich. Daher ist die Adhäsion ein Zeichen der Tumorzellaggressivität.

Im Rahmen von Adhäsionsassays zur Analyse des Effekts eines LASP1-Knockdowns wurde vor allem der Aspekt der Geschwindigkeit betrachtet, indem Zellen für eine bestimmte Zeit nach Aussäen inkubiert wurden, alle nicht adhärenen Zellen abgewaschen wurden und die verbliebenen Zellen detektiert wurden. Durch den Waschschrift fällt auch die Adhäsionsstärke bei diesem Assay ins Gewicht.

Dies ist ein einfaches und unkompliziertes Verfahren zur Evaluierung der Adhäsion. Allerdings gibt es viele Variablen in diesem Assay: Die verwendete Zellzahl, die verwendete Multiwellplattengröße, Plattenart (Herstellerpräparation für verbesserte Adhärenz), Beschichtung, Zeitpunkt der Auswertung, Fixierung, Färbung und Detektion der Zellen.

Da die Adhäsion innerhalb weniger Stunden abläuft, wurden die shLASP1-transduzierten Zellen, ebenso wie wildtypischen und shControl-transduzierten Kontrollen bereits drei Tage vor dem Assay in jeweils zwei Kulturgefäße zu gleichem Anteil gesplittet, jeweils eines mit 0,5 µg/ml Doxycyclin versetzt.

#### ***2.2.9.1. Beschichtung der Platten und Aussäen der Zellen für Adhäsion mit späterer Fixierung und Färbung der Zellen***

Die Kulturplatten wurden für 1:30 h mit Fibronectin (10 µg/ml PBS) beschichtet, 30 min mit BSA (1 % in PBS) geblockt und einmalig mit PBS gewaschen.



Eine Alternative ist die Fibrinogen-Beschichtung: Dafür wurden 150 µl Fibrinogen-Beschichtungslösung (1 % Fibrinogen, 0,1 % BSA in PBS) pro Well über Nacht bei 4°C auf den Platten belassen. Erst vor dem Aussäen der Zellen wurde die Beschichtungslösung abgesaugt und wurden die Wells mit PBS gewaschen.

Sofern nicht anders angegeben, wurden pro Well  $4 \times 10^4$  Zellen in 200 µl Medium verwendet. Für jede Zellpopulation wurde eine eigene Reihe in einer Multiwellplatte verwendet, abgesehen von den letzten beiden Wells als Leerwert.

### **2.2.9.2. Fixierung und Färbung der Zellen**

Bei 50 % Adhäsion der Kontrollzellen wurde das Medium abgesaugt und die Wachstumsfläche zwei Mal mit 200 µl PBS vorsichtig gewaschen, um nicht adhärenente Zellen zu beseitigen.

Die verbliebenen adhärenente Zellen wurden nun entweder mittels 150 µl Paraformaldehyd (PFA; 4 % in PBS) 10 min auf Eis fixiert, bevor das PFA abgesaugt und Reste durch zweimaliges Waschen mit PBS beseitigt wurden. Oder die Zellen wurden mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) 60 min bei 4°C fixiert, welches danach abgeschüttet und unter langsam fließendem Wasser aus den Wells gewaschen wurde. Die Färbung erfolgte dann erst am Folgetag nach Lufttrocknen der Platte.

Bei Färbung mit Kristallviolett (1 % in 2 % Ethanol) wurden die Zellen für 3 min mit Kristallviolett überschichtet, danach die überschüssige Farbe durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

Bei Färbung mit Sulforhodamin B (SRB) 0,4 % in 1 %iger Essigsäure) wurden die Zellen für 30 min gefärbt, die überschüssige Farbe wurde durch dreimaliges Waschen mit 1 %iger Essigsäure entfernt. Danach wurde die Wachstumsfläche an der Luft getrocknet.

### **2.2.9.3. Absorptionsmessung**

Um ohne Zählung der fixierten und gefärbten Zellen Rückschluss auf deren Zahl ziehen zu können, wurde die Farbe wieder aus den Zellen eluiert und die optische Dichte des Eluats bestimmt.

Kristallviolett wurde durch 10 %ige Essigsäure eluiert und die optische Dichte bei 595 nm bestimmt.

Sulforhodamin wurde durch 10 mM TRIS (ungepuffert) eluiert und die optische Dichte bei 510 nm bestimmt.

### **2.2.9.4. Adhäsionsassay mit CellTiter-Glo**

CellTiter-Glo lysiert Zellen und nutzt deren ATP, um ein Lumineszenzsignal zu erzeugen. Dadurch ergeben sich mehrere Limitierungen: Abhängig von der Zeit bis zur Auswertung oder den Einfrier-Auftau-Zyklen des Reagenzes bedeutet ein Signalwert verschiedene Zellzahlen. Daher kann immer nur innerhalb eines Assays verglichen werden, um welchen Prozentsatz das Signal höher oder niedriger zwischen den verschieden behandelten Zellen und ihren Referenzwerten ist.

Da die Zellen nicht gefärbt und entfärbt werden, entfällt die Fixierung. Entsprechend ist es auch möglich, nicht adhärente Zellen in nicht-gewaschenen Wells zu detektieren, somit das Signal von nicht-gewaschenen Wells als Maximalwert der Lumineszenz und somit als Referenz für die gewaschenen Wells zu verwenden. Dieses Vorgehen umgeht die bereits genannte und eine weitere Limitation: Da der Assay ATP-abhängig ist, ist nur das Vergleichen von Zellen mit gleichen ATP-Gehalt valide. Dies ist hier sicher gegeben, da der einzige Unterschied zwischen den Wells darin besteht, ob sie gewaschen wurden oder nicht.

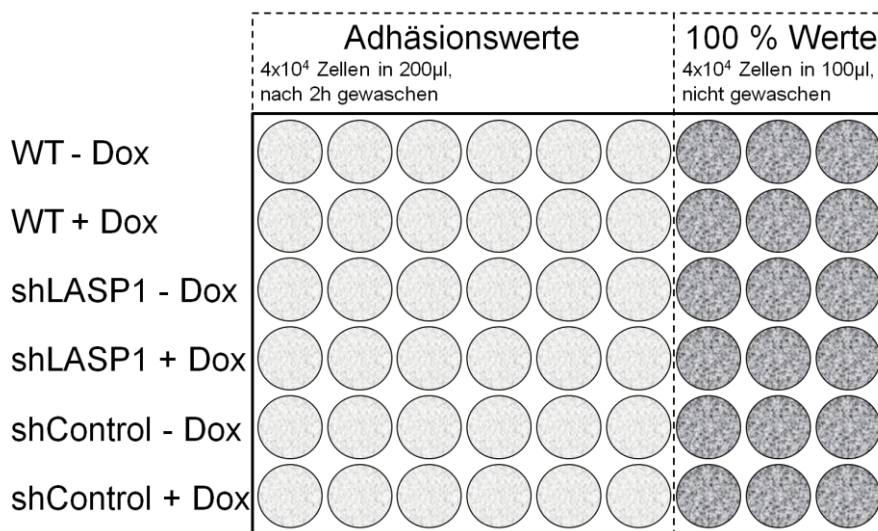
Alle shLASP1-transduzierten Zellen und Kontrollen, mit und ohne Doxycyclin-Behandlung, wurden geerntet und gezählt.  $4 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l Medium pro Well wurden in jeweils einer eigenen Reihe pro Zellpopulation einer mit Fibronectin beschichteten 48-Wellplatte verwendet. Den ersten fünf Wells jeder Reihe wurden weitere 100  $\mu$ l Medium zugefügt (Abb. 7).

Als Kontrolle für den Knockdown von LASP1 wurde ein Anteil der geernteten Zellen jeweils in SDS-Stopp aufgenommen.

Nachdem ca. 50 % der wildtypischen Zellen adhären waren, hier sowohl bei T24 als auch RT4 ca. 2 h, wurden die ersten fünf Wells jeder Reihe zwei Mal vorsichtig mit 200 µl PBS gewaschen.

Danach wurde diesen Wells wieder 100 µl Medium zugefügt, sodass nun in jeder Reihe 100 µl Volumen Medium vorlagen, wobei die ersten fünf Wells nur noch adhären Zellen, während die letzten drei jeder Reihe noch alle ausgesäten Zellen enthielten. 100 µl CellTiter-Glo wurde daraufhin jedem Well zugefügt. Die Platte wurde 2 min geschüttelt, danach 10 min bei RT inkubiert, ehe die Proben von den Wells der 48-Wellplatte in eine weiße 96-Wellplatte überführt wurde, die ein Kreuzsignal von einem Well in ein anderes verhindert. Die Auswertung erfolgte in einem geeigneten Plattenlesegerät.

Aus dem Mittelwert der Werte der letzten drei Wells ergab sich das Signal für 100 % der Zellen, der Mittelwert der ersten fünf Wells ergibt das Signal für die adhären Zellen. In Relation zueinander gesetzt ergibt dies den Prozentsatz aller adhären Zellen.



**Abb. 7: Schema einer 48-Wellplatte für den Adhäsionsassay.** In den Zeilen befinden sich die verschieden behandelten Zellen, wildtypische und transduzierte, solche, die mit Doxycyclin (+Dox) vorbehandelt wurden oder nicht (-Dox). In den ersten fünf Wells wird ein Signal der adhären Zellen gemessen, nachdem diese 2h adhären und die nicht adhären mittels Waschen entfernt wurden. In den letzten drei Wells wird das Signal aller ausgesäten Zellen bestimmt.

### **2.2.10. Proliferationsassay**

Die Proliferationsrate von Tumorzellen ist ein Aspekt ihres Verhaltens, der auf die Aggressivität des Tumors schließen lässt.

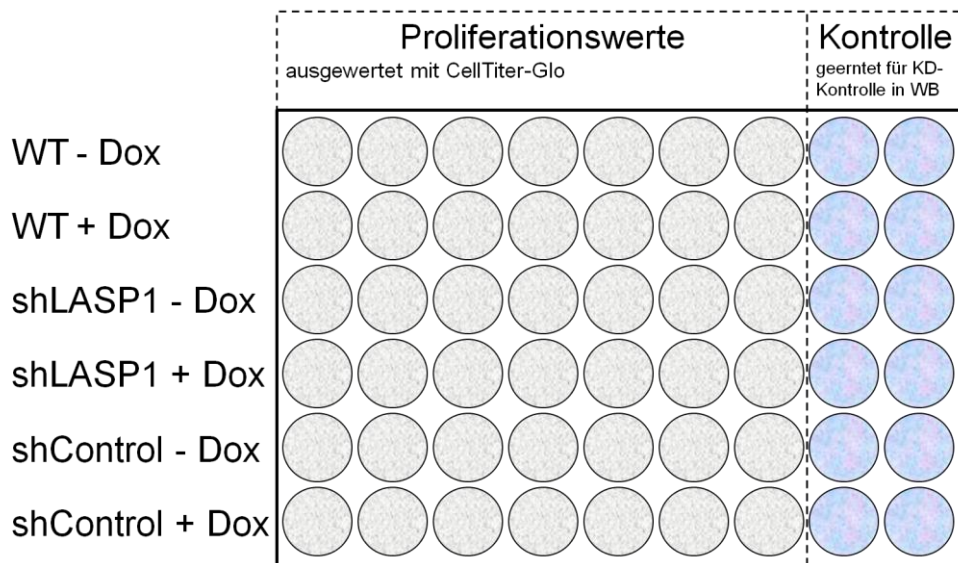
Um die Proliferationsrate von Zellen zu bestimmen, ist es möglich, sie in ein Kulturgefäß abgezählt auszusäen, nach einer bestimmten Zeit alle Zellen zu ernten und erneut zu zählen. Dieses Vorgehen ist allerdings sehr aufwendig und erschwert dadurch das parallele Auswerten mehrerer Proben. Schwankungen bei der ersten und zweiten Zählung machen die Quantifizierung eines Effekts ungenau, weshalb viele biologische Replikate nötig sind.

Daher wurde hier eine Methode gewählt, welche die parallele Auswertung mehrerer technischer Replikate problemlos zulässt, indem anstatt der Zellzahl ein ihr proportionales Signal generiert und detektiert wird.

Zur Generierung eines Signals wurde hier wieder CellTiter-Glo verwendet. Hierbei sind erneut die Limitationen dieses Vorgehens zu beachten. Zum einen kann von dem Signal nicht auf die exakte Zellzahl geschlossen werden. Zum anderen muss der ATP-Gehalt der verglichenen Zellen gleich sein. Daher kann immer nur die gleiche Zelllinie untereinander verglichen werden, und dies auch nur, wenn die verschiedenen getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf den ATP-Gehalt der Zellen haben.

In den Proliferationsassays sollte der Effekt eines LASP1-Knockdowns auf die Proliferation untersucht werden. Daher wurden mit LASP1-shRNA-Konstrukt transduzierte Zellen mit und ohne Doxycyclin, also mit und ohne Expression der shRNA, und als Kontrolle ebenso wildtypische und mit shControl transduzierte Zellen verwendet.

Für den Proliferationsassay wurden für jede wildtypische und verschieden transduzierte Zelllinie 4.000 (RT4) und 5.000 (T24) Zellen pro Well verwendet. Dieser wurde auf 16 Wells einer 48-Wellplatte ausgesät. Sobald die Zellen adhärent waren, wurde das Medium in den jeweils ersten acht Wells zu frischem Medium ohne Doxycyclin gewechselt, bei den jeweils zweiten acht Wells zu frischem Medium mit 0,5 µg/ml Doxycyclin zur Aktivierung der shRNA-Expression (Abb. 8).



**Abb. 8: Schema einer 48-Wellplatte für den Proliferationsassay.** In den Zeilen befinden sich die verschieden behandelten Zellen, wildtypische und transduzierte, solche, die mit Doxycyclin (+Dox) behandelt wurden oder nicht (-Dox). Die letzten beiden Wells einer Zeile wurden für einen Western Blot zur Kontrolle des Knockdowns geerntet.

Nach vier bis fünf Tagen, wenn die Zellen noch nicht konfluent gewachsen waren, sodass keine Wachstumshemmung zu befürchten war, welche die Messung verfälscht hätte, aber die Zellen genügend lang mit gleichzeitiger Expression der shRNA gewachsen waren, sodass ein Effekt dieser sichtbar werden sollte, wurde der Assay ausgewertet.

Jedes Well wurde mit PBS gewaschen, danach wurden den jeweils ersten sechs Wells einer Reihe 100 µl Medium und 100 µl CellTiter-Glo-Reagenz zugegeben und die Platte für eine verbesserte Zellyse zwei Minuten geschüttelt.

Nach zehnmütiger Inkubation wurde die Lösung in eine weiße 96-Wellplatte überführt. In einem entsprechenden Plattelesegerät wurde das Lumineszenzsignal bestimmt.

Es wurden jeweils für wildtypische, shLASP1- und shControl-transduzierte Zellen das Signal der Doxycyclin-behandelten mit dem der unbehandelten Zellen verglichen.

Die jeweils letzten beiden Wells wurden in SDS-Stopp für einen Western Blot geerntet, um den Effekt der Zugabe von Doxycyclin auf Proteinebene zu bestimmen.

### **2.2.11. Klonogenitätsassay**

Der Klonogenitätsassay, auch Colony-Forming-Assay (CFA) genannt, kann als Erweiterung des Proliferationsassays angesehen werden. Der CFA zeigt nämlich neben der Proliferation, ob eine einzelne Zelle fähig ist, eine Kolonie zu bilden. Diese Klonogenität ist Voraussetzung, dass eine einzelne Zelle eine Metastase bilden kann, also ein weiteres Kriterium der Tumoraggressivität.

Hierzu werden Zellen in einer solchen Konzentration ausgesät, dass sie vereinzelt auf der Kulturplatte adhären und Klone einzelner Zellen später nach Färbung makroskopisch sichtbar werden.

Je 1.000 und 2.000 Zellen der shLASP1- und shControl-transduzierten Zellen wurden in jeweils zwei Spalten einer 12-Wellplatte im Triplet ausgesät. Zur Knockdown-Kontrolle mittels Western Blot wurden 10.000 Zellen vierfach in einer 12-Wellplatte ausgesät. Jeweils in einer Spalte einer Zellzahl wurde Medium mit 0,5 µg/ml Doxycyclin verwendet anstatt normalem Medium, ebenso für die Hälfte der Wells für Knockdown-Kontrolle.

Mediumwechsel wurden nicht vorgenommen, um ein Abschwemmen der Kolonien zu verhindern. Nach 5-6 Tagen erfolgte die Auswertung, als sich deutlich sichtbare, aber nicht konfluierende Populationen gebildet hatten. Dabei wurden die Zellen mit -20°C kaltem Methanol fixiert, mit 300 µl 2,3 % Kristallviolett für 10 min gefärbt, und überschüssige Farbe dreimalig mit Wasser entfernt.

Die Kolonien in den Platten wurden mit einem Flachbettscanner abgebildet.

### **2.2.12. Migrationsassay**

Die Migrationsfähigkeit von Zellen durch die Basalmembran, Blut- und/oder Lymphgefäßwand und die spätere Extravasation ist Vorbedingung der Metastasierung. Daher ist die Bestimmung des Migrationsverhaltens von

Tumorzellen eine weitere Möglichkeit, die Aggressivität dieser Zellen zu bewerten.

Hierzu sollen die Zellen durch eine Membran migrieren, an der sie nach dem Durchwandern anhaften. Die Zellen werden dann angefärbt und der Farbstoff herausgelöst. Aus den verschiedenen Absorptionswerten bei verschiedenen Zellpopulationen kann auf deren Migrationsfähigkeit relativ zueinander geschlossen werden.

Da die Migration auch ein Prozess weniger Stunden ist, wurden zur Evaluation eines Effektes von LASP1-Knockdown auf die Migration die shLASP1-transduzierten Zellen und Kontrollen drei Tage vor dem Versuch auf Kulturgefäße mit und ohne 0,5 µg/ml Doxycyclin gesplittet. Am Vorabend wurde das Medium durch Basismedium ersetzt, um durch das Hungern der Zellen diese in einen einheitlichen Status zu bringen und den Migrationsreiz zu Medium mit FCS zu steigern.

Filter-Einsätze mit 8 µm Porengröße wurden auf der Unterseite mit 1 mg/ml Kollagen als dicken Tropfen für 15 min bei RT beschichtet. Das Kollagen dient dazu, dass die Zellen nach dem Durchwandern an der Membran anhaften und noch nachgewiesen werden können, statt in das Medium zu gehen. Danach wurde der Tropfen abgeschüttelt, der Filtereinsatz in ein Well einer 48-Wellplatte mit 500 µl vorgelegtem Medium für Migration mit FCS eingehängt. Das Medium dient dabei als Chemoattraktor.

In den Filtereinsatz wurden oben 100 µl Medium für Migration ohne FCS pipettiert.

Medium für Migrationsassay: (10 % FCS +) 1 mM MgCl<sub>2</sub> (50 µl aus 1 M Stock pro 50 ml) + 0,5 % BSA + Basismedium

Die Platte wurde so für 45 min bei RT belassen, sodass BSA das Plastik blocken konnte. Danach wurde das Medium im Filtereinsatz durch 100 µl Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen in Medium für Migration ohne FCS ersetzt. Nach 4 h wurden mit einem Wattestäbchen aus dem Inneren des Filtereinsatzes alle nicht migrierten Zellen mechanisch entfernt, die

Filtereinsätze in 250 µl Kristallviolett für 1 min eingehängt und die Zellen so gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde vier Mal mit Wasser abgewaschen.

Kristallviolett: 1 % Kristallviolett in 2 % Ethanol, 2 h rühren, 0,45 µm filtriert

Die Farbe der Zellen wurde mit 250 µl 10 %iger Essigsäure 20 min auf einem Schüttler extrahiert. 200 µl der Lösung wurden in eine 96-Wellplatte überführt und im ELISA-Reader wurde bei 595 nm deren Absorption bestimmt.

### **2.2.13. Urothelisation**

Zum Vergleich der LASP1-Expression in normalem Urothel mit der Expression in den verwendeten TCC-Zelllinien wurde eine Urothel-Primärkultur angesetzt aus Ureteren, freundlicherweise zur Verfügung gestellt aus OP-Präparaten nach vorheriger Genehmigung durch die Patienten von Herrn Dr. Peter Ardel, Urologische Klinik Basel.

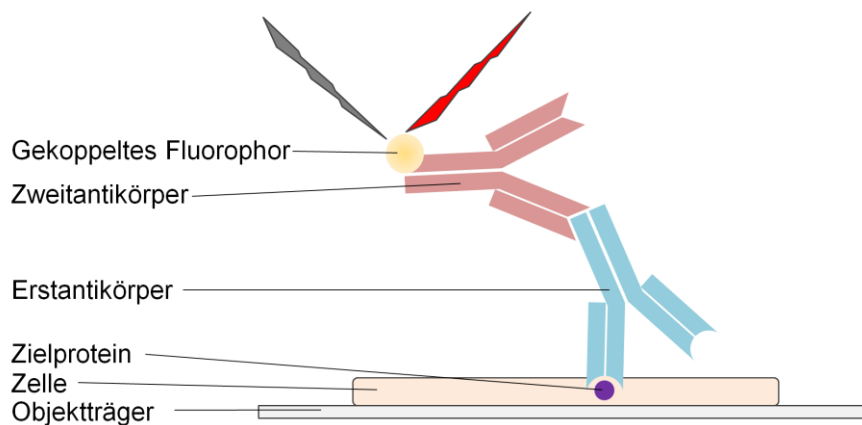
Die Ureteren wurden hierzu direkt nach Ankunft unter sterilen Bedingung in PBS von Bindegewebe befreit und der Länge nach aufgeschnitten. In einer frischen Schale mit PBS wurde das Urothel vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt, bis die oberste Schicht abgelöst war und die weißliche Lamina propria sichtbar wurde. Das PBS mit den Zellen wurde abzentrifugiert. Entsprechend der Größe des Pellets wurde das Kulturgefäß gewählt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet 1x mit Medium gewaschen, um das übrige Blut größtenteils zu entfernen, dann in 2 ml Keratinozyten-Serum-Freies Medium supplementiert mit 5 ng/ml EGF, 50 ng/ml BPE (boviner Hypophysenextrakt), 30 ng/ml Cholera Toxin und P/S resuspendiert.

Ein Splitten der Zellen war nach Wachstum in Kultur nicht mehr möglich, da die Zellen kaum noch wieder anwuchsen. Außerdem bestand eine ausgeprägte Zell-Zell-Bindung, weshalb auch eine Zählung nach Kultur der Zellen nicht mehr möglich war.



## 2.2.14. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient der spezifischen Darstellung von Proteinen und anderen Zielstrukturen. Hierzu werden Zellen oder Gewebe fixiert, ein spezifischer Antikörper an das Ziel gebunden, und dieser Antikörper nachgewiesen. Dies erfolgt üblicherweise durch einen Zweitantikörper, der einerseits an den Erstantikörper bindet, andererseits entweder an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist oder an ein Enzym wie die Meerrettichperoxidase, durch dessen Reaktion mit einem Substrat eine Färbung erreicht wird (Abb. 9).



**Abb. 9: Funktionsweise der Immunhistochemie.** Das Zielprotein in oder auf einer fixierten Zelle wird durch einen Erstantikörper spezifisch gebunden. Der Erstantikörper wird von einem Zweitantikörper gebunden, der ein Fluorophor oder Enzym trägt, welches die Detektion des Antikörpers ermöglicht.

Hier sollten T24 und RT4 Zellen auf LASP1 und Serin-146 phosphoryliertes LASP1 (pLASP1) angefärbt werden, um die intrazelluläre Lokalisation von LASP1 unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu testen.

Am Vortag der immunhistochemischen Färbung wurden  $7 \times 10^5$  Zellen in ein Well einer 6-Wellplatte ausgesät, auf dessen Boden ein Deckgläschen mit 24 mm Durchmesser gelegt wurde.

Verschiedene Bedingungen waren: Die Verwendung von Basismedium in einem Well, normalem Medium und normalem Medium mit  $5 \mu\text{M}$  Forskolin 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  direkt vor der Fixierung der Zellen.

Für die Färbung wurde das Medium abgesaugt, die Wachstumsfläche 1x mit 1 ml PBS gewaschen. Direkt auf die Deckgläschen wurden 100 µl PFA für 10 min zur Fixation gegeben. Dabei wurden die Platten mit den Deckgläschen auf Eis gestellt. Fünf Mal wurde das PFA mit je 1 ml PBS für 2 min abgewaschen. Durch 50 nM NH<sub>4</sub>Cl für 10 min wurden Formaldehydgruppen des PFA fixiert zur Reduktion einer daraus entstehenden Hintergrundfluoreszenz.

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1 % Triton in PBS für 10 min permeabilisiert, sodass die Antikörper auch intrazelluläre Strukturen binden können. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch 30 min Inkubation mit Ziegenserum in 0,1 % Triton geblockt. Als Erstantikörper wurde ein polyklonaler LASP1-Antikörper 1:2000 in Ziegenserum in 0,1 % Triton verwendet. Mit diesem wurden die Deckgläschen 2,5 h bei RT inkubiert. Die Platten wurden hierbei in einer feuchten Kammer verwahrt, um ein Austrocknen der Deckgläschen zu vermeiden.

Der ungebundene Erstantikörper wurde für 10 min mit PBS abgewaschen. Als Zweitantikörper diente anti-Rabbit Cy3 1:500 verdünnt und zur F-Aktin-Färbung Oregon Green 488 Phalloidin 1:30 verdünnt in 0,1 % Ziegenserum in Triton. Phalloidin bindet dabei an F-Aktin und ist direkt mit dem Fluorophor Oregon Green 488 gekoppelt, weshalb kein Zweitantikörper notwendig ist. Nach einstündiger Inkubation wurde dreimalig mit PBS, dann mit destilliertem Wasser gewaschen. Für jedes Deckgläschen wurde auf einem Objektträger zum Einbetten Mowiol mit 0,5 µg/ml DAPI zur Zellkernfärbung vorgelegt. Die Deckgläschen wurden nochmals mit Wasser gewaschen und mit der Oberseite nach unten auf das Mowiol gelegt und vorsichtig angedrückt. Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei +4°C.

Mowiol: Mowiol 4-88 (Hoechst), 50 % Glycerol, 0,2 M Tris pH 8,5, 2,5 %  
DABCO

Am nächsten Tag konnten mit einem Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen gemacht werden. Dabei erscheint LASP1 rot und F-Aktin grün, die Zellkernfärbung hingegen blau.

### **2.2.15. Kern-Cytosol-Trennung**

Um Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von LASP1 und pLASP1 in TCC-Zelllinien darstellen zu können, wurden die Proteine aus dem nukleären und cytosolischen Kompartiment mit Hilfe des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kits getrennt isoliert.

Für jede Probe wurden 200 µl (+5 % Sicherheit) Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I) und 100 µl (+5 % Sicherheit) Nuclear Extraction Reagent (NER) in je ein Reagiergefäß vorgelegt und auf Eis gestellt. Es wurde jeweils ein Protease/Phosphatase-Inhibitor-Mix aus Calycolin A (Inhibitor von Proteinphosphatase 1 und 2A), Leupeptin (Inhibitor von Cystein-, Serin- und Threonin-Peptidasen), Pepstatin (Aspartyl-Proteaseinhibitor) und Pefablock (Inhibitor von Proteinase K) zugesetzt, um einen Abbau der zu isolierenden Proteine aus dem cytosolischen und nukleären Kompartiment zu verhindern. Alle Schritte fanden auf Eis statt.

Die Zellen wurden geerntet ohne Abstoppen der Trypsin-Reaktion mit Medium. Dies sollte verhindern, dass die verschiedenen stimulierten Zellen (Zellen auf Hungermedium oder mit FCS, jeweils mit und ohne Forskolin), nicht wieder in einen gleich stimulierten Status kommen. Hierzu wurde besonders wenig Trypsin verwendet und dies stark in PBS verdünnt. Das Zellpellet wurde trocken gesaugt.

Zur Abtrennung des cytosolischen Kompartiments wurde auf Eis jedes Pellet zuerst in 100 µl CER I mit Zusätzen resuspendiert, ehe die übrigen 100 µl zugegeben wurden. Die Probe wurde mit einer Insulinspritze homogenisiert, dann nochmals kurz gevortext und 10 min aus Eis stehen lassen. 11 µl CER II wurden zugefügt, durch Vortexen gemischt, und die Probe wurde wieder für 1 min inkubiert. Durch Zugabe und Einwirken dieser beiden Reagenzien auf die homogenisierte Zellmasse soll ein Aufbrechen der Zellmembran mit Erhalt der Zellkerne erreicht werden. Die nicht-cytosolischen Bestandteile wurden bei

16.000 g, 4°C 5 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den cytosolischen Bestandteilen wurde vorsichtig abgehoben.

Zur Isolation des Kern-Kompartiments wurde das Pellet dreimalig mit kaltem PBS gewaschen, um möglichst jede Kontamination mit cytosolischen Bestandteilen zu vermeiden. Danach wurde das Pellet in 100 µl NER mit Zusätzen mit der Pipettenspitze zerdrückt und kräftig gevortext. Dies wurde vier Mal im Abstand von 10 min wiederholt. Durch NER und die mechanische Einwirkung wird der Zellkern perforiert. Bei 16.000 g, 4°C 10 min wurde der übrige Debris abzentrifugiert. Der Überstand, jetzt das Kernkompartiment enthaltend, wurde abgenommen.

Für Western Blot wurde das nukleäre Fragment mit 200 µl SDS-Stopp, das cytosolische mit 400 µl SDS-Stopp gemischt und 5 min bei 95°C abgekocht.

### **2.2.16. Western Blot**

Die wichtigste Frage bei allen durchgeführten Funktionsassays und schon bei der Generierung der lentiviral transduzierten Zellen war der erfolgreiche Knockdown von LASP1 auf Proteinebene. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Western Blots angefertigt.

Zur spezifischen Detektion von Proteinen und deren Quantifizierung (mit Hilfe eines Standards oder einer Referenz) eignet sich der Western Blot: Proteine werden nach ihrer Größe aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und dort spezifisch mit Antikörpern und Chemilumineszenz (bzw. je nach Zweitantikörper auch mit Fluoreszenz) nachgewiesen und quantifiziert.

#### **2.2.16.1. Ernten von Proben für Western Blot**

Um die Proteine aus Zellen in Kultur mittels Western Blot untersuchen zu können, wurden adhärente Zellen nach einmaligem Waschen der Wachstumsfläche mit PBS mit SDS-Stopp überschichtet (20 µl pro 1 cm<sup>2</sup>) und mit einem Zellschaber gelöst. Zellen in Suspension wurden entweder bei 16.000 g abzentrifugiert und in 200 µl SDS-Stopp pro 10<sup>6</sup> Zellen aufgenommen, oder die Zellsuspension wurde mit mindestens der gleichen Menge SDS-Stopp gemischt. Die Proben wurden dann für 5 min bei 95°C denaturiert.

SDS Stopp 3x:

- 2,42 g Tris/HCl (200 mM in 100 ml) in 70 ml H<sub>2</sub>O
- mit HCl auf pH 6,7 eingestellt
- + 6 % SDS (6 g)
- + 15 % Glycerin (15 ml entspricht 19 g)
- + Bromphenolblau (3 g)
- 10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol frisch zufügen

Bei der Denaturierung geht die Tertiär- und Sekundärstruktur des Proteins verloren. Das *Sodium dodecyl sulfat* (SDS) maskiert dabei die Eigenladung der Proteine, sodass alle Proteine die gleiche negative Ladung pro Längeneinheit tragen.  $\beta$ -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken, welche die Tertiärstruktur stabilisieren. Dadurch zeigen die Proteine in der Gelelektrophorese keine Unterschiede im Laufverhalten, die durch ihre Struktur oder unterschiedliche Ladung bedingt sind, sie werden lediglich nach ihrer Größe aufgetrennt.

Glycerin diente zum Beschweren der Probe, Bromphenolblau für die Sichtbarkeit der Probe im Gel.

#### **2.2.16.2. Denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli**

Für die Proteine, die hier von Interesse waren, eignete sich ein 10 %iges Polyacrylamidgel. Je nach Proteingröße müssen Gele verschiedener Konzentration verwendet werden. Gele mit höherem Anteil Acrylamid sind fester und bieten größeren Widerstand für große Proteine, weshalb diese kaum entsprechend der angelegten Spannung zur Anode wandern, also auch kaum aufgetrennt werden. Entsprechend sind solche Gele mehr für die Auftrennung kleinerer Proteine geeignet. Umgekehrt sind Gele mit geringem Acrylamidanteil sehr leicht durchgängig für kleine Proteine, sie wandern alle ohne großen Widerstand durch und eine Auftrennung ist nicht gut sichtbar, während größere Proteine verbessert aufgetrennt werden können.

Zuerst wurde das Trenngel und Sammelgel bis auf Tetramethylethyldiamin (TEMED) angesetzt, welches die Gelpolymerisation katalysiert zusammen mit

dem Polymerisationsinitiator Ammoniumpersulfat (APS). In eine abgedichtete Gelkammer wurde zuerst das mit TEMED versehene Trenngel gefüllt, bis gerade genug Platz für das Sammelgel blieb, und mit Isobutanol überschichtet. Letzteres sollte ein ungleichmäßiges Verziehen des Gels bei der Polymerisation verhindern. Nach 15 min wurde überprüft, ob das Sammelgel vollständig polymerisiert war, das bis-Acrylamid also zu einem Polyacrylamidgel (PAGE) polymerisiert war. Dann konnte das Isopropanol vom Gel gewaschen werden und der Sammelgelansatz mit TEMED versehen aufgetragen werden. Der Probenkamm wurde sofort in das Sammelgel eingesteckt.

	Sammelgel (ml)		Trenngel 10% (ml)	
	Für 4 Gele	Für 2 Gele	Für 4 Gele	Für 2 Gele
30 % Acryl+Bis-Acrylamid	2	0,7	13,3	6,6
0,5 M Puffer A pH 6,7	2,5	0,65	-	-
3 M Puffer B pH 8,9	-	-	5	2,5
SDS 10 %	0,2	0,05	0,4	0,2
Aqua dest.	15,1	3,6	21,15	10,5
TEMED	0,01	0,005	0,02	0,0125
APS 10 %	0,4	0,2	0,4	0,2
Gesamtvolumen (ca.)	20	5	40	20

Puffer A (0,5 M Tris, pH 6,7):

- 6,057 g Tris in 80 ml H<sub>2</sub>O lösen
- pH auf 6,7 einstellen mit 5 N HCl
- auf 100 ml auffüllen

Puffer B (3 M Tris, pH 8,9):

- 36,34 g Tris in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen
- pH auf 8,9 einstellen mit 5 N HCl
- auf 100 ml auffüllen

10 % SDS: 10 g SDS in 100 ml H<sub>2</sub>O

10 % APS: 1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml H<sub>2</sub>O

Nach weiteren fünfzehn Minuten wurde die Dichtung von der Gelkammer entfernt, das Gel in eine Elektrophoresevorrichtung eingespannt, sowohl am

oberen als auch am unteren Ende des Gels Elektrophoresepuffer eingefüllt (Abb. 10).

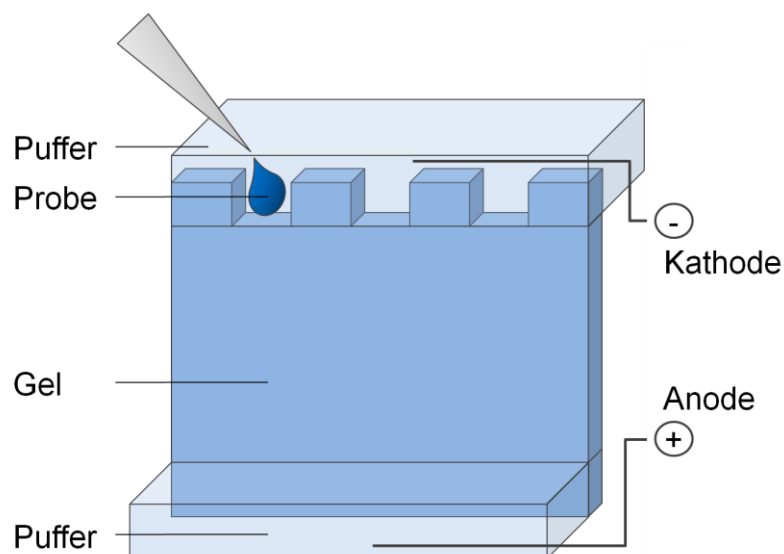
#### Elektrophorese Puffer 10x:

- 120 g Tris
- 576 g Glycine
- Auf pH 8,9 einstellen
- 40 g SDS zufügen
- Auf 4 l auffüllen
- Zum Gebrauch 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnen

Der Kamm wurde gezogen, Luftblasen wurden entfernt und die Proben in die durch den Kamm entstandenen Taschen mit einer Hamilton-Präzisionspritze gefüllt.

Nachdem die Proben bei konstanten 80 V sich im Sammelgel gesammelt hatten und dadurch die gesamten Proben gleichzeitig in das Trenngel übergetreten waren, wurde die Spannung auf 130 V erhöht.

Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die blaue Lauffront das Ende des Acrylamidgels erreicht hatte.



**Abb. 10: Aufbau einer SDS-Page-Gelelektrophoresekammer.**

### 2.2.16.3. Western Blot

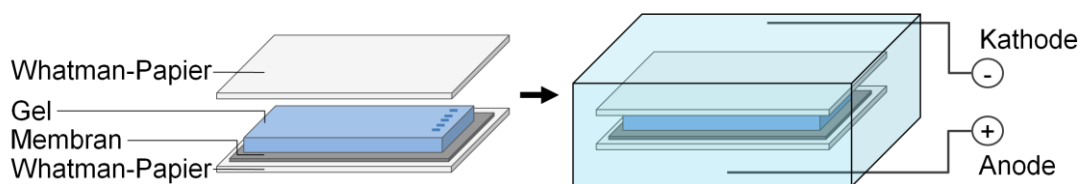
Um die Proteine auf einer Nitrocellulosemembran mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können, wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen (= Western Blot).

Dazu wurden die Gelkammern aufgehebelt, der Teil des Gels mit Protein ausgeschnitten und mit der Vorderseite nach unten auf ein in Transferpuffer liegendes Whatman-Papier aufgelegt. Darauf wurde luftblasenfrei die Whatman-Membran (Nitrocellulose) aufgelegt und ein weiteres Whatman-Papier. Die Lagen wurden in einem Rahmen zusammengepresst und der Rahmen in eine Transferkammer gefüllt mit Transferpuffer eingesteckt, sodass die Membran zur Anode gerichtet war (Abb. 11).

#### Transferpuffer

- 25 mM Tris (30 g), 192 mM Glycin (144 g) und NaOH (56 g) in 4 L VE-Wasser lösen
- Auf 5 L auffüllen
- 3 L VE-Wasser und 2 L Methanol zufügen

Eine Stunde bei konstanten 2 A wurden die Proteine übertragen. Um einer Überhitzung des Systems vorzubeugen, wurde der Transfer in einem Kühlraum durchgeführt.



**Abb. 11: Anordnung von Membran und Gel beim Western Blot.** Das Gel liegt auf der Nitrocellulosemembran auf. Beides liegt zwischen zwei Schichten Whatman-Papier in einer mit Puffer gefüllten Kammer. Beim Anschluss der Spannung muss die Reihenfolge Kathode, Gel, Membran, Anode eingehalten werden.



#### **2.2.16.4. Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran: Detektion mittels Ponceau S - Färbung**

Dieses Verfahren der Proteinfärbung wurde angewandt, um sowohl eine erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran als auch die Beladung des Gels mit gleichmäßiger Proteinmenge für jede Probe zu bewerten.

Hierzu wurde die Membran in eine Schale gelegt und diese mit wenig Ponceau S gefüllt. Nach 2 min wurde die Färbelösung wieder abgegossen und durch Schwenken in VE-Wasser die überschüssige Farbe von der Membran gewaschen, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Die Färbung beruht darauf, dass der rote Farbstoff an Aminogruppen von Proteinen bindet.

Ponceau S: 0,5 g Ponceau S in 100 ml 10 %iger Essigsäure

Zur Dokumentation wurde die Membran in einer Heftfolie eingelegt fotokopiert. Die Membran konnte in TBS-T entfärbt werden.

#### TBS-T

- 100 ml 10x TBS-Puffer mit 900 ml H<sub>2</sub>O auffüllen
- 1 ml Tween zufügen

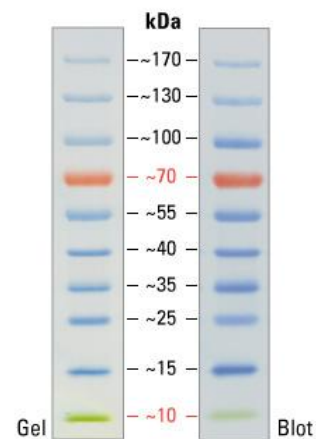
#### 10x TBS-Puffer

- 100 mM Tris (12,184 g/l)
- 1,5 M NaCl (87,66 g/l)
- in 1,5 L H<sub>2</sub>O lösen
- pH auf 7,5 einstellen
- auf 2 L auffüllen

#### **2.2.16.5. Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran: spezifische Detektion mit Antikörper**

Mit spezifischen Antikörpern ist die qualitative, aber auch quantitative (Standards sind in diesem Fall notwendig) Bestimmung eines spezifischen Proteins möglich.

Sollte eine quantitative Aussage getroffen werden, wurden die aufgetragenen Probenmengen derart angeglichen, dass sie zu einem gleichen  $\beta$ -Aktinsignal führten. Dahinter steht der Grundgedanke, dass bei allen Zellen  $\beta$ -Aktin sehr hoch exprimiert wird mit kaum zu erwartenden Unterschieden, und entsprechend gleiches  $\beta$ -Aktinsignal auch gleiche Zellzahl bedeutet. Zur



einfacheren Darstellung wird im Ergebnisteil für Western Blot Darstellungen  $\beta$ -Aktin verkürzt als Aktin bezeichnet.

**Abb. 12: Bandenhöhen des Western-Blot Markers.** Aus Handbuch des Herstellers.

Anhand des mit den Proben aufgetragenen Proteingrößenmarkers (Abb. 12) wurde der Bereich der Membran mit dem Zielprotein herausgeschnitten, gemäß seines Molekulargewichts bzw. des Molekulargewichts seines durch den Antikörper nachweisbaren Fragments. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch TBS-T-Milch für 1 h bei RT geblockt.

TBS-T-Milch: 3 g Milch-Pulver in 100 ml TBS-T lösen

Danach wurde der Antikörper mit Spezifität für das Protein in dem jeweils angegebenen Verhältnis (siehe Materialien - Erstantikörper) in Milch verdünnt. In dieser Milch wurde die Membran über Nacht bei 4°C geschwenkt, sodass genügend Zeit für ein Anhaften des Antikörpers gegeben war, die Proteine und der Antikörper aber auch nicht geschädigt wurden.

Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal 10 min mit TBS-T gewaschen. Dann wurde der Zweitantikörper für 1 h bei RT, auch in Milch verdünnt, zugesetzt. Dieser ist gegen die Spezies gerichtet, in welcher der Erstantikörper entwickelt wurde, bindet also spezifisch an dessen Fc-Region. Danach wurde die Membran erneut drei Mal 10 min mit TBS-T gewaschen.

Um die Lokalisation des Zweitantikörpers und damit die des Erstantikörpers zu detektieren, wurde der an den Zweitantikörper gekoppelten

Meerrettichperoxidase ein Substrat, das Luminol, zugesetzt, welches oxidiert wird. Oxidiertes Luminol ist in einem angeregten Zustand und emittiert Licht. Das Prinzip der Erzeugung von Licht durch Redox-Reaktion wird als Elektrochemilumineszenz (ECL) bezeichnet. Die Lichtemission kann mit einem Fotofilm detektiert werden.

Hierzu wurden die Membranen aus dem TBS-T entnommen, mit ECL-Lösung überschichtet, nach 1,5 min die überschüssige Lösung abgeschüttet und die Membranen zwischen zwei Folien in eine Belichtungskammer gelegt.

In einem Dunkelraum wurden dann Filme für verschieden lange Zeit (1 s bis 5 min) aufgelegt und entwickelt.

#### ECL-Lösung

- 3 ml Reagenz A
  - (200 ml 0,1 M Tris/HCl (12,1 g) + 50 mg Luminol)
- 300 µl Reagenz B
  - (11 mg Coumarinsäure in 10 ml DMSO)
- Kurz vorm Auftragen 0,9 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzufügen

Gescannte Filme wurden mit Image J ausgewertet: Die Intensität des Signals für das Zielprotein wurde normalisiert mit dem Aktin-Signal zwischen den Proben verglichen.

#### **2.2.16.6. Membranen strippen**

Falls auf demselben Membranabschnitt, auf dem bereits ein Protein nachgewiesen wurde, noch ein zweites nachgewiesen werden soll, das aber wegen der Lage des Proteins nicht gleichzeitig detektiert werden konnte, wird die Membran "gestrippt". Dies bedeutet, dass alle Antikörper entfernt werden. Danach kann die Membran von neuem geblockt und mit Antikörper inkubiert werden.

Dafür wurde die entsprechende Membran 60 min bei 50°C in 10 ml Stripping-Puffer mit 70 µl β-Mercaptoethanol auf einem Schüttler geschwenkt, danach

mindestens 30 min mit TBS-T gewaschen, bis kein Geruch des  $\beta$ -Mercaptoethanols mehr nachzuweisen war.

#### Stripping-Puffer

- 3 g Tris in 350 ml H<sub>2</sub>O
- pH auf 6,8 einstellen
- 8 g SDS zugeben
- Auf 400 ml auffüllen

### **2.2.17. Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie kann von Zellen in Suspension automatisch anhand ihrer Eigenschaften, einen Laserstrahl umzulenken oder zu streuen, auf deren Größe und Granularität geschlossen werden. Dabei ist der Forward-Scatter (FSC), das Vorwärtsstreulicht, ein Maß für die Größe, der Side-Scatter (SSC), Seitwärtsstreulicht, ein Maß für die Granularität der Zelle. Des Weiteren ist üblicherweise auch eine Fluoreszenzmessung möglich.

Hier sollte die Durchflusszytometrie zum Vergleich von Zellpopulationen und zum Vergleich der Fluoreszenz von lentiviral transduzierten Zellen nach Stimulation mit Doxycyclin verwendet werden.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen geerntet und die Zellen in PBS resuspendiert, durch ein FACS-Röhrchen-Sieb pipettiert, um einer Verstopfung des Durchflusszytometers vorzubeugen. Vor der Auswertung wurde jede Probe nochmals gevortext. Nach der Detektion der ersten Zellen wurde die Hauptpopulation in einem Diagramm mit Darstellung des FSC und SSC gesucht und markiert. In der eigentlichen Auswertung wurden dann nur noch Zellen mit entsprechenden FSC und SSC im gegebenen Bereich gemessen, sodass keine Verfälschung der Werte durch Debris auftreten sollte. Es wurden jeweils 20.000 Zellen gemessen.

### **2.2.18. BCA-Assay**

Der BCA-Assay dient der Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe. Er basiert auf der Reduktion von Kupfer zu Cu<sup>+</sup> Ionen, welche mit der

namensgebenden Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff bilden. In dieser Arbeit sollte er vor allem verwendet werden, um wildtypische und lentiviral transduzierte Zellen auf ihre Gleichheit im Bezug auf Proteingehalt zu untersuchen.

Dafür wurde je eine abgezählte Zellzahl, hier  $4 \times 10^5$ , in 200  $\mu\text{l}$  hypotonen Puffer aufgenommen. Die Zellen zerreißen dadurch. Bis zur Verwendung wurden Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Mittels Spritzenaufschluss (Resuspendieren mit einer Insulinspritze) wurde die Probe homogenisiert.

Hypotoner Puffer, pH 7,9

- 10 mM Hepes (0,26 g)
- 10  $\mu\text{M}$  KCl (0,074 g)
- 1,5 mM EDTA (500  $\mu\text{l}$  einer 0,3 M Stocklösung)
- 200 mM Sucrose (6,8 g)
- Ad 100 ml

Die Proben wurden unverdünnt und in Wasser 1:1 verdünnt in Triplets in eine 96-Wellplatte pipettiert, jeweils 10  $\mu\text{l}$ , ebenso als Leerwert der Puffer in gleicher Verdünnung mit Wasser wie die Proben. Als Referenz wurden je 3 Wells mit 10  $\mu\text{l}$  Wasser, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,0 mg/ml BSA befüllt, jeweils aus 2 mg/ml Stock verdünnt.

Jedem Well wurden 200  $\mu\text{l}$  Reagenz zugesetzt aus einem Gemisch von 50 Anteilen Pierce Lösung 1 und einem Anteil Pierce Lösung 2 (200  $\mu\text{l}$  + 4  $\mu\text{l}$ ).

Nach einstündiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt, mittels der BSA-Proben eine Standardkurve berechnet und auf der Kurve die Proteinkonzentration der Proben anhand deren Absorption bestimmt.

## **2.2.19. TCGA- und Microarrayanalysen**

### ***2.2.19.1. Herunterladen und Prozessieren von TCGA- und Microarray-Daten***

Das The Cancer Genome Atlas Projekt (TCGA; <https://cancergenome.nih.gov/>, Stand 04/2017) bietet multidimensionale Daten zum Blasenkrebs und weiteren

Krebsentitäten. Um mit diesen Daten zum Beispiel eine Korrelation von *LASP1*-Expression mit klinischen Daten berechnen zu können, wurden microRNA-Daten, klinische Daten und Expressionsdaten (als RNASeqV2-Daten) über das TCGA-Datenportal (<https://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/tcga>, Stand 03/2016) heruntergeladen. RNA-Seq ist eine Methode zur Messung der mRNA Expression. Hierzu wird mRNA revers transkribiert in cDNA, die fragmentiert sequenziert wird. Mittels bioinformatischer Algorithmen werden die gelesenen Sequenzen der genomischen Lokalisation zugeordnet und quantifiziert. TCGA verwendet hierzu den MapSplice Algorithmus und RSEM. Die Anzahl der zu einem Gen zugeordneten gelesenen Sequenzen wird durch Division mit der 75. Perzentile aller Zählwerte und Multiplikation mit 1.000 normalisiert von TCGA dargestellt. Diese Daten wurden für die weiteren Analysen  $\log_2(n+1)$  transformiert mit  $n$  gleich der normalisierten mRNA Expression, sodass Ausreißer weniger Effekt auf die Berechnungen haben sollten und ein Rechenfehler bei  $n=0$  verhindert wird.

Die klinischen Parameter wurden aus sogenannten biotab-Dateien ausgelesen. Die klinischen Daten wurden über den sogenannten TCGA-Barcode durch eine VBA Programmierung in Microsoft Office Excel 2010 den Expressiondaten zugeordnet.

Microarray-Daten wurden für den Vergleich der *LASP1*-Expression in normalem Urothel und primärem TCC verwendet (GSE3167). Ebenso wurden Daten zur Genexpression in Zelllinien vom Cancer Cell Line Encyclopedia Projekt verwendet (GSE36133) (Barretina *et al.*, 2012).

Die entsprechenden Daten wurden mittels ArrayExpress des European Bioinformatic Institute gesucht (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>, Stand 04/2017), und über Gene Expression Omnibus von NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, Stand 04/2017) heruntergeladen. Jede Microarray-Datei, sogenannte CEL-Dateien, wurde getestet, auf demselben Array generiert worden zu sein. Alle Dateien wurden gleichzeitig mit Robust Multi-Array Average (Irizarry *et al.*, 2003) normalisiert. Dieses R basierte Programm normalisiert die Signale zwischen den Array-Dateien und korrigiert ungleichmäßige Hintergrundsignale. Um die Signale verschiedenen

spezifischen Genen zuordnen zu können, wurde eine CDF-Datei verwendet, welche für jedes Gen ein optimiertes Set von Signallokalisierungen innerhalb des Microarrays enthält (Brainarray Version 20.0.0). Diese Daten wurden log<sub>2</sub>-transformiert verwendet.

### **2.2.19.2. Korrelation von Genexpression mit Überleben**

Anhand der gegebenen klinischen Daten von TCGA war eine Korrelation der *LASP1*-mRNA-Expression mit Gesamtüberleben und eventfreiem Überleben möglich. Die Patienten wurden hierzu jeweils anhand der *LASP1*-Expression in solche mit niedriger (2/3) und hoher (höchstes 1/3) unterteilt. Danach wurde das Überleben dieser beiden Gruppen in Kaplan-Meier Kurven dargestellt. Die Signifikanz für Unterschiede im Überleben wurde mit dem Mantel-Haenszel-Test, eine modifizierte, von PRISM verwendete Form des klassischen Log-Rank Tests, bestimmt.

### **2.2.19.3. Korrelation von Genexpression mit Tumor-Parametern**

Zur Korrelation von *LASP1*-Expression mit Tumor-Parametern wurden die Patienten gemäß ihrer medianen *LASP1*-Expression in solche mit niedriger und hoher Expression unterteilt. Bei Parametern, mit denen das *LASP1*-Expressionslevel eine Vierfelder-Kontingenztafel bildete (zum Beispiel N-Stadium) wurde der Fisher-Exakt-Test verwendet. Bei Parametern, die mehr als zwei Werte mit einer Ordnung annehmen können, wie etwa das T-Stadium, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Zur Berechnung wurde der Online-Rechner unter <http://www.socscistatistics.com> verwendet (Stand 04/2017).

Zum Vergleich der *LASP1*-mRNA-Expression in normalem Blasengewebe versus in TCC wurde der zweiseitige ungepaarte t-Test angewandt.

### **2.2.19.4. Analyse von Genexpressionsregulation durch microRNA**

microRNAs (miR) sind zelleigene posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression. Sie binden im RISC-Komplex mit komplementärer mRNA und führen zu deren Abbau (Krol *et al.*, 2010). Da für *LASP1* mehrfach Regulation durch miRs, auch in Karzinomen, gezeigt wurde, sollte mit Hilfe der miR-Daten

von TCGA untersucht werden, ob auch im TCC LASP1 durch miRs, bzw. durch welche miRs reguliert wird.

Hierzu wurden die Patienten in solche mit hoher und niedriger *LASP1*-Expression anhand der medianen *LASP1*-Expression unterteilt und der log2-Fold-Change für jede miR zwischen diesen Gruppen und die Signifikanz für differentielle miR-Expression mit zweiseitigem ungepaartem t-Test bestimmt. Dabei wurden miR-Daten normalisiert auf Anzahl/Million Reads verwendet.

#### **2.2.19.5. Gene-Set Enrichment Analysis, Gene Ontology**

Die Gene-Set Enrichment Analysis (GSEA; <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>, Stand 04/2017) ist ein Tool zur Prädiktion, mit welchen Phänotypen und Zellverhalten die Expression eines Gens korreliert. Als Grundlage dieser Prädiktion stellt man dem Programm eine Rangliste aller Gene zur Verfügung, geordnet nach dem Korrelationskoeffizienten für die Expression des jeweiligen Gens mit der Expression des Gens von Interesse, hier *LASP1*. Das Tool sucht nun die Liste aller Gene von denen mit dem höchsten Korrelationskoeffizienten zu dem mit dem niedrigsten ab. Immer, wenn das Gen in einem vorgefertigten Genset, das in vorherigen Studien mit einem Phänotyp in Verbindung gebracht wurde, vorhanden ist, wird der sogenannte Enrichment Score für dieses Genset erhöht, sonst verringert, mit Gewichtung der Lage des Gens in der Rangliste (Subramanian *et al.*, 2005). Entsprechend verrechnet GSEA, welche Gene stark mit dem Gen von Interesse korrelieren, zu der Aussage, welche Gensets mit diesem Gen korrelieren und damit welche Phänotypen.

Diese Methode wurde auf die TCGA-Daten angewandt.

Das Gene Ontology Consortium bietet die Möglichkeit einer ähnlichen Analyse, die auch auf Enrichment basiert, aber nicht die Korrelation von Genen und ihr Auftreten in definierten Gen Sets untersucht, sondern die überzufällige Häufung von Genen mit ähnlicher Funktion. Das Consortium annotiert jedes Gen im Hinblick auf drei Ontologie-Kategorien: molekulare Funktion, zelluläre Komponenten und biologische Prozesse. Angesichts von zunehmenden Erkenntnissen werden die Annotationen regelmäßig aktualisiert. Hier wurden



die Analysen nochmals mit der GO Ontology database Annotation vom 28.02.2017 kontrolliert. Die Top 5 % der *LASP1* co-regulierten Gene in TCGA Daten wurden über die Gene Ontology Homepage (<http://www.geneontology.org/>, Stand 04/2017) mit dem PANTHER overrepresentation tool, veröffentlicht am 15.06.2016, auf Enrichment untersucht (Ashburner *et al.*, 2000).

### **2.2.20. Statistische Methoden**

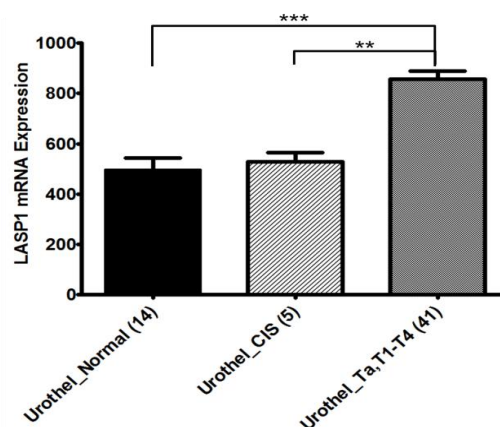
Neben den statistischen Methoden, die speziell bei der Auswertung von TCGA- und Microarray-Daten angewandt wurden und daher im jeweiligen Abschnitt genannt wurden, war der zweiseitige ungepaarte t-Test der Standardtest um die Ergebnisse aus Western Blots und funktionellen Tests zu vergleichen. Es ist von einer normalverteilten Schwankung der Messwerte um den tatsächlichen Wert auszugehen. Da es sich um verschieden behandelte Zellen handelt und zuerst die Frage nach der Signifikanz eines Unterschieds, nicht nach der Signifikanz eines Unterschieds in eine bestimmte Richtung steht, war der ungepaarte und zweiseitige t-Test zu wählen. Bei Versuchen, wo angesichts von zu erwartenden Schwankungen zwischen biologischen Replikaten die Unterschiede zwischen zwei Bedingungen in jedem Versuch für sich betrachtet werden sollten, wurde der gepaarte t-Test verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. T24 und RT4 überexprimieren *LASP1* im Vergleich zu normalem Urothel

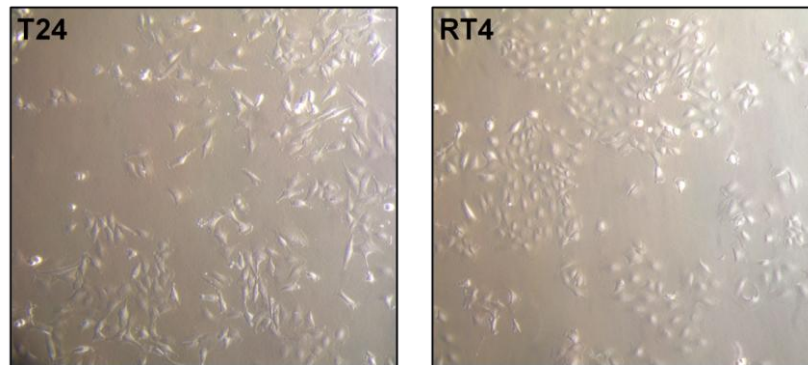
Eine funktionelle Relevanz von *LASP1* im TCC im Sinne eines Effekts auf die Tumoraggressivität, nicht im Sinne einer physiologischen Funktion, ist am ehesten dann anzunehmen, wenn *LASP1* im Karzinom, verglichen zu normalem Urothel, höher exprimiert oder vermehrt aktiviert wird. Um die Expression von *LASP1* zu vergleichen, wurde ein öffentlich zugängliches, Microarray basiertes mRNA-Expressionsdatenset (GSE3167) verwendet. Dieses Datenset beinhaltet 14 Proben normales Urothelgewebe, 5 CIS und 41 Ta, T1 bis T4 Tumoren. Die Berechnungen ergaben eine hochsignifikant höhere Expression von *LASP1* in Ta bis T4 Tumoren verglichen mit Normalgewebe ( $p=0,00005$ ), aber keinen signifikanten Unterschied zwischen CIS und Normalgewebe (Abb. 13). Hierbei ist allerdings die geringe Probenanzahl von CIS zu beachten.

Insgesamt bekräftigte diese initiale Analyse die bisherige Annahme einer deutlichen Überexpression von *LASP1* im TCC und motivierte weiter zur funktionellen Charakterisierung der Relevanz dieser Überexpression.



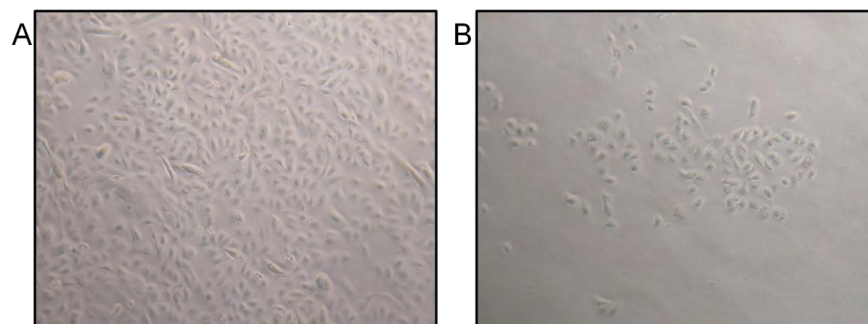
**Abb. 13: *LASP1* ist überexprimiert in Ta, T1-T4 Tumoren verglichen mit normalem Urothel.** Balkendiagramm mit Angabe des Gewebes und Auftragung der mRNA Expression als Mittelwert (natürliche Skala) mit Standardfehler des Mittelwerts. \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

Als Modell für TCC in der Zellkultur wurden die Zelllinien T24 und RT4 verwendet. T24 ist *p53* mutiert und der Ursprungstumor wuchs invasiv, RT4 hingegen ist *p53* wildtypisch und der Ursprungstumor wuchs papillär. Beide Zelllinien ließen sich problemlos adhärent kultivieren (Abb. 14).



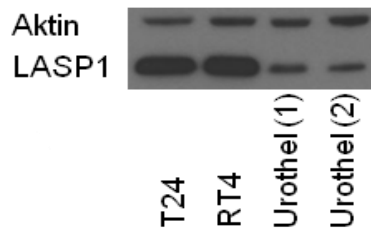
**Abb. 14: Fotografien von T24 und RT4 Zellen.** Aufnahme unter Auflichtmikroskop. Die Zellen wachsen adhärent.

Um zu testen, ob diese Zellen valide Modelle für die Funktion von LASP1 im TCC darstellen, wurde deren LASP1-Expression im Vergleich zu normalem Urothel bestimmt. Hierzu wurde zweimalig Urothel mechanisch von Ureteren isoliert und in speziellem Medium bis annähernd zur Konfluenz kultiviert (Abb. 15), danach mechanisch gelöst, lysiert und mit Lysaten von T24 und RT4 auf einen Western Blot aufgetragen.



**Abb. 15: Fotografien von primärer Urothelkultur.** Aufnahmen unter Auflichtmikroskop. A und B zeigen die Zellen in Stadien verschiedenener Konfluenz.

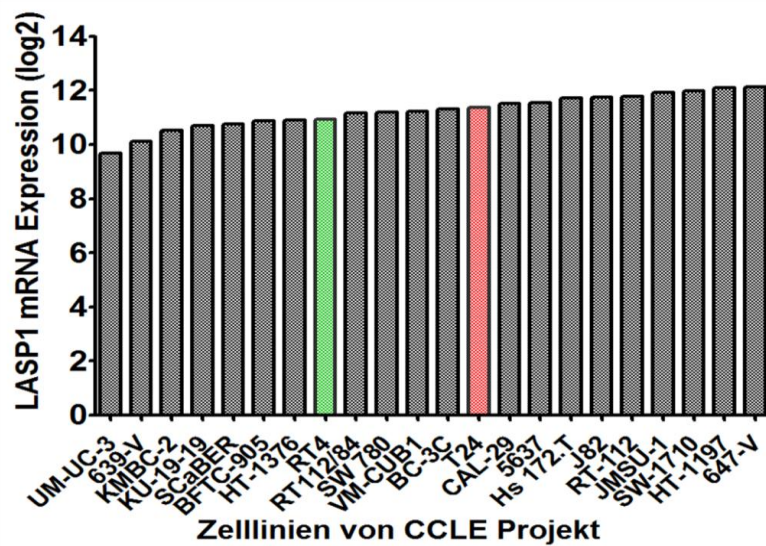
In den Krebszelllinien war die *LASP1*-Expression im Vergleich zu den primären Urothelzellen um das 4-5-Fache erhöht (Abb. 16).



**Abb. 16: *LASP1* ist überexprimiert in T24 und RT4 TCC-Zelllinien verglichen mit normalem Urothel.** Western Blot von primären Urothel, T24 und RT4 für *LASP1*. Die Proben wurden für Aktin angeglichen. Es zeigt sich eine deutlich geringere *LASP1*-Expression im primärem Urothel.

Ein weiteres Kultivieren der primären Urothelzellen gelang nicht, da die Zellen nicht erneut adhärirten, bzw. sich entweder beim Ablösen nicht vereinzeln ließen oder aber lysierten, sodass auch eine Zählung der Zellen nicht möglich war.

Ein Vergleich der Expression von *LASP1* auf mRNA Level in T24, RT4 und weiteren 20 Blasenkrebs-Zelllinien im Cancer Cell Line Encyclopedia Projekt (Barretina *et al.*, 2012) ergab, dass alle Zelllinien ähnlich hoch *LASP1* exprimieren (Abb. 17). Daher wurden auch die weiteren Untersuchungen in diesem Projekt mit T24 und RT4 durchgeführt.

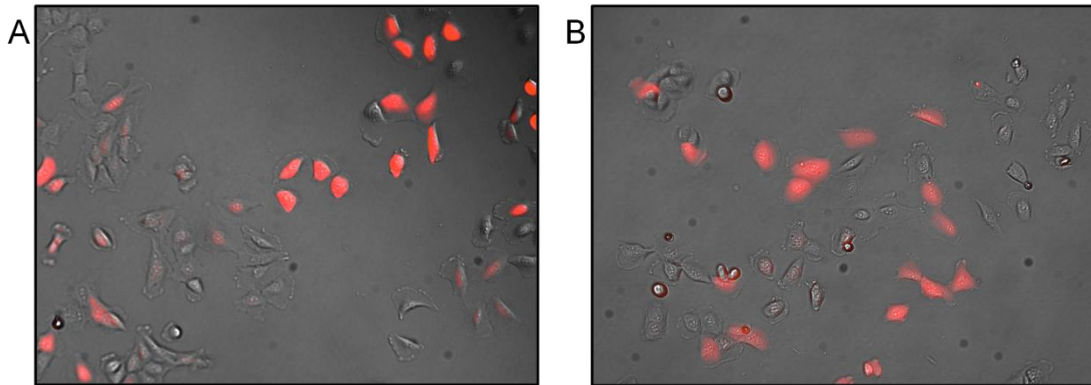


**Abb. 17: LASP1 ist hoch exprimiert in Blasenkrebs-Zelllinien.** Balkendiagramm mit Auftragung der Blasenkrebszelllinien im CCLE Projekt und deren Expression (log2 transformiert); T24 rot, RT4 grün markiert.

### 3.2. T24 und RT4 wurden erfolgreich mit einem induzierbar shLASP1 exprimierendem Konstrukt lentiviral transduziert

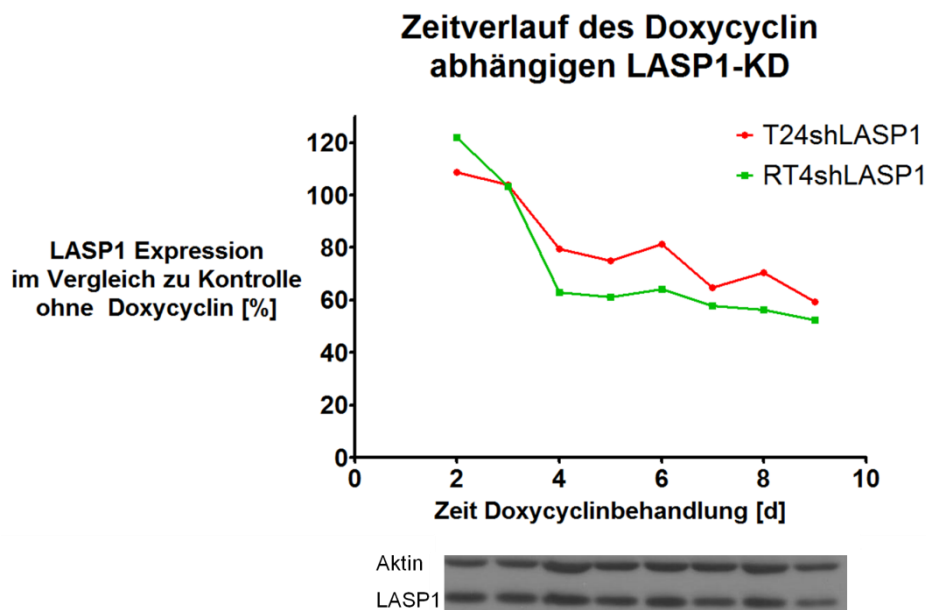
Da T24 und RT4 LASP1 hoch exprimieren, sollte LASP1 runterreguliert werden, um das Zellverhalten mit hohem und eher physiologischem LASP1 Level vergleichen zu können. Neben der transienten Transfektion mit siRNA gegen *LASP1* mRNA sollten Zelllinien generiert werden, bei denen der Knockdown durch Zugabe von Doxycyclin aktiviert werden konnte. Dies ermöglicht auch Arbeiten *in vivo*. Entsprechend wurden Viruspartikel in HEK293T Zellen gebildet, die einen Vektor mit einer Puromycin-Resistenzkassette und einem Tetracyclin responsiblen Element tragen, gefolgt von der Sequenz für turboRFP und eine shRNA gegen LASP1. Als Kontrolle wurde ein entsprechendes Konstrukt mit einer Kontroll-shRNA verwendet, die keine bekannte Interaktion mit mRNA eingeht. Mit diesen viralen Partikeln wurden T24 und RT4 infiziert. Danach wurden die lentiviral transduzierten Zellen mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert.

In fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung war die rote Färbung durch tRFP als Marker für die erfolgreiche lentivirale Transduktion nach Doxycyclingabe deutlich sichtbar (Abb. 18).



**Abb. 18: tRFP Signal in Fluoreszenzmikroskop zeigt erfolgreiche lentivirale Transduktion.** Dargestellt sind (A) T24shLASP1 und (B) T24shControl Zellen nach dreitägiger Doxycyclingabe.

Der LASP1-KD wurde für beide Zelllinien nach zwei bis neun Tagen Zugabe von 0,5 µg/ml Doxycyclin bestimmt. Doxycyclin wurde hierbei alle 72 h erneuert. Nach vier Tagen wurde erstmals ein KD sichtbar, der sich nach längerer Doxycyclingabe nur gering verstärkte (Abb. 19).

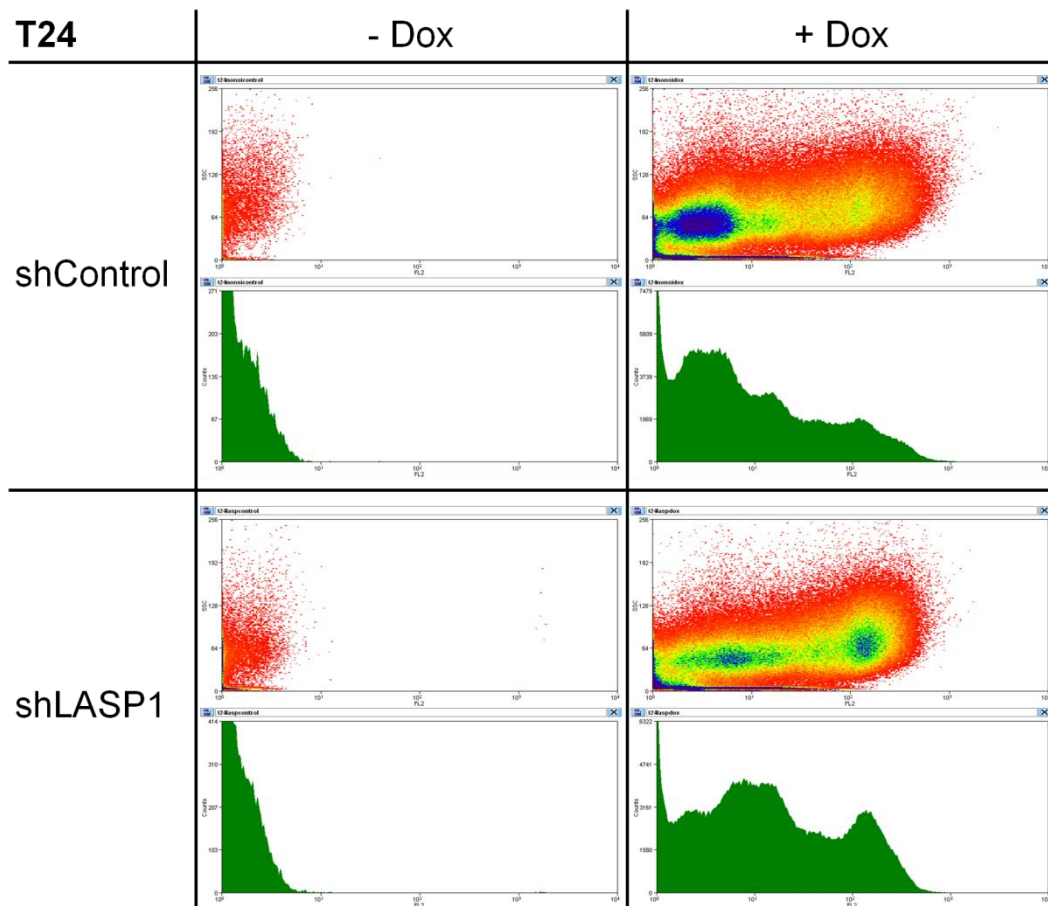


**Abb. 19: LASP1 wird durch shLASP1 in T24 und RT4 herunterreguliert.** Oben: Zeitverlauf mit Angabe der Tage Doxycyclinbehandlung (0,5 µg/ml) und der LASP1-Expression, bestimmt mittels Western Blot im Vergleich zu den gleichen Zellen ohne Doxycyclingabe. Unten: Western Blot für T24shLASP1 mit Aktin (als Housekeeping-Gen) und LASP1. Die Bandenzuordnung entspricht den Tagen auf der x-Achse des Diagramms oben.

### 3.3. shLASP1- und shControl-transduzierte T24 und RT4 Zellen wurden entsprechend ihres tRFP Signals sortiert

Um einen verbesserten KD zu erreichen, werden häufig Klone aus lentiviral transduzierten Einzelzellen anhand des besten KDs gewählt. Durch die Isogenität besteht aber die Gefahr, dass eventuelle genetische Veränderungen in den Zellen nicht durch Heterogenität ausgeglichen werden kann.

Bei den hier vorliegenden transduzierten Zellen wird mit jedem Ablesen der shRNA auch tRFP abgelesen. Entsprechend ist es plausibel, dass vermehrtes tRFP Fluoreszenzsignal mit erhöhter shRNA Transkription und erhöhtem KD einhergeht. Daher wurden T24shLASP1, RT4shLASP1 und die Kontrollzellen entsprechend ihres tRFP Signals nach drei Tagen 0,5 µg/ml Doxycyclingabe sortiert (Abb. 20). Hierbei wurden die 20 % der Zellen mit dem höchsten Fluoreszenzsignal als "high" gesortet, solche mit niedrigerem, aber vorhandenem Signal als "low".



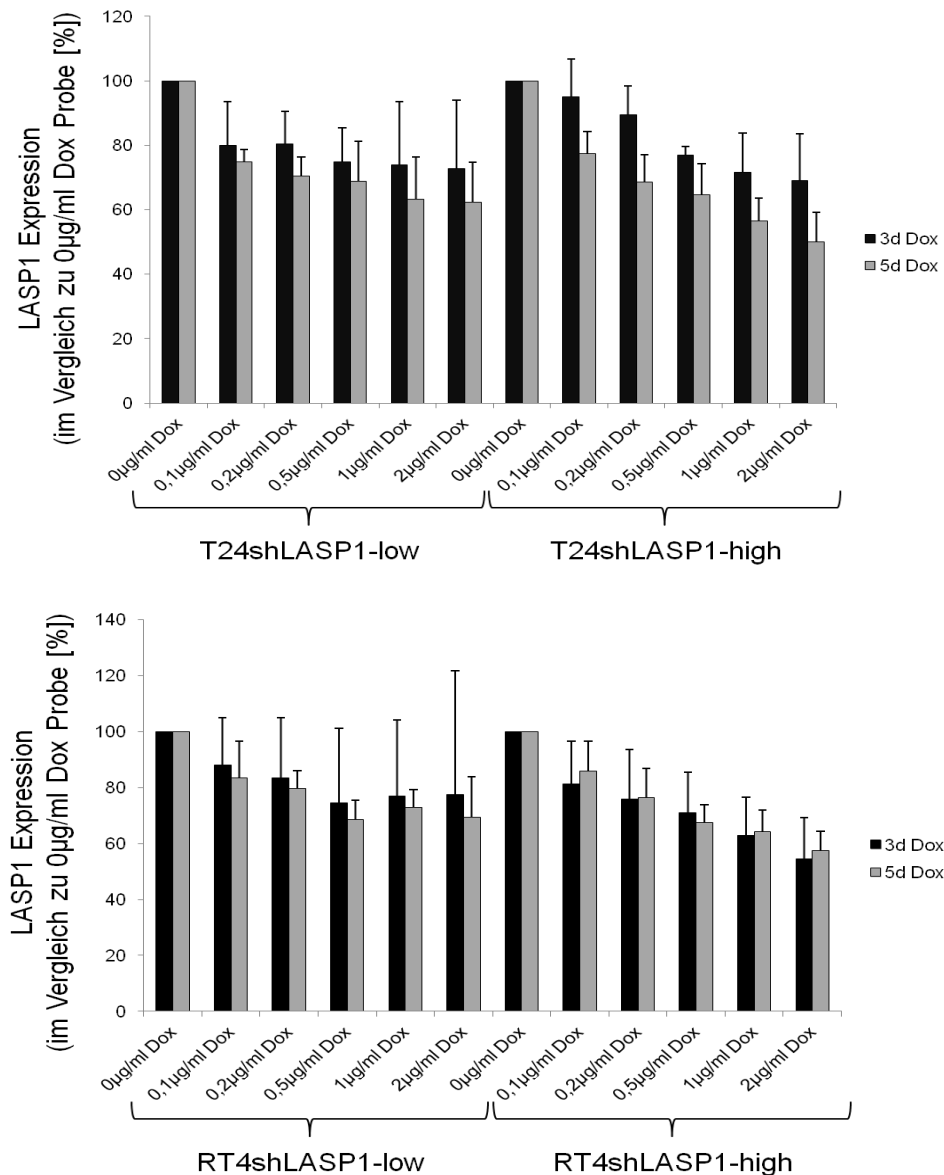
**Abb. 20: Dichteplot für T24sLASP1 und -shControl Zellen mit und ohne Doxycyclingabe.** In grün Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenz; von links nach rechts zunehmende Fluoreszenz. Darüber Dichteplot für Fluoreszenz und SSC. Es zeigen sich Subpopulationen bei verschiedenen Fluoreszenzsignalintensitäten.

Um die ursprüngliche Überlegung, dass ein höheres Fluoreszenzsignal mit höherem KD einhergeht, zu evaluieren, und um die optimalen Bedingungen für einen LASP1-KD zu finden, wurden die sortierten Zellen drei oder fünf Tage mit Doxycyclin verschiedener Konzentrationen (0,1 µg/ml; 0,2 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 2 µg/ml; Mediumwechsel nach 48 h) behandelt. Der LASP1-KD wurde daraufhin in Western Blots bestimmt.

Ab 0,5 µg/ml Doxycyclin trat ein deutlicher KD von 25-35 % ein, der nach 5 d für alle Zellen signifikant war. Höhere Doxycyclinkonzentrationen führten zu keiner weiteren Steigerung des KDs. Nach fünf Tagen erschien der KD allgemein



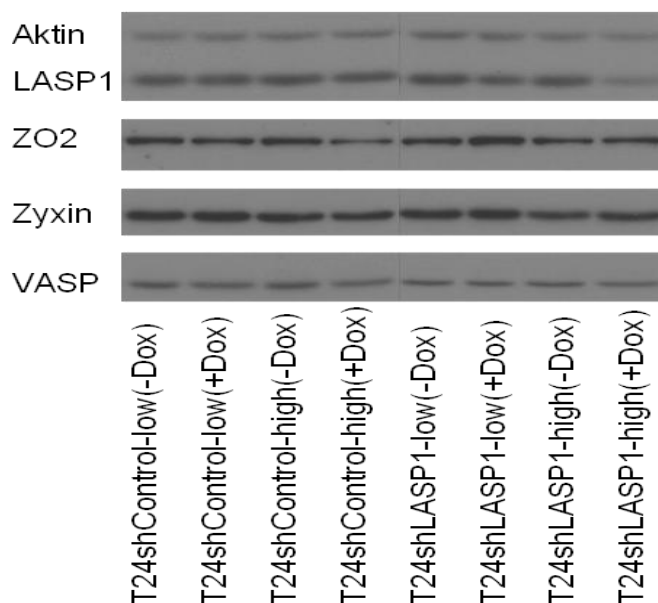
ausgeprägter als nach drei Tagen. Es konnte bei hohen Schwankungen der Messwerte kein signifikanter Unterschied zwischen "high" und "low" sortierten Zellen festgestellt werden (Abb. 21).



**Abb. 21: Doxycyclingabe führt zum LASP1-KD in "low" und "high" gesorteten T24shLASP1 und RT4shLASP1 Zellen.** Balkendiagramme für transduzierte und sortierte T24 (oben) und RT4 (unten) Zellen. Angabe der Zelllinie und der Dox-Konzentration auf der x-Achse, im Western Blot bestimmte Protein-Expression auf der y-Achse (relativ zu Probe mit 0 µg/ml Dox, Mittelwert und Standardabweichung). Schwarze Balken repräsentieren Proben nach 3 Tagen, graue nach 5 Tagen Dox-Gabe; n=3.

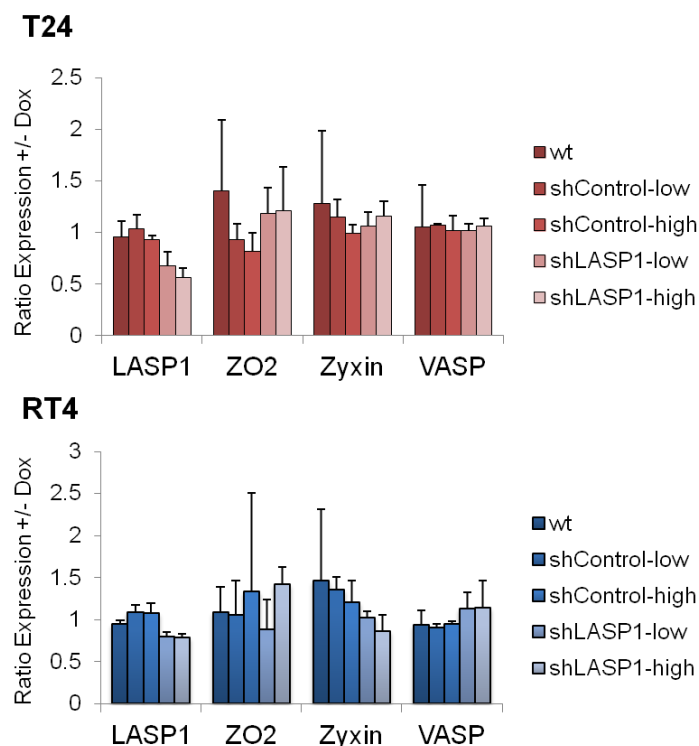
Zur Vermeidung von toxischen Effekten durch zu hohe Dox-Konzentrationen wurde sich für die Verwendung einer Dox-Konzentration von 0,5 µg/ml entschieden. Trotz der nicht-signifikanten KD-Unterschiede zwischen "low" und "high" sortierten Zellen, sollten beide Linien weiter zu funktionellen Analysen herangezogen werden. Durch die Replikate in den funktionellen Analysen sollte bestimmt werden, ob sich der LASP1-KD zwischen den verschiedenen sortierten Zellen doch geringfügig unterscheidet, und ob Schwankungen in der LASP1-Expression nach LASP1-KD zu differenzierten Effekten führen könnten.

Damit von den geplanten funktionellen Analysen tatsächlich Rückschlüsse auf die Funktion von LASP1 gezogen werden können, wurde zuletzt die Expression der bekannten LASP1 Bindungspartner ZO2, Zyxin und VASP1 bestimmt. Hierzu wurden alle transduzierten und sortierten Zellen 5 Tage mit und ohne 0,5 µg/ml inkubiert (Mediumwechsel nach 3 Tagen) und die Lysate dann in einem Western Blot verwendet (Abb. 22).



**Abb. 22: Die Expression der Bindepartner von LASP1 bleibt nach Doxycyclingabe gleich.** Es zeigt sich lediglich ein LASP1-KD bei den shLASP1-transduzierten Zellen. Western Blot mit Aktin als Ladekontrolle; exemplarische Darstellung.

Es wurde erwartet, dass, abgesehen von der LASP1-Expression in shLASP1-transduzierten Zellen, die Aktin-normalisierte Expression eines Proteins in einer Zelllinie ohne Dox- und mit Dox-Gabe denselben Wert aufweist, das Verhältnis der Expression in diesen beiden Bedingungen also 1:1 ist. Tatsächlich wich bei den T24 Zellen ausschließlich in T24shLASP1-low und T24shLASP1-high Zellen das Verhältnis von LASP1-Expression in Zellen mit und ohne Dox-Gabe von dem in wildtypischen Kontrollen ab (Tendenz mit  $p=0,077$  für T24shLASP1-low,  $p=0,026$  für T24shLASP1-high). Die Expression der Bindepartner blieb unverändert (Abb. 23, oben). Bei den RT4 Zellen ergaben sich keinerlei Tendenzen oder Signifikanzen bei einer solchen Berechnung. Der Unterschied in der Proteinexpression zwischen RT4 Zellen mit und ohne Dox war allerdings am deutlichsten für die LASP1-Expression in shLASP1-transduzierten Zellen (Abb. 23, unten).



**Abb. 23: LASP1 wird ausschließlich in shLASP1-transduzierten Zellen nach Dox-Gabe differentiell exprimiert; die Expression der LASP1 Bindepartner ist in allen Zelllinien mit und ohne Dox-Gabe gleich.** Balkendiagramme für T24 (oben) und RT4 (unten) Zellen. Auf der x-Achse sind die gemessenen Bindepartner aufgetragen, auf der y-Achse das Verhältnis der Aktin-normalisierten Protein-Expression in Zellen mit versus ohne Dox-Gabe. Die verschiedenen Balkenfarben indizieren die rechts angegebenen verschiedenen transduzierten und sortierten Zellen; n=3.

### **3.4. Funktionelle Analyse der Auswirkung von LASP1-KD auf Adhäsion von Blasenkarzinomzelllinien: LASP1-KD zeigt keinen Effekt**

Die Fähigkeit einer Krebszelle zur Adhäsion ist im Rahmen der Metastasierung zwingend erforderlich, wie etwa bei der Adhäsion an die Gefäßwand bei hämatogener oder lymphogener Metastasierung, oder bei der Adhäsion an die extrazelluläre Matrix bei der Migration durch selbige. Da vermehrt LASP1 im Urinpellet von Blasenkarzinompatienten gefunden wurde, kann im Blasenkarzinom über eine erniedrigte Adhäsion und damit eine erhöhte Abschilferung von Krebszellen spekuliert werden.

Daher sollte der Effekt von LASP1-KD auf Adhäsion untersucht werden. Hierzu wurde im ersten Schritt der bisher im Labor etablierte Adhäsionsassay im Bezug auf verschiedene Fragestellungen hin untersucht und teilweise optimiert.

#### **3.4.1. Optimierung des Adhäsionsassays**

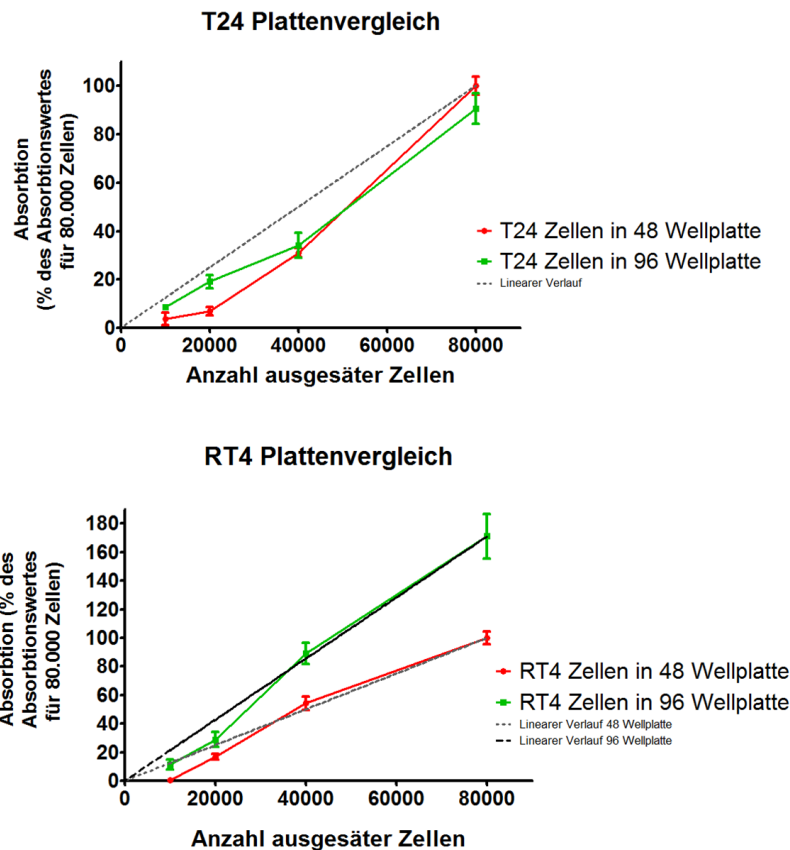
Der hier verwendete Adhäsionsassay basiert auf dem einfachen Prinzip, Zellen auszusäen, nach einer bestimmten Zeit die nicht-adhären Zellen abzuwaschen und die Menge der adhären Zellen relativ zueinander zu bestimmen. Letzteres wurde durch Färben von PFA-fixierten Zellen mit Kristallviolett (KV) und anschließender Absorptionsmessung des aus den Zellen wieder eluierten KVs bestimmt. Durch das Waschen werden nicht nur nicht-adhären Zellen, sondern auch schwach adhären Zellen gelöst. Entsprechend sind sowohl Adhäsionsgeschwindigkeit als auch Adhäsionsstärke immer kombiniert im Ergebnis dieses Assays abgebildet.

Es stellen sich im Verlauf des genannten Protokolls folgende Fragen: Welche Plattengröße soll verwendet werden? Wie sollen die Platten beschichtet werden? Wie viele Zellen sollen ausgesät werden? Wie lange sollen die Zellen adhären? Wie werden die Zellen fixiert und angefärbt?

Für die Bestimmung der Absorption des KV-Eluats musste bisher selbiges von 48-Wellplatten, in denen die Zellen adhärten, in 96-Wellplatten für das entsprechende Lesegerät übertragen werden. Dieser Arbeitsschritt würde durch Adhäsion der Zellen in einer 96-Wellplatte entfallen, bzw., um Verzerrungen durch die fixierten Zellen zu vermeiden, könnte durch schnelles Überführen des Eluats mit einer Mehrkanalpipette vereinfacht werden.

Daher wurde die Adhäsion in einer 96-Wellplatte mit der in einer 48-Wellplatte verglichen, indem die Absorptionswerte für das KV-Eluat zwischen den Platten bei jeweils gleicher ausgesäter Zellzahl verglichen wurden. Gleichzeitig wurden verschiedene Zellzahlen getestet (von 10.000 bis 80.000 Zellen pro Well), um eine geeignete Zellzahl zu erkennen, bei der die Messwerte deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden sind und in einem linearen Bereich liegen.

Es zeigte sich, dass beide Platten für die jeweilige Zellzahl ähnliche Absorptionswerte ergeben. Eine Ausnahme bilden RT4 Zellen, bei denen das Signal ab 40.000 Zellen in einer 96-Wellplatten deutlich schneller anstieg als in einer 48-Wellplatte. In beiden Platten folgt das Signal einer Linie und ist ab 20.000 Zellen deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden (Abb. 24). Daher sind beide Plattengrößen mit 20.000-80.000 Zellen pro Well verwendbar. Für die weiteren Versuche wurde die Zellzahl 40.000 pro Well einer 48 Wellplatte gewählt.



**Abb. 24: Die gemessene Absorption als Wert der Adhäsion verhält sich bei Verwendung von 96- und 48-Wellplatten ähnlich und ist linear zur verwendeten Zellzahl.** 10.000 bis 80.000 Zellen wurden für 4,5 h auf einer 48- (grün) und 96- (rot) Wellplatte ausgesät, PFA fixiert und mit KV gefärbt, danach wurde die Absorption des KV-Eluats bestimmt. Zellzahl auf x-Achse aufgetragen, Absorption relativ zu der maximalen Absorption in 48-Wellplatte angegeben; nicht durchgängige Linien zeigen optimalen linearen Verlauf des Signals; n=3.

Bezüglich Fixierung und Färbung der Zellen ist relevant, dass möglichst alle adhärennten Zellen suffizient fixiert werden, um nicht während des Färbeprozesses verloren zu gehen. Um festzustellen, ob es durch die Verwendung einer anderen Fixier- oder Färbemethode zu einem veränderten Ergebnis kommt und eine bestimmte Kombination bevorzugt werden sollte, wurden  $4 \times 10^4$  Zellen in acht 48-Wellplatten ausgesät. Die Hälfte der Platten wurde nach 3,5 h, die übrigen Platten nach 6,5 h (bei damaliger Annahme von etwa 100 % Adhäsion zu diesem Zeitpunkt) mit den verschiedenen Kombinationen von PFA-Fixierung, TCA-Fixierung, KV-Färbung und SRB-Färbung ausgewertet. Später wurden 6,5 h als Zeitpunkt für 90 % Adhärenz

erkannt und die alten Messwerte mit dem Faktor 1,1 korrigiert. Vergleicht man alle Kombinationen miteinander, so sind die jeweils bestimmten Anteile adhärenter Zellen (3,5 h-Wert zu 6,5 h-Wert) sehr ähnlich. Die Ratios zueinander weichen nicht signifikant ab (Tabelle 2). Entsprechend sind für die Zelllinien T24 und RT4 beide Fixiermethoden und Färbemethoden in allen Kombinationen gleichwertig.

**Tabelle 2: PFA- und TCA-Fixierung, ebenso wie KV- und SRB-Färbung sind gleichwertig für T24 und RT4.** Obere Tabelle zeigt Ratio der als adhärent bestimmten T24 Zellen (3,5 h-Messwert/6,5 h-Messwert) für die links angegebenen Kombinationen von Fixierung und Färbung, rechts p-Wert; unten gleiche Darstellung für RT4; n=3.

<b>T24</b>			Ratio adhärent bestimmter Zellen	p-Wert
PFA vs. TCA Fixierung	KV - gefärbt		1,008	0,943
		SRB - gefärbt	1,171	0,647
KV vs. SRB Färbung	PFA fixiert		0,861	0,444
		TCA fixiert	0,965	0,809
<b>RT4</b>			Ratio adhärent bestimmter Zellen	p-Wert
PFA vs. TCA Fixierung	KV - gefärbt		0,877	0,621
		SRB - gefärbt	1,122	0,755
KV vs. SRB Färbung	PFA fixiert		0,957	0,961
		TCA fixiert	1,282	0,361

Als zwei Nachteile dieser Fixier- und Färbemethoden wurde aber die Möglichkeit des Verlusts von Zellen durch viele Waschschriffe gesehen und, dass das Ergebnis aus Absorptionswerten besteht, die nur zwischen zwei Bedingungen in einem biologischen Replikat verglichen werden können.

Daher wurde als neue Methode zur Auswertung eines Adhäsionsassays das CellTiter-Glo-Kit von Promega verwendet. Dieses lysiert Zellen und generiert ein Lumineszenz-Signal basierend auf dem ATP-Gehalt der Zellen. Da LASP1

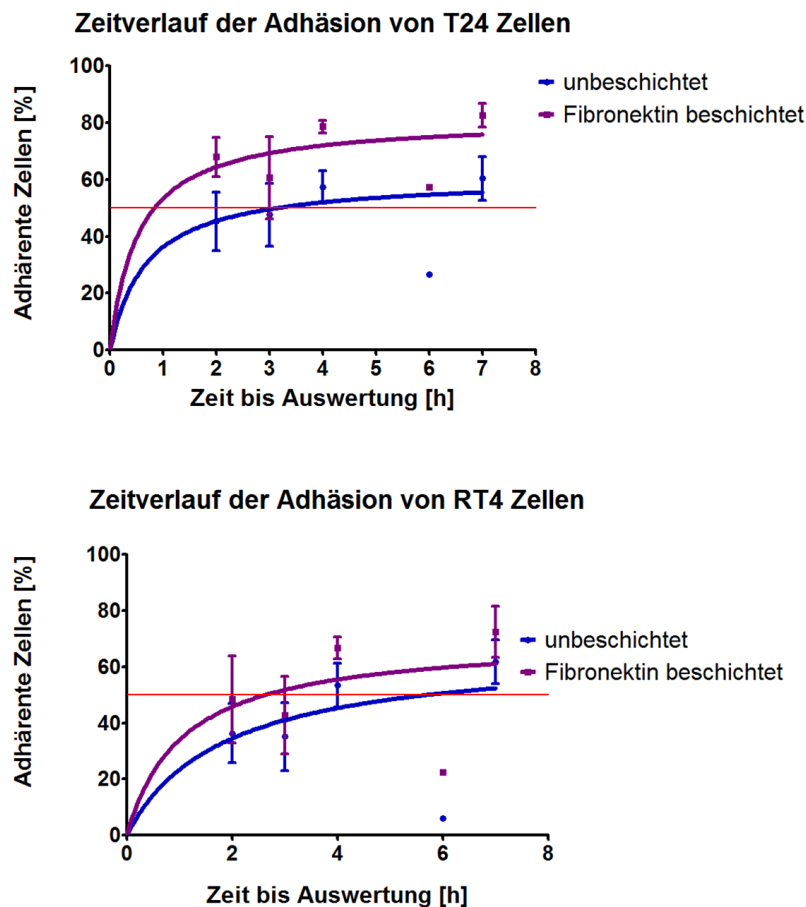
bisher nicht in Verbindung mit dem Energiehaushalt der Zelle gebracht wurde, konnte bei KD- und Kontrollbedingungen von einem gleichen ATP-Gehalt der Zellen ausgegangen werden, und entsprechend das Kit angewandt werden. Hiermit entfielen nicht nur Waschschriffe für Fixierung und Färbung, was das Prozedere beschleunigte, sondern es konnte auch genau bestimmt werden, wie viel Zellen (in Prozent) bei der Auswertung adhären waren. Hierzu mussten lediglich in einigen Wells die nicht-adhären Zellen nicht gewaschen werden, sondern zusammen mit den adhären Zellen lysiert werden. Diese Wells ergeben einen 100 % Wert in der Lumineszenz-Messung. Da die Messung der Lumineszenz des Lysats in speziellen weißen Platten durchgeführt wird, musste das Lysat immer von der Adhäsionsassay-Platte überführt werden. Entsprechend konnten wieder 48- oder 96-Wellplatten für den Assay verwendet werden; wegen der einfacheren Handhabung beim Waschen wurden 48-Wellplatten gewählt.

Mit diesem Assay war auch die Bestimmung der optimalen Dauer des Adhäsionsassays zu bestimmen. Die optimale Dauer entspricht der Zeit, zu der 50 % der Kontrollzellen adhären sind. Dadurch kann sowohl eine gesteigerte, als auch eine reduzierte Adhärenz der weiteren getesteten Bedingungen detektiert werden.

Um diese Zeit für T24 und RT4 zu bestimmen wurden  $4 \times 10^4$  Zellen in 48-Wellplatten ausgesät und diese nach 2-7 h ausgewertet. Gleichzeitig wurde getestet, ob die Zellen verbessert an Fibronektin-beschichteten Platten adhären. Fibronektin wurde gewählt, da es als Adhäsionsmolekül beim Wandern der Zellen, etwa bei der Metastasierung, dient.

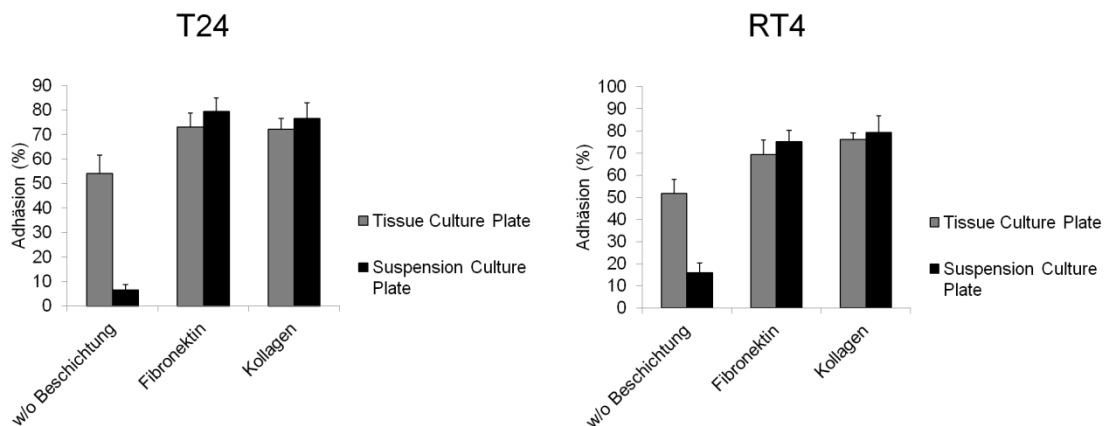
Es zeigte sich eine verbesserte Adhäsion bei der Nutzung von Fibronektin-beschichteten Platten. Außerdem adhären T24 Zellen schneller als RT4 Zellen. Eine Adhärenz von 50 % war jeweils bei den beschichteten Platten bereits nach 2 h gegeben (Abb. 25). Daher wurden alle Adhäsionsassays für T24 und RT4 auf Fibronektin-beschichteten Platten für die Dauer von 2 h und mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^4$  Zellen/Well durchgeführt.





**Abb. 25: Fibronektin steigert die Adhäsion von T24 und RT4, 50 % Adhärenz nach 2h erreicht.** Zeitverlauf der Adhäsion von T24 (oben) und RT4 (unten) wildtypischen Zellen auf unbeschichteten (blau) und Fibronektin beschichteten (lila) Platten. Adhäsionszeit als Stunden auf der x-Achse aufgetragen, auf der y-Achse der Anteil adhärenter Zellen in Prozent; rote Linie zeigt 50 %; n=3.

Der Unterschied in der Adhäsion zwischen den verwendeten Kulturplatten ohne und mit Beschichtung ist zwar signifikant, aber eher gering. Daraufhin wurde die Beschichtung von Suspensionskulturplatten untersucht. Es zeigte sich, dass auf Suspensionskulturplatten, im Gegensatz zu Gewebekulturplatten, bei einer Assaydauer von 2 h kaum Zellen adhäreren, während die Beschichtung mit Fibronektin oder Kollagen in einer gleich effektiven Adhärenz auf beiden Plattenarten resultierte (Abb. 26). Da man angesichts dieser Ergebnisse bei der Verwendung von beschichteten Suspensionskulturplatten sicherer davon ausgehen kann, dass die Adhäsion wirklich an der Beschichtung erfolgt, erscheint die Verwendung solcher Platten sinnvoller.

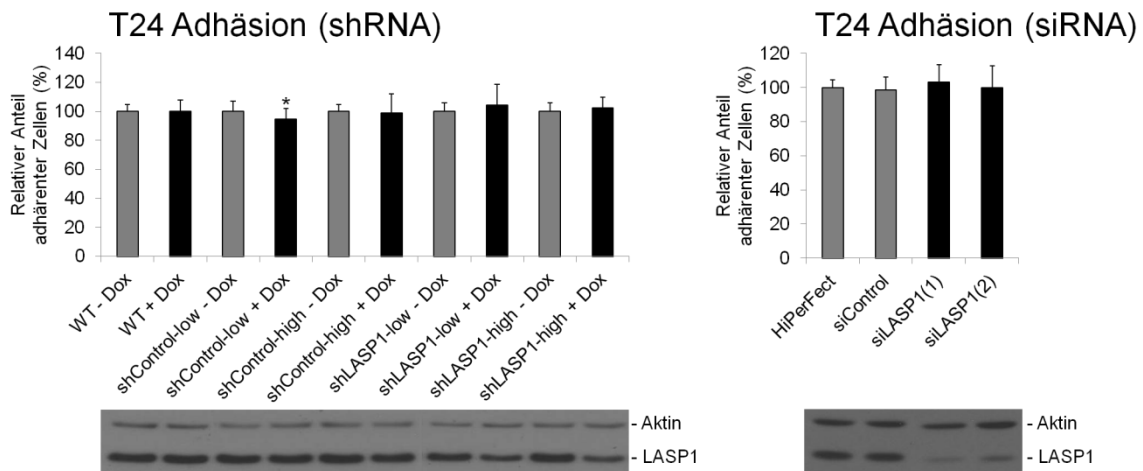


**Abb. 26: Vergleich der Adhärenz von T24 und RT4 Zellen an Gewebe- und Suspensionskulturplatten mit und ohne Fibronectin- oder Kollagenbeschichtung.**  $1 \times 10^4$  Zellen wurden für 2h auf Gewebekulturplatten (grau) und Suspensionskulturplatten (schwarz) ausgesät mit der angegebenen Beschichtung; Auswertung mit CellTiter-Glo. Adhäsion als Mittelwert adhärenter Zellen in Prozent angegeben mit Standardabweichung; n=3.

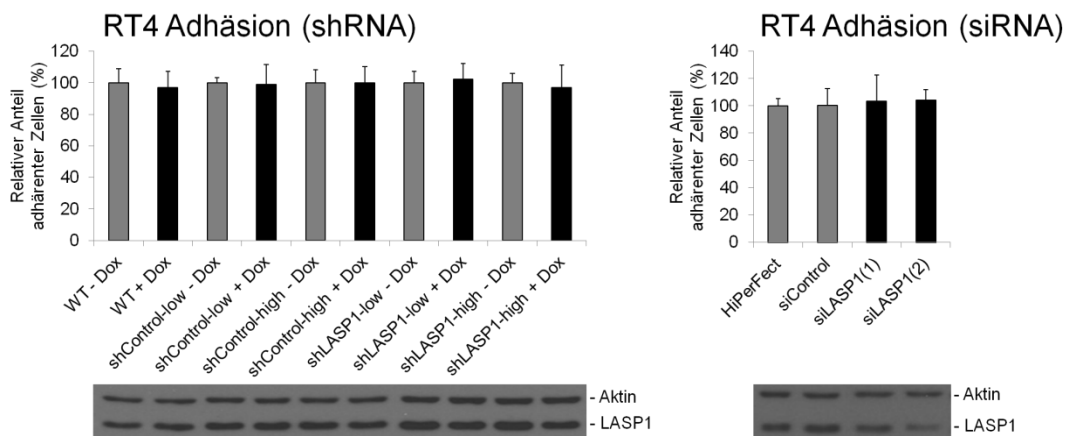
### 3.4.2. LASP1-KD zeigt keinen Effekt auf Adhäsion in T24 und RT4 Zellen

Mit dem unter 3.4.1. dargestelltem Prozedere, nämlich das Aussäen von  $4 \times 10^4$  Zellen auf Fibronectin-beschichteten Gewebekulturplatten, Adhäsion für 2 h und Auswertung mit CellTiter-Glo, sollten mögliche Effekte von LASP1-KD auf die Adhäsion von T24 und RT4 Zellen bestimmt werden. Dabei wurden sowohl die bereits erwähnten transduzierten und sortierten Zellen verwendet (Induktion des Konstruktes mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Doxycyclin) als auch transient mit siRNA gegen LASP1 transfizierte Zellen. Ein einheitlicher Effekt unter beiden KD-Bedingungen würde LASP1 als Ursache des Effekts, im Gegensatz zu sogenannten Off-Target-Effekten, verlässlicher erscheinen lassen.

Bei einem durchschnittlichen LASP1-KD von 40-50 % in den shLASP1-transduzierten T24 Zellen zeigte sich kein signifikant verändertes Adhäsionsverhalten, ebenso nicht in den siLASP1 transfizierten Zellen. Der einzig signifikante Unterschied ergab sich für die Adhäsion von mit Dox inkubierten T24shControl-low Zellen im Vergleich zu denen ohne Dox (Abb. 27). Hier war über drei Versuche konstant die Adhäsion um 5 % verringert,  $p=0,044$ .



**Abb. 27: LASP1-KD hat keinen Effekt auf die Adhäsion von T24 Zellen.** Links ist die Adhäsion der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Adhäsion von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt.  $n \geq 3$ ; \*  $p < 0,05$ .



**Abb. 28: LASP1-KD hat keinen Effekt auf die Adhäsion von RT4 Zellen.** Links ist die Adhäsion der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Adhäsion von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt.  $n \geq 3$ .

Auch für RT4 Zellen ergaben sich bei einem durchschnittlichen LASP1-KD von 20-45 % für shLASP1-transduzierte Zellen keinerlei signifikante Veränderungen in der Adhäsion (Abb. 28).

Zusammenfassend konnte bei keiner verwendeten Methode für einen LASP1-KD eine veränderte Adhäsion unter KD-Bedingungen festgestellt werden.

### **3.5. Funktionelle Analyse der Auswirkung von LASP1-KD auf Proliferation von Blasenkarzinomzelllinien: LASP1-KD zeigt keinen Effekt**

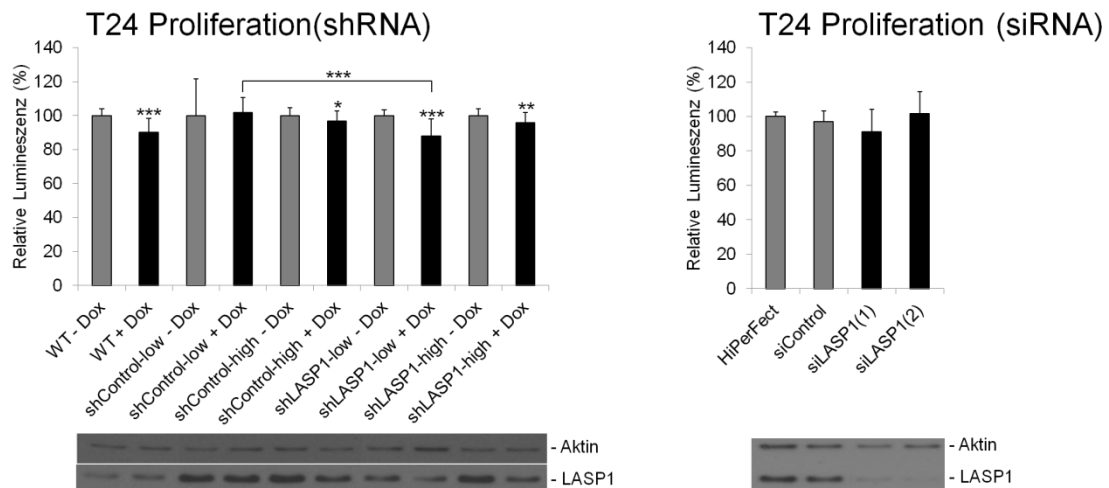
Ein weiteres wichtiges Kriterium für Tumoraggressivität ist die Fähigkeit einer Tumorzelle zur Proliferation und deren Geschwindigkeit. Daher sollte der Effekt von LASP1-KD auf die Proliferation der T24 und RT4 Zellen getestet werden. Hierbei wurde die Proliferation sowohl für shRNA-transduzierte als auch siRNA transient transfizierte Zellen bestimmt, um eventuell erfassbare Effekte als LASP1 abhängig, und nicht als Off-Target-Effekte bewerten zu können. Des Weiteren wurde die Proliferation sowohl durch Zellzählung, als auch mit einem metabolischen Assay, CellTiter-Glo, bestimmt. Ersterer zeigt auch bei Veränderungen im Zellmetabolismus kein verzerrtes Ergebnis, ist aber nur mit wenigen technischen Replikaten durchführbar. Genau umgekehrt verhält es sich für den metabolischen Assay. Daher können sich beide Methoden gegenseitig in ihren Resultaten bestätigen. Die gezählten Assays wurden nach 5 Tagen ausgewertet, die metabolischen Assays nach 4-5 Tagen abhängig von der Konfluenz der Zellen.

Für T24 Zellen zeigte sich im metabolischen Assay bei den mit Dox inkubierten Zellen (außer bei T24shControl-low) fast in allen biologischen Replikaten eine verringerte Proliferation um 4-12 % im Vergleich zu denselben Zellen ohne Dox (Abb. 29, links). Die Proliferation der T24shLASP1-low Zellen mit Dox im Vergleich zu denen ohne Dox lag in allen drei Versuchen 12 Prozentpunkte unter der von T24shControl-low ( $p=0,0001$ ). Für T24shLASP1-high Zellen war die Proliferation im Vergleich zu T24shControl-high unverändert. Für sowohl "low" als auch "high" sortierte Zellen lag der KD bei ca. 50-70 %. T24 Zellen, die

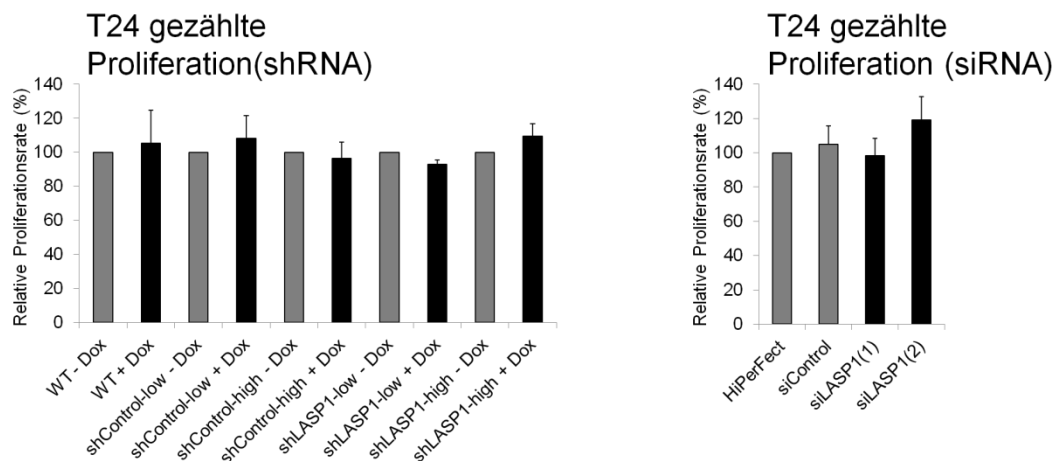
mit einer siRNA gegen LASP1 (hier siLASP1(1) genannt) transfiziert wurden, zeigten in zwei von drei Versuchen eine nicht signifikant verringerte Proliferation. In T24 Zellen, die mit einer anderen siRNA gegen LASP1 (siLASP1(2)) transfiziert wurden und einen besseren KD aufwiesen, war kein Effekt des LASP1-KD auf die Proliferation detektierbar (Abb. 29, rechts).

In der gezählten Proliferation konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 30).

Insgesamt zeigen diese Auswertungen einen geringen proliferationshemmenden Effekt von Dox, aber keine konstante Veränderung der Proliferation durch LASP1-KD.

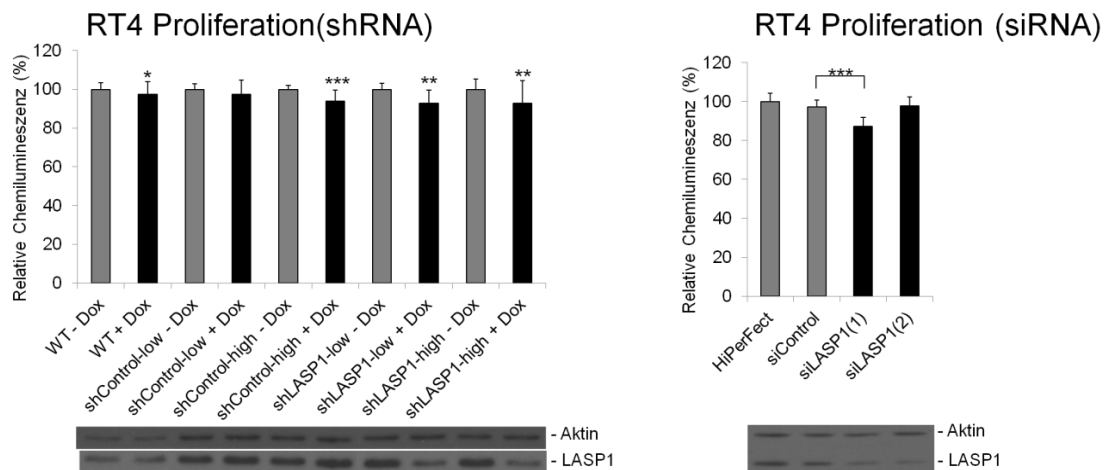


**Abb. 29: Dox verringert die Proliferation von T24 Zellen; LASP1-KD hat keinen einheitlichen Effekt auf Proliferaion im metabolischen Assay.** Links ist die Proliferation im metabolischen Assay der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert des Lumineszenz-Signals nach 4-5 Tagen Proliferation von 5.000 Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Sterne auf den Balken geben die Signifikanz verglichen zur jeweiligen Kontrolle an, Sterne auf Klammern die Signifikanz zwischen den Enden selbiger. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt. n>=3; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

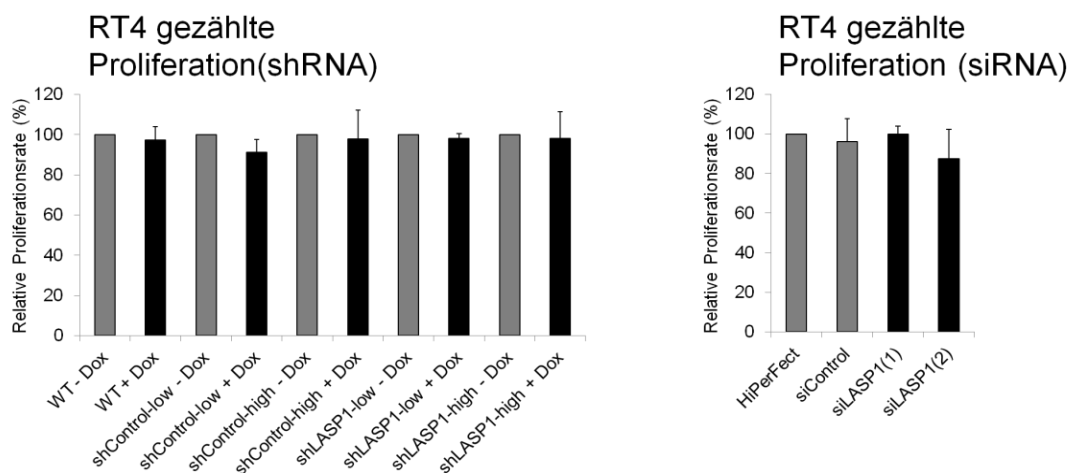


**Abb. 30: LASP1-KD hat keinen Effekt auf gezählte Proliferation in T24 Zellen.** Links ist die gezählte Proliferation der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Anzahl Zellen nach 5 Tagen Proliferation von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Hier keine Darstellung von Western Blots, da dieselben Proben für Adhäsionsassays verwendet wurden und der KD bereits dort validiert wurde. n>=3.

Auch für RT4 Zellen ergab sich im metabolischen Assay eine signifikant verringerte Proliferation von mit Dox inkubierten Zellen um 2,5-7 % verglichen mit denselben Zellen ohne Dox Behandlung, außer bei RT4shControl-low. Dieser Effekt war für alle Replikate konstant, außer beim Wildtyp. Für shLASP1-transduzierte Zellen mit Dox verglichen mit den shControl-transduzierten Zellen mit Dox konnte kein Unterschied in der Proliferation detektiert werden bei einem durchschnittlichen LASP1-KD von 40-60 % (Abb. 31, links). Nur für eine siRNA gegen LASP1 zeigte sich eine verringerte Proliferation unter LASP1-KD (10 %, p<0,001) (Abb. 31, rechts). In den gezählten Proliferationsassays konnten keine Unterschiede zwischen den Zellen mit und ohne KD detektiert werden (Abb. 32). Entsprechend kann auch für RT4 von einer geringen, in gezählten Assays daher nicht gut darstellbaren, Proliferationshemmung durch Doxycyclin ausgegangen werden, während LASP1-KD, zumindest in dem hier erreichten Ausmaß, keinen Effekt auf die Proliferation der hier verwendeten TCC-Zelllinien hat.



**Abb. 31: Dox verringert die Proliferation von RT4 Zellen, LASP1-KD hat keinen einheitlichen Effekt auf Proliferaion im metabolischem Assay.** Links ist die Proliferation im metabolischem Assay der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert des Lumineszenz-Signals nach 4-5 Tagen Proliferation von 4.000 Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Sterne auf den Balken geben die Signifikanz verglichen zur jeweiligen Kontrolle an, Sterne auf Klammern die Signifikanz zwischen den Enden selibger. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt.  $n \geq 3$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abb. 32: LASP1-KD hat keinen Effekt auf gezählte Proliferation in RT4 Zellen.** Links ist die gezählte Proliferation der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Anzahl Zellen nach 5 Tagen Proliferation von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Hier keine Darstellung von Western Blots, da dieselben Proben für Adhäsionsassays verwendet wurden und der KD bereits dort validiert wurde.  $n \geq 3$ .

Eine weitere Methode, in der mitunter die Proliferation bestimmt wird, aber auch ein weiterer Parameter für Tumoraggressivität, ist der Klonogenitätsassay. Hierbei wird eine geringe Zellzahl in Kulturplatten ausgesät. Durch die geringe Anzahl an Zellen muss jede einzelne für sich alleine die Fähigkeit besitzen, zu adhären und zu wachsen, muss also ohne direkte parakrine Signale eine Kolonie bilden können. Die Kolonienbildung aus einer Einzelzelle ist etwa bei der Metastasenbildung relevant. Die Größe der entstehenden Kolonien weist auf die Proliferation hin. Die Auswertung erfolgt durch Fixierung und Anfärben der Kolonien. Daraufhin kann die Kolonienzahl (Klonogenität) und die Koloniengröße (Proliferation) bewertet werden.

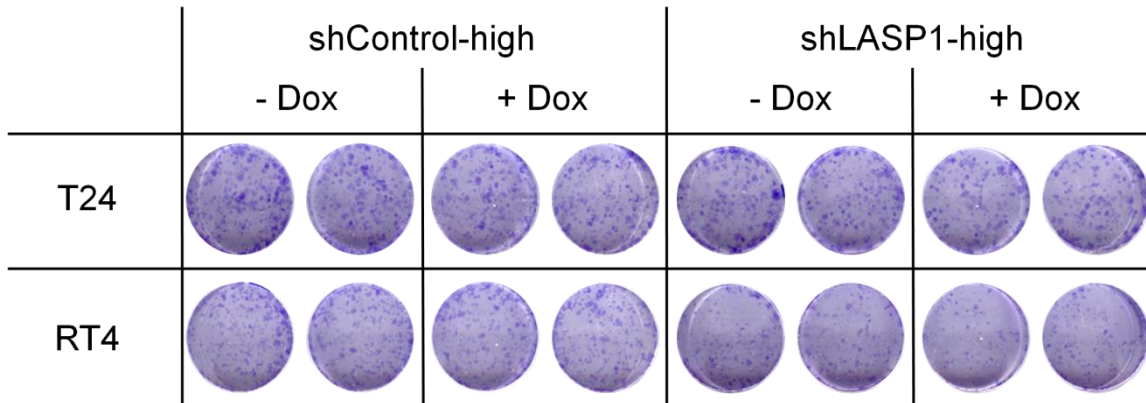
Unerwarteterweise zeigten T24 und RT4 Zellen in einem Teil der Assays bei höherer ausgesäter Zellzahl weniger Kolonienbildung und Wachstum als bei niedrigerer. Solche Assays wurden als unplausibel erachtet.

In den zwei Assays, die durch einheitliche technische Replikate am glaubwürdigsten erschienen, konnte für die lentiviral transduzierten T24 und RT4 Zellen kein Effekt durch Dox oder durch die Aktivierung eines LASP1-KDs durch Dox erkannt werden (Abb. 33).

Hierbei ist anzumerken, dass beide Zelllinien mehr in die Breite wachsen, anstatt dicht als Kolonien. Dies verringert die Färbeintensität, weshalb automatische Auswertung und genauere Bestimmung der Kolonienzahl und -Größe nicht möglich waren.

Außerdem wurde das Medium während des Assays nicht gewechselt, um ein Abschwimmen der Kolonien zu vermeiden. Entsprechend war nur noch für T24shLASP1-high Zellen am Ende des Assays ein KD von 20-40 % nachweisbar.





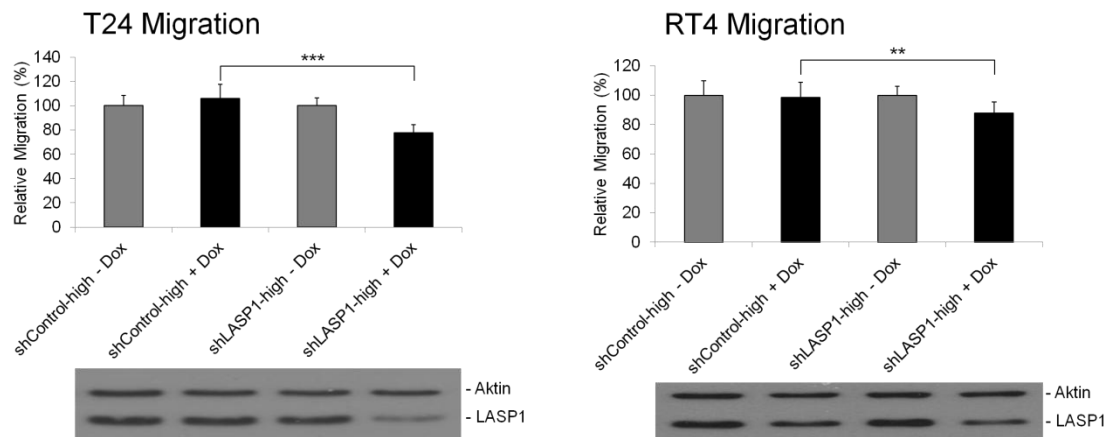
**Abb. 33: Dox und LASP1-KD zeigen keinen Effekt auf Klonogenität von T24 und RT4.** Exemplarische Darstellung von Wells mit durch Kristallviolett gefärbten Kolonien von shControl-high (links) und shLASP1-high (rechts) T24 (oben) und RT4 (unten) Zellen. 1.000 Zellen wurden ausgesät, Auswertung nach 6 Tagen.

### 3.6. Funktionelle Analyse der Auswirkung von LASP1-KD auf Migration von Blasenkarzinomzelllinien: LASP1-KD reduziert Migration

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Tumoraggressivität ist die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen. Im Prozess der hämatogenen Metastasierung müssen Zellen bei der Intra- und Extravasation durch eine Membran migrieren können.

Um den Effekt von LASP1-KD auf die Migration von T24 und RT4 Zellen zu evaluieren, wurden shControl-high- und shLASP1-high-transduzierte und sortierte Zellen jeweils mit und ohne vorherige Inkubation mit Doxycyclin in Transwell-Kammern ausgesät. Als chemotaktisches Signal wurde FCS verwendet. Die durch die Membran migrierten Zellen wurden durch Kristallviolettfärbung quantifiziert.

Sowohl für T24shLASP1-high, als auch für RT4shLASP1-high zeigte sich eine signifikant verringerte Migration im Vergleich zu den Kontrollen bei LASP1-KD (Reduktion um 22 % und 12 %,  $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,005$ , LASP1-KD jeweils um 40-50 %) (Abb. 34). Dieser Phänotyp war konsistent über alle drei biologischen Replikate.



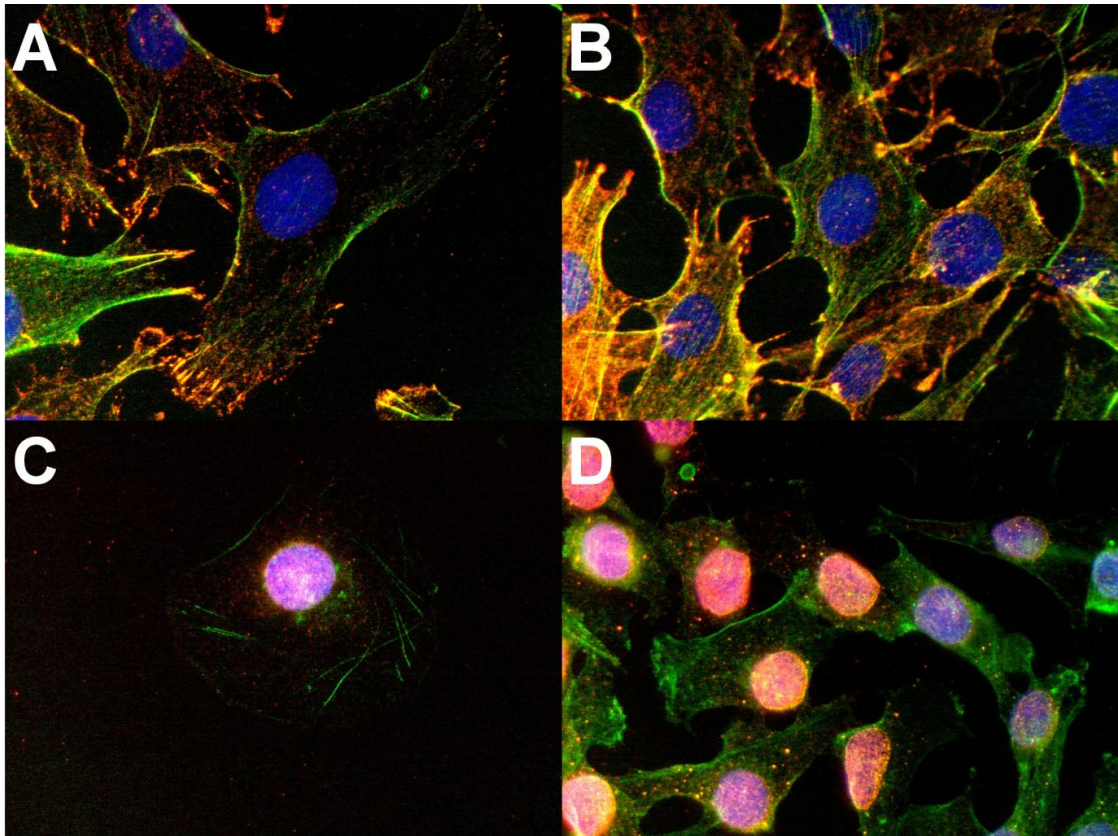
**Abb. 34: LASP1-KD reduziert die Migration von T24 und RT4 Zellen.** Links Mittelwerte für Migration relativ zur Kontrolle ohne Dox für transduzierte und "high" sortierte T24 Zellen, rechts für RT4 Zellen als Balkendiagramme aufgetragen. Fehlerindizes geben Standardabweichung an, graue Balken repräsentieren Zellen ohne Dox, schwarze mit Dox Inkubation. Sterne über Klammern geben die Signifikanz eines Unterschiedes zwischen den Enden an. Darunter exemplarische Western Blots für die darüber bezeichneten Proben mit Aktin und LASP1. n=3; \*\* p>0,01; \*\*\* p<0,001.

### 3.7. LASP1 ist auch in Blasenkarzinomzelllinien nukleär lokalisiert

Der Mechanismus, wie LASP1 das Verhalten eines Tumors beeinflusst, ist nicht vollständig geklärt. Es gibt aber mehr und mehr Hinweise dafür, dass der Mechanismus mit einer nukleären Lokalisation von LASP1 in Zusammenhang steht, die bereits für diverse Krebsentitäten bestätigt wurde (Grunewald *et al.*, 2007b; Traenka *et al.*, 2010; He *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013a; Hailer *et al.*, 2014). Um festzustellen, ob der hier identifizierte Effekt von LASP1 auf Migration auch durch nukleäre LASP1-Lokalisation und dortige Interaktionen begründet sein könnte, wurde getestet, ob auch in den hier verwendeten TCC-Zelllinien LASP1 nukleär vorhanden ist.

Im ersten Schritt wurden hierfür T24 und RT4 Zellen auf einem Objektträger fixiert und immunhistochemisch LASP1 (gesamtes phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes LASP1), pLASP1 (an Serin-146 phosphoryliertes LASP1) und Aktin detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Es zeigte sich in der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung eine vorrangig cytosollische Verteilung des gesamten LASP1. Beim Erzeugen von Overlay-Bildern mit Aktin

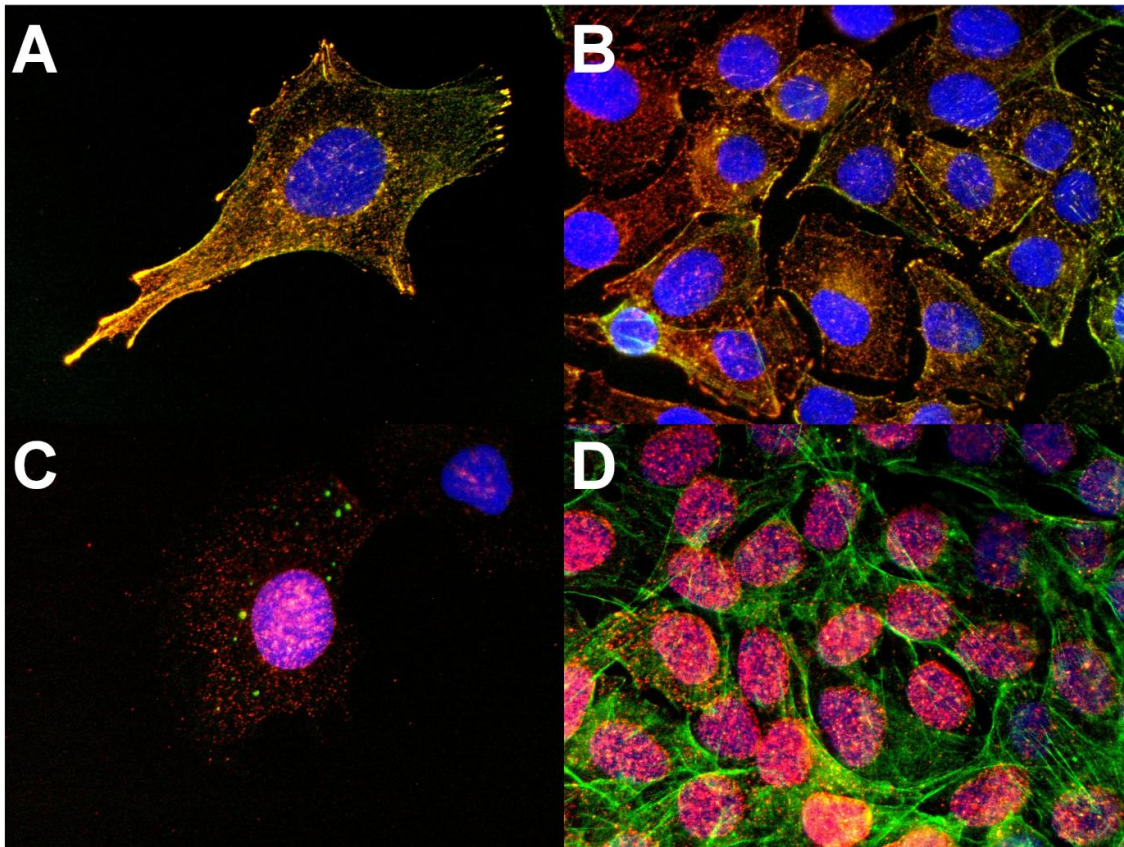
zeigten sich an Zellfortsätzen und der äußeren Zellmembran gelbe Strukturen, die auf eine Überlagerung und entsprechend eine Kolo­kalisierung von LASP1 (rot) und Aktin (grün) in diesen Bereichen hindeuten. Phosphoryliertes LASP zeigte sich hauptsächlich im Bereich des DAPI gefärbten Zellkerns (in der Überlagerung violett) (Abb. 35).



**Abb. 35: LASP1 erscheint prädominant cytosolisch lokalisiert und kolokalisiert mit Aktin an Zellfortsätzen; pLASP1 Färbung findet sich vor allem im Bereich des Zellkerns.** Überlagerung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von T24 Zellen als einzelne Zellen (A, C) und im als Zellverband (B, D). Zellkern mit DAPI blau gefärbt, Aktin grün (Oregon green), LASP1 (A, B) und pLASP1 (C, D) rot (Cy3).

Da Serin-146 phosphoryliertes LASP1 in den Zellkern wandert (Mihlan *et al.*, 2013), sind Unterschiede in der Verteilung von LASP1 abhängig vom Status der Phosphorylierung zu erwarten. Obwohl aber nach Behandlung mit Forskolin eine erhöhte und nach Hungern der Zellen über Nacht ohne FCS eine verringerte Phosphorylierung von LASP1 im Western Blot gesehen wurde, konnten diese Unterschiede nicht mikroskopisch bestätigt werden. So ist selbst

bei gehungerten Zellen eine deutliche Anfärbung des Zellkerns für pLASP1 vorhanden (Abb. 36).



**Abb. 36: Auch nach Hungern ohne FCS über Nacht zeigt sich die gleiche Verteilung von LASP1 und pLASP1 wie bei Wachstum in FCS (zum Vergleich Abb. 35).** Überlagerung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von über Nacht FCS gehungerten RT4 Zellen als einzelne Zellen (A, C) und im Verband (B, D). Zellkern mit DAPI blau gefärbt, Aktin grün (Oregon green), LASP1 (A, B) und pLASP1 (C, D) rot (Cy3).

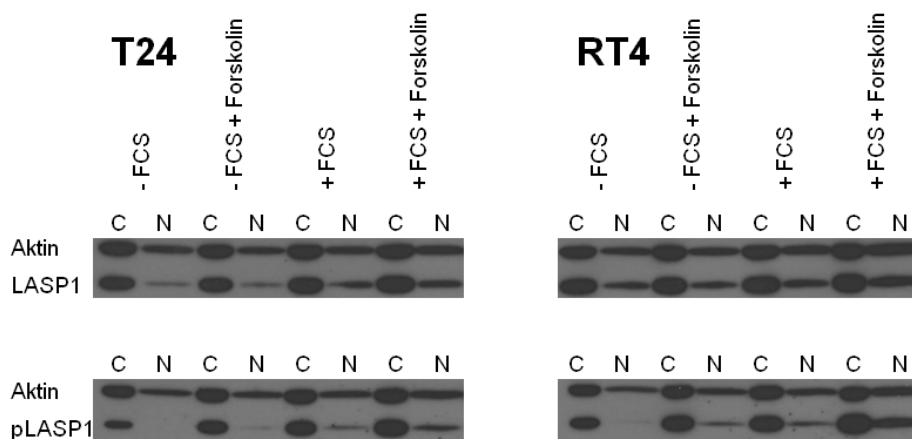
Da der verwendete LASP1-Antikörper das phosphorylierte und nicht-phosphorylierte LASP1 detektiert, wurde eine ähnlich starke nukleäre Anfärbung mit dem LASP1-Antikörper erwartet wie mit dem pLASP1-Antikörper. Jedoch war die nukleäre Färbung mit LASP1-Antikörper geringer als die nukleäre Färbung mit pLASP1-Antikörper. Folglich sollte eine unspezifische Kernfärbung durch den pLASP1-Antikörper ausgeschlossen werden. Noch dazu ist die Überlagerung der Kernfärbung und der pLASP1-Färbung angesichts dessen, dass kein Konfokal-Mikroskop verwendet wurde, nicht beweisend für die nukleäre Lokalisation von pLASP1. Daher sollte nach diesem hinweisenden

Ergebnis mittels Kern-Cytosol-Trennung die nukleäre LASP1-Lokalisation bestätigt werden.

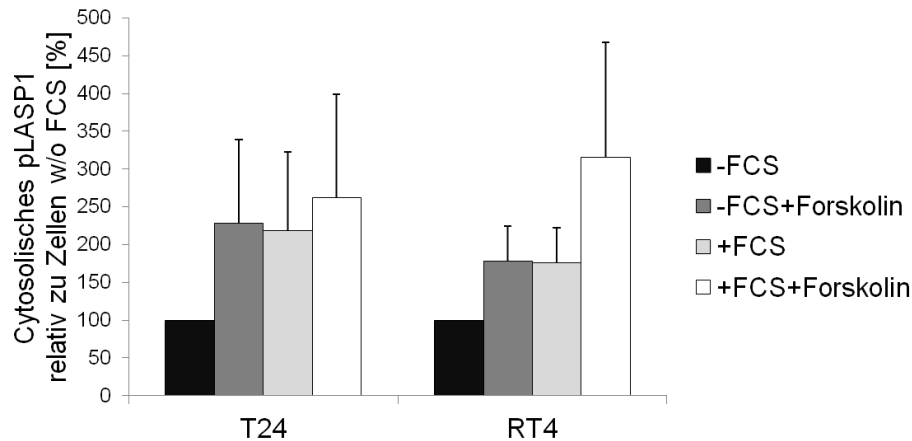
T24 und RT4 Zellen wurden hierzu verschieden stimuliert (kein FCS über Nacht, normal in FCS-Medium, gehungerte und nicht gehungerte Zellen mit 5  $\mu$ M Forskolin für 30 min), um verschiedene Level der LASP1-Phosphorylierung an Serin-146 zu erreichen. Danach wurde das nukleäre und cytosolische Kompartiment separiert, die Kompartimente in Lysis-Puffer aufgenommen und auf einen Western Blot aufgetragen.

Durch ein vorhandenes Lamin C-Signal und ein Fehlen eines GAPDH-Signals im nukleären Fragment wurde die Qualität der Separation geprüft.

Nukleäres LASP1 und pLASP1 war in beiden Zelllinien nachweisbar. In allen drei Replikaten beider Zelllinien bestätigte sich der vermutete Anstieg der cytosolischen LASP1 Phosphorylierung im Vergleich zu gehungerten Zellen durch Stimulation mit FCS und/ oder Forskolin. Die höchste Phosphorylierung wurde für die kombinierte Stimulation mit FCS und Forskolin gemessen (Abb. 37 und 38).



**Abb. 37: pLASP1 und LASP1 sind im nukleären Kompartiment nachweisbar in T24 und RT4 Zellen; Stimulation mit FCS und Forskolin führt zu erhöhtem cytosolischem pLASP1 und erhöhtem nukleärem LASP1 und pLASP1.** Western Blot für T24 (links) und RT4 (rechts). Banden zeigen abwechselnd das cytosolische (C) und nukleäre (N) Fragment nach Hungern (-FCS), Hungern und Stimulation mit Forskolin (+Forskolin), Stimulation mit FCS und Stimulation mit FCS und Forskolin. Oben sind Western Blots für Aktin und LASP1, unten für Aktin und pLASP1 dargestellt. Es wurde cytosolisches Lysat und nukleäres Lysat im Verhältnis 1:3 aufgetragen; nukleäres Kompartiment wurde zuvor im halben Volumen Lyse-Puffer im Vergleich zum cytosolischem Präparat aufgenommen.



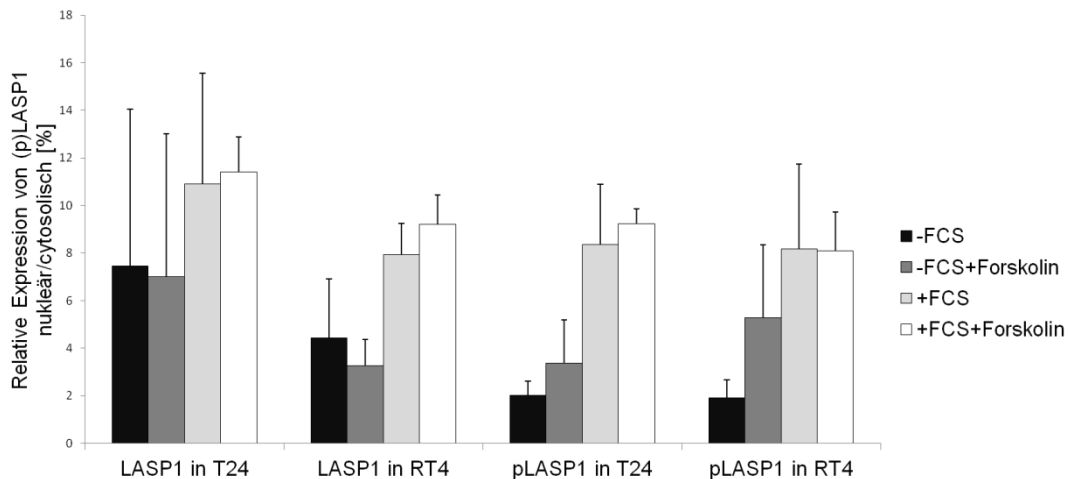
**Abb. 38: Stimulation von T24 und RT4 Zellen führt zu erhöhtem cytosolischem pLASP1.** Balkendiagramm basierend auf Western Blot Analysen für T24 und RT4 mit Darstellung des Mittelwertes des cytosolischen pLASP1 relativ zu dem in gehungerten Zellen. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung.

Mit vermehrter cytosolischer LASP1 Phosphorylierung stieg auch das nukleäre LASP1 im Verhältnis zum cytosolischen LASP1 von 7,5 % auf 11,4 % für T24 und von 4,4 % auf 9,2 % für RT4. Nach Normalisierung des nukleären pLASP1 mit dem gemessenen cytosolischen LASP1 (unter der Annahme, dass dies nur geringen Schwankungen bei der Stimulation unterliegt), zeigte sich ein signifikant höheres pLASP1 im Zellkern bei maximaler Stimulation im Vergleich zu gehungerten Zellen ( $p=0,015$  für T24, für RT4 ergab sich eine Tendenz mit  $p=0,076$ ). Der Anstieg des nukleären pLASP1 erfolgte dabei mit einem weit höheren Faktor als der von LASP1 (Faktor 8,72 und 11,1;  $p=0,088$  und  $0,046$  für T24 und RT4). Da entsprechend eine Verdopplung von pLASP1 im Zellkern nicht zu einer Verdopplung von LASP1 im Zellkern führt, muss das nukleär bestimmte LASP1 teilweise auch unphosphoryliertes LASP1 darstellen.

Interessanterweise steigt auch der Anteil von nukleärem zu cytosolischem pLASP1 bei zunehmender Stimulation der Zellen, von 2,0 % auf 9,2 % in T24 und von 1,9 % auf 8,1 % in RT4 (Abb. 39). Entsprechend liegt nicht immer derselbe Anteil pLASP1 aus dem Cytosol nukleär vor, sondern bei steigender LASP1-Phosphorylierung wandert pLASP1 vermehrt in den Zellkern. Der Anstieg des nukleären pLASP1-Anteils, ebenso wie des nukleären Gesamt-

LASP1 weist in T24 eine tendenzielle bzw. signifikante Korrelation mit dem cytosolischen pLASP1 auf ( $r=0,532$ ,  $p=0,075$  bzw.  $r=0.613$ ,  $p=0,034$ ).

Zusammenfassend konnte die nukleäre Lokalisation von LASP1 hier auch für TCC-Zelllinien gezeigt werden, ebenso wie dessen Abhängigkeit von der LASP1-Phosphorylierung.



**Abb. 39: Das nukleäre Gesamt-LASP1 und pLASP1 steigt mit zunehmender Stimulation von T24 und RT4 Zellen mit FCS und Forskolin im Verhältnis zum cytosolischen Gesamt-LASP1 bzw. pLASP1.** Balkendiagramme für den Anteil nukleären LASP1 (links) und nukleären pLASP1 (rechts) im Verhältnis zum jeweils cytosolischen in T24 und RT4. Verschiedene Grauschattierungen zeigen die Stimulation der Zellen an, Fehlerbalken die Standardabweichung;  $n=3$ .

### 3.8. LASP1 ist in Enrichment-Analysen im Blasenkarzinom mit Metastasierung assoziiert

Ein weiterer möglicher und aktuell im Mammakarzinom identifizierter Weg, wie LASP1 das Tumorverhalten beeinflusst, ist die Regulation von Matrixmetalloproteasen (MMP). Diese Regulation konnte sogar in T24 Zellen bestätigt werden (Endres *et al.*, 2016). Diskutiert wird eine Regulation des AP-1 Komplexes (c-Jun/c-Fos) durch LASP1, möglicherweise als Cofaktor der Transkription (Endres *et al.*, 2016). Daher sollte untersucht werden, ob auch in öffentlich zugänglichen Expressionsdaten ein Zusammenhang zwischen *LASP1* und MMPs-Expression im Blasenkarzinom besteht. Hierzu wurden die im The

Cancer Genome Atlas (TCGA) Projekt veröffentlichten mRNA-Expressionsdaten für das Blasenkarzinom heruntergeladen und zu einer Expressionstabelle mit 408 Tumoren konvertiert. Die Expressionsdaten wurden mit 1 addiert und log2 transformiert verwendet und die Korrelation von *LASP1*-Expression mit der von MMPs, *c-Jun* und *c-Fos* berechnet. Es zeigte sich keinerlei positive Korrelation mit *c-Jun* oder *c-Fos* Expression. Für *c-Fos* war sogar eine negative Korrelation signifikant ( $p=0,017$ ), allerdings mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von nur  $-0,118$ . Die einzige signifikant und positiv regulierte MMP von 23 getesteten war die MMP7 ( $r=0,173$ ,  $p=0,0005$ ). Entsprechend liefern diese Korrelationsdaten keine weitere Evidenz dafür, dass *LASP1* im Blasenkarzinom die Expression von MMPs via AP-1 Komplex steigert.

Ein weiteres bioinformatisches Verfahren, um mögliche Interaktionen und Phänotypen im Zusammenhang mit der Expression eines Gens zu identifizieren, stellen Enrichment-Analysen dar.

Daher wurde mit den gleichen Expressionsdaten wie bei der Betrachtung der MMPs eine Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) durchgeführt. Hierbei wurden alle Gene nach der Korrelation ihrer Expression mit *LASP1*-Expression geordnet. Danach wurde für jedes vordefinierte und mit einem Phänotyp annotierte Set von Genen getestet, ob die darin enthaltenen Gene eher positiv oder negativ mit *LASP1*-Expression korrelieren. Mit Gewichtung der Stärke der Korrelation ergibt sich dadurch der normalisierte Enrichment-Score (NES) als Maß dafür, ob *LASP1*-Expression mit denen Genen dieses Gen-Sets, und damit dessen Phänotyp, assoziiert ist.

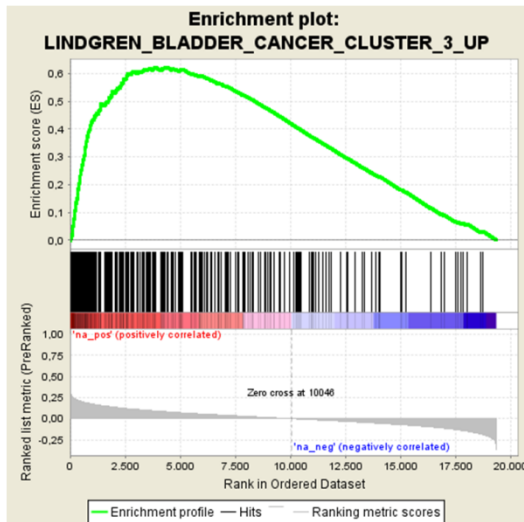
In der GSEA befanden sich unter den signifikant mit *LASP1*-Expression assoziierten Gen-Sets mehrmals solche mit Annotationen im Zusammenhang mit Zellzyklusprogression, Proliferation und Metastasierung ("CHANG\_CYCLING\_GENES", "ROSTY\_CERVICAL\_CANCER\_PROLIFERATION\_CLUSTER", "CHIANG\_LIVER\_CANCER\_SUBCLASS\_PROLIFERATION\_UP", "WINNEPENNINCKX\_MELANOMA\_METASTASIS\_UP" und weitere) (Abb. 40,



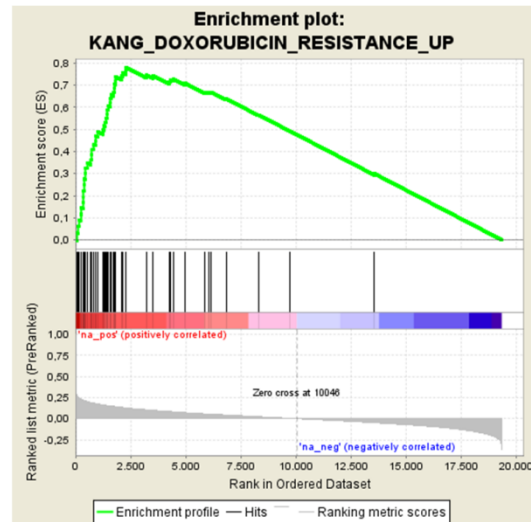
unten). Im Gegenzug war ein Gen-Set, das bei Metastasierung herunterreguliert ist, negativ mit *LASP1*-Expression korreliert ("JAEGER\_METASTASIS\_DN"). Die Validität dieser Analyse wurde bekräftigt durch die Identifikation eines Blasenkrebs-Clusters mit dem dritthöchsten NES (3,16; "LINDGREN\_BLADDER\_CANCER\_CLUSTER\_3\_UP") (Abb. 40, oben links). Ebenso erwähnenswert ist, dass anscheinend vor allem Gene in der Nachbarschaft vom genetischen *LASP1*-Locus co-reguliert sind: Das von Nikolsky *et al.* als "NIKOLSKY\_BREAST\_CANCER\_17Q11\_Q21\_AMPLICON" beschriebene Gen-Set (Nikolsky *et al.*, 2008) erreichte einen NES von 2,69, wobei *LASP1* selbst auf Chromosom 17q12 lokalisiert ist.

Ebenso bemerkenswert ist die Korrelation mit "KANG\_DOXORUBICIN\_RESISTANCE\_UP" (Abb. 40, oben rechts), da Doxorubicinhydrochlorid in einer Kombinationschemotherapie bei invasivem TCC Anwendung findet (Witjes *et al.*, 2017). In dieser Studie wurde die Genexpression von Doxorubicin resistenten versus sensitiven Magenkrebszelllinien verglichen (Kang *et al.*, 2004).

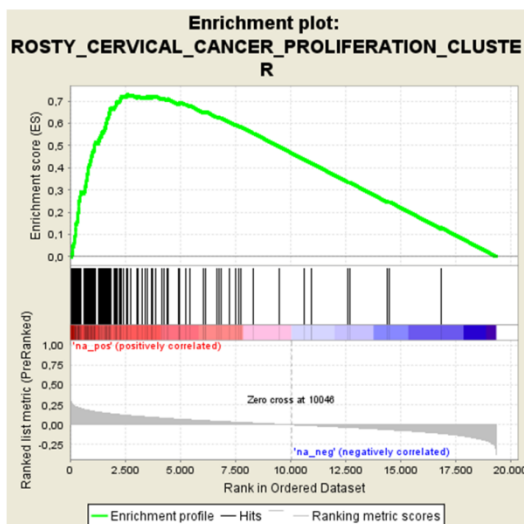
Entsprechend konnte mit der GSEA ein möglicher Zusammenhang von *LASP1* und Proliferation und Metastasierung gezeigt werden, ein möglicher Mechanismus hinter diesen Phänotypen jedoch nicht.



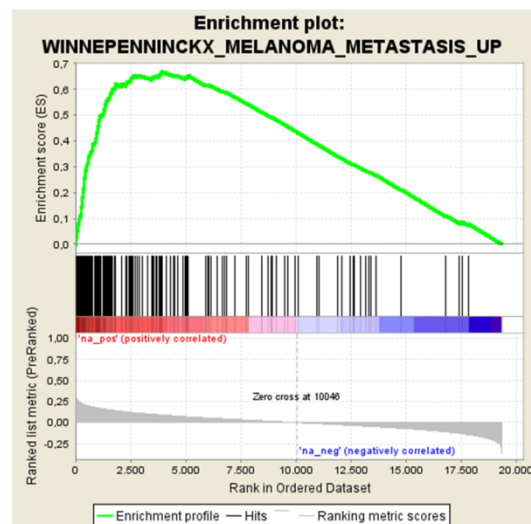
NES 3,160; FWER p-Val<0,001



NES 2,983; FWER p-Val<0,001



NES 3,331; FWER p-Val<0,001



NES 3,076; FWER p-Val<0,001

**Abb. 40: *LASP1*-Expression erscheint in der GSEA mit Proliferation, Metastasierung und Doxorubicin-Resistenz assoziiert.** Dargestellt sind exemplarische GSEA für verschiedene Gen-Sets, die im jeweiligen Titel angegeben sind. Von rot nach blau sind die *LASP1* co- bis antikorrelierten Gene aufgetragen, jeder schwarze Balken steht für ein Gen im Spektrum der korrelierten Gene, das auch im Gene-Set vorhanden ist. An jeder Position von links nach rechts nimmt der Enrichment-Score bei einem solchen Treffer zu, gewichtet nach Korrelation, sonst fällt er ab. Daraus ergibt sich der NES, der mit dem für multiples Testen korrigiertem p-Value unter den jeweiligen Analysen angegeben ist.

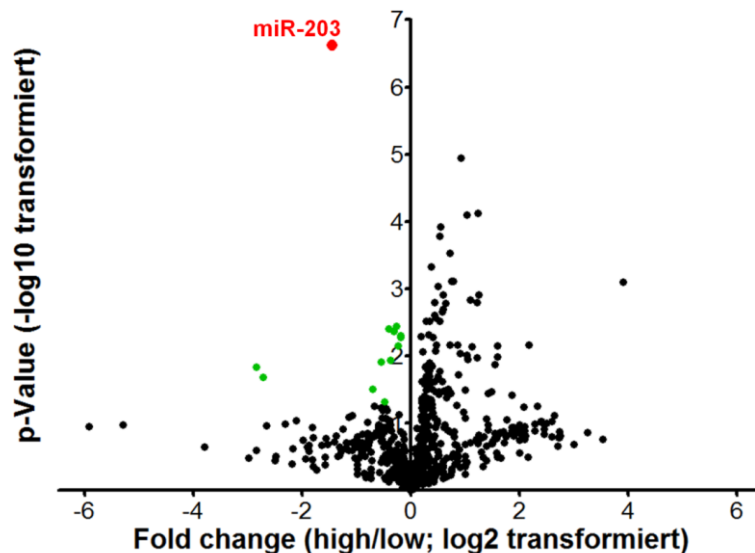
Als weitere Enrichment-Analyse wurde eine Gene Ontology-Analyse mittels PANTHER overrepresentation Test (veröffentlicht 15.07.2016) und Annotation durch GO Ontology database (veröffentlicht 28.02.2017) durchgeführt. Hier wird die überzufällige Häufung von gleich bzw. ähnlich annotierten Genen in dem zu

untersuchenden Pool von Genen bestimmt. Hierzu wurden die Top 5 % der positiv und negativ *LASP1* co-regulierten Gene verwendet und nach einem signifikanten Enrichment in biologischen Prozessen, molekularen Funktionen und zellulärer Lokalisation gesucht. Es zeigte sich ein signifikantes Enrichment für im Rahmen der Mitose relevante biologische Prozesse wie Schwesterchromatid-Kohäsion, Chromosomen-Segregation und Zellkernteilung. Passend zur physiologischen *LASP1*-Funktion ergab sich auch eine Signifikanz in der molekularen Funktion der Aktin- und cytoskeletalen Proteinbindung. Die Gene Ontology-Analyse weist daher darauf hin, dass die Interaktionsfähigkeit von *LASP1* mit cytoskeletalen Proteinen Grundlage für die Effekte von *LASP1* in Tumorzellen sein könnte.

### **3.9. *LASP1*-Expression wird im Blasenkarzinom durch miR-203 reguliert**

Wesentlich besser verstanden als der Mechanismus, über den *LASP1* das Tumorverhalten moduliert, ist die Regulation von *LASP1* selbst. Heute existiert eine substantielle Evidenz für eine Regulation von *LASP1* durch microRNAs (miR) in diversen Krebsentitäten, wie zum Beispiel im Mammakarzinom (Wang *et al.*, 2012). Daher sollte mit Hilfe von TCGA-Daten zu miR-Expression im Blasenkarzinom und *LASP1*-mRNA-Expression die mögliche Regulation von *LASP1* mRNA durch miR evaluiert werden. Hierzu wurden die Counts jeder miR in Patienten mit hoher und niedriger *LASP1*-Expression verglichen (aufgetrennt nach medianer Expression). Da miRs Genexpressionen herunterregulieren, wurden nur solche miRs als potentielle Regulatoren von *LASP1* betrachtet, die signifikant niedriger in *LASP1* hoch exprimierenden Patienten gezählt wurden. Unter 722 im Blasenkarzinom exprimierten miRs erfüllten nur 14 miRs diese Kriterien. Die miR mit der höchsten Signifikanz und der höchsten negativen Korrelation mit *LASP1*-Expression war miR-203 ( $p=0,0000002$ ,  $r=-0,311$ ) (Abb. 41), welche bereits in anderen Tumorentitäten wie dem Prostatakarzinom als *LASP1* regulierend beschrieben wurde (Hailer *et al.*, 2014). Für die weiteren miRs ist keine Interaktion mit *LASP1* bekannt.

Zusammenfassend ergab die bioinformatische Analyse einer potentiellen Regulation der *LASP1*-Expression durch miRs im Blasenkarzinom, dass die *LASP1*-Expression am wahrscheinlichsten durch miR-203 reguliert wird.



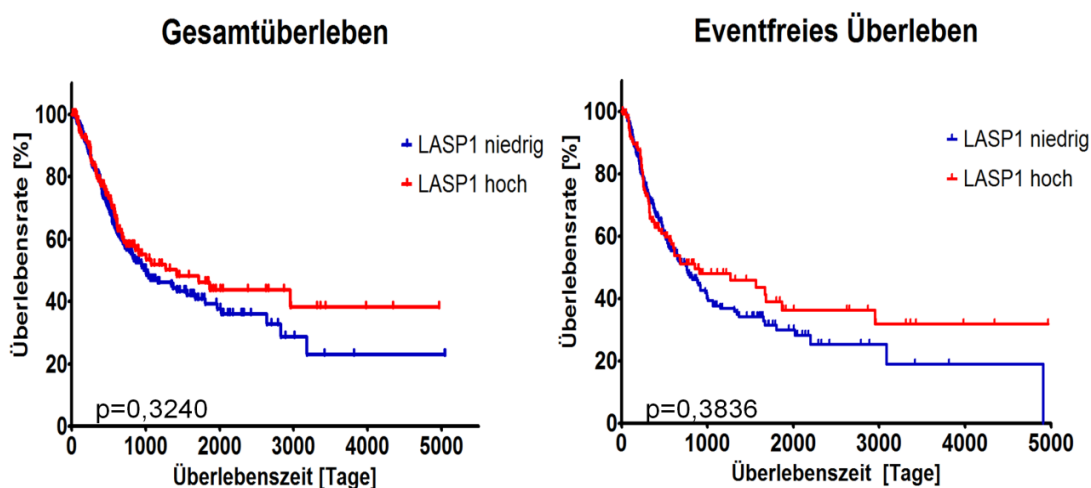
**Abb. 41: miR-203 ist hochsignifikant negativ korreliert mit *LASP1*-Expression im Blasenkarzinom.** Auf der x-Achse des Volcano-Plots ist der log<sub>2</sub>-transformierte Fold-Change zwischen den Counts einer bestimmten miR in der Hälfte der Patienten mit höherer *LASP1*-Expression vs. der Hälfte mit niedrigerer aufgetragen, auf der y-Achse der negative 10er Logarithmus des p-Values für einen Unterschied im miR-Count in Patienten mit hoher und niedriger *LASP1*-Expression. Jeder Punkt repräsentiert eine miR, grün markiert sind solche mit signifikanter negativer Korrelation mit *LASP1*-Expression, rot miR-203.

### 3.10. In TCGA-Daten zum Blasenkarzinom ist keine klinische Relevanz der *LASP1*-Expression ersichtlich

Das TCGA Projekt bietet, neben den mRNA-Expressionsdaten zu über 20.000 Genen in etwa 30 Tumorentitäten, auch klinische Annotationen der Tumoren - für das Blasenkarzinom in über 400 Fällen. Diese Daten sollten genutzt werden, um die klinische Relevanz von *LASP1* im Blasenkarzinom zu bewerten.

Hierzu wurden zuerst die 33 % der Patienten mit der höchsten *LASP1*-Expression auf mRNA Level in der Gruppe "LASP1 hoch" zusammengefasst, die übrigen in "LASP1 niedrig". Beim Vergleich des Gesamtüberlebens dieser beiden Gruppen ergab sich kein signifikanter Überlebensvorteil für eine der

Gruppen (Abb. 42, links). Auch beim Vergleich des eventfreien Überlebens (weder Tod, noch Rezidiv, Metastase oder Zweitkarzinom) konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 42, rechts).



**Abb. 42: *LASP1* hoch exprimierende Patienten zeigen keinen Überlebensvorteil oder Nachteil im Gesamt- und eventfreiem Überleben.** Kaplan-Meier-Plots für Gesamtüberleben (links) und eventfreies Überleben (rechts). Auf der x-Achse ist die Überlebenszeit, auf der y-Achse die Rate noch Überlebender zum jeweiligen Zeitpunkt aufgetragen. *LASP1* hoch exprimierende Patienten (Top 33%) sind im roten Graph dargestellt, die anderen im blauen Graph. Der p-Value wurde mit dem Mantel-Haenszel-Test berechnet.

Interessanterweise wurden bei Betrachtung aller 20 weiteren Karzinome im TCGA-Datenset im Hinblick auf Gesamtüberleben bei gleicher Auftrennung in hoch und niedrig *LASP1* exprimierende Patienten nur drei Signifikanzen für schlechteres Überleben bei hoher *LASP1*-Expression berechnet: Im hepatozellulären Karzinom ( $p=0,015$ ), Lungenadenokarzinom ( $p=0,034$ ) und Ovarialkarzinom ( $p=0,027$ ).

Im Weiteren wurde der Zusammenhang der *LASP1*-Expression mit Tumorparametern validiert, dem TNM-Stadium und dem Tumorstadium (gemäß des American Joint Committee on Cancer). Hierzu wurden alle Patienten, für welche Informationen zum jeweiligen Tumorparameter und zur *LASP1*-Expression verfügbar waren, anhand der medianen *LASP1*-Expression in zwei Gruppen aufgetrennt. Danach wurde die Häufigkeitsverteilung der Ausprägungen jedes Tumorparameters in den beiden Gruppen verglichen. Das

Signifikanzniveau für eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung wurde bei 2x2 Kontingenztabellen mittels Fisher-Exact Test, sonst mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (unter Verwendung des online-Rechners auf <http://www.socscistatistics.com>). Es ergaben sich keinerlei Signifikanzen (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Zwischen Patienten mit niedriger und hoher *LASP1*-mRNA-Expression im TCGA Blasenkarzinomdatenset besteht kein signifikanter Unterschied in den klinischen und pathologischen Tumorparametern.** Patienten wurden nach medianer *LASP1*-mRNA-Expression in zwei Gruppen aufgetrennt und die Häufigkeit jeder links angegebenen Ausprägung eines Tumorparameters gezählt. Rechts die Angabe der Signifikanz, berechnet mit Fisher-Exakt Test (FE) oder Mann-Whitney-U-Test (MWU).

	<b>LASP1_low</b>	<b>LASP1_high</b>	
<b>T-Stadium</b>			p=0,857
T1	1	2	(MWU)
T2	59	61	
T3	98	98	
T4	29	30	
<b>Nodalstatus</b>			p=0,522
N0	114	125	(MWU)
N1	26	21	
N2	41	35	
N3	2	6	
<b>Metastasierung</b>			p=0,373
M0	96	100	(FE)
M1	7	4	
<b>Tumorstadium</b>			p=0,490
Stage I	1	1	(MWU)
Stage II	64	66	
Stage III	66	74	
Stage IV	72	62	
<b>Neues Tumorevent</b>			p=1
Ja	98	99	(FE)
Nein	84	84	

Insgesamt konnte in den TCGA-Daten für das Blasenkarzinom kein signifikanter Zusammenhang der *LASP1*-Expression auf mRNA Level mit einem Tumorparameter oder mit Überleben bestimmt werden.

### **3.11. Die generierten induzierbar shLASP1 und shControl exprimierenden Zellen weichen in ihrem Proliferationsverhalten von wildtypischen Zellen ab und verlieren ihr Fluoreszenzsignal**

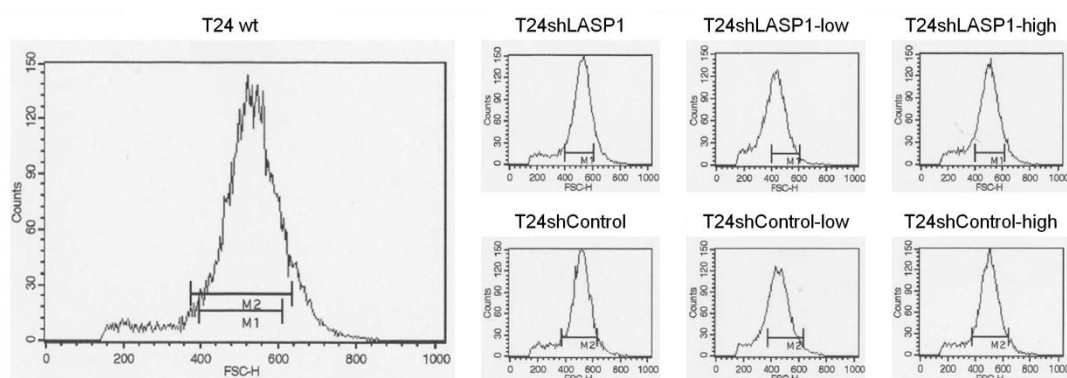
Die bioinformatischen Hinweise auf eine Rolle von *LASP1* in Proliferation und Metastasierung im Blasenkarzinom und die Arbeit von Chiyomura *et al.* (Chiyomaru *et al.*, 2012) stehen teils im Kontrast mit den lediglich geringen Effekten von *LASP1*-KD auf Migration in den eigenen Ergebnissen mit den selbst generierten induzierbar shLASP1 exprimierenden Zellen. Angesichts dessen sollten diese Zellen genauer untersucht werden, ob sie valide Modelle für die Evaluation der Rolle von *LASP1* im TCC darstellen.

Hierzu sollte zuerst betrachtet werden, ob die Zellen durch die lentivirale Transduktion und das Sortieren in ihrem Verhalten von wildtypischen Zellen abweichen, es daher zu Dysregulationen gekommen sein könnte, die wiederum einen Effekt von *LASP1* maskieren könnten. Als erstes und schnelles Verfahren wurde in der Durchflusszytometrie die Größe der Zellen verglichen. Für wildtypische, transduzierte und transduzierte und sortierte Zellen wurden 20.000 Zellen gezählt unter Ausschluss avitaler Zellen durch entsprechendes Setzen eines Gates. Für T24shLASP1-high und T24shControl-high wurde um den Peak ein Markerbereich gesetzt, der 80% aller Zellen erfasst. Beim Vergleich der Lage dieses Markerbereichs in den verschiedenen Zellen fiel auf, dass die "low" sortierten Zellen kleiner waren als die "high" sortierten Zellen. Die wildtypischen und lentiviral transduzierten, aber nicht-sortierten Zellen wiesen eine Größenverteilung auf, die den "high" sortierten Zellen ähnlicher war als den "low" sortierten (Abb. 43). Die Messung wurde für wildtypische T24 wiederholt, wobei die mediane Zellgröße mit nur geringen Schwankungen der

medianen Zellgröße in vorherigen Messungen entsprach, weshalb diese Ergebnisse als voraussichtlich reproduzierbar betrachtet werden können.

Auch für RT4shLASP1 Zellen waren "high" sortierte Zellen größer als die "low" sortierten. Dieses Ergebnis war für RT4shControl-high inkonsistent, weshalb die Messung zweimalig wiederholt wurde. In zwei der drei Versuche waren auch hier die "high" sortierten Zellen größer. Die wildtypischen RT4 Zellen und die lentiviral transduzierten und nicht-sortierten Zellen wiesen eine Größenverteilung ähnlich den "high" sortierten Zellen auf.

Um die Glaubwürdigkeit dieser Analyse zu bekräftigen, wurde der Proteingehalt der Zellen mittels BCA-Assay verglichen. Es konnte hierbei kein Unterschied im Proteingehalt festgestellt werden. Da sich die beiden Verfahren also nicht bestätigen, wurden diese nicht weiterverfolgt. Stattdessen wurde der Fokus mehr auf das Verhalten der Zellen gelegt.

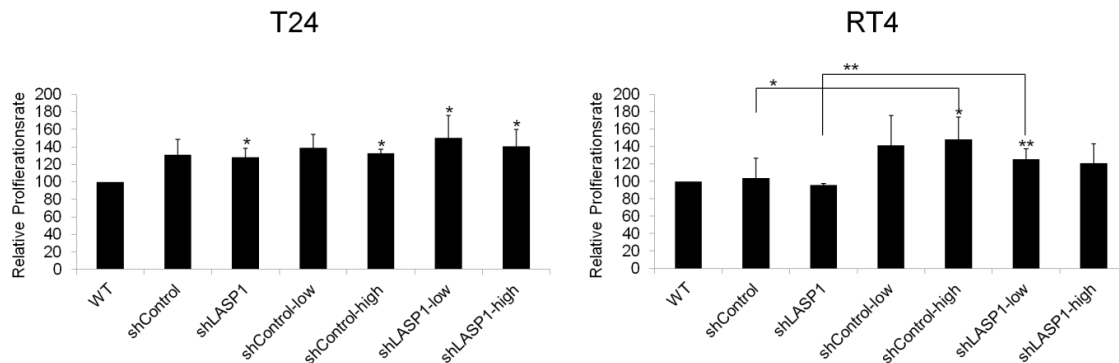


**Abb. 43: "Low" sortierte T24 Zellen erscheinen kleiner als "high" sortierte, nicht-sortierte transduzierte und wildtypische T24 Zellen in der Durchflusszytometrie.** Dargestellt sind die Counts für die verschiedenen Zellgrößen (FSC-H). M1 umfasst 80% aller T24shLASP1-high, M2 80% aller T24shControl-high Zellen.

Hierzu wurde eine gezählte Proliferation aller wildtypischer, transduzierter und sortierter T24 und RT4 Zellen durchgeführt mit  $2,5-3,2 \times 10^5$  Zellen und einer Proliferationszeit von 3 Tagen auf T25 Kulturflaschen. Es zeigte sich bei mehreren transduzierten Zellen eine signifikant gesteigerte Proliferation der transduzierten Zellen verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 44). Dieser Phänotyp war über alle drei Replikate konsistent. Für RT4 konnte auch eine Zunahme der



Proliferation nach Sortieren der Zellen für RT4shControl-high und RT4shLASP1-low gezeigt werden.



**Abb. 44: Lentivirale Transduktion, Selektion und Sortieren verändern das Proliferationsverhalten von T24 und RT4 Zellen.** Dargestellt sind die Proliferationsraten nach drei Tagen relativ zu der Proliferationsrate wildtypischer Zellen für T24 (links) und RT4 (rechts) als Balkendiagramme. Sterne zeigen das Signifikanzniveau einer veränderten Proliferationsrate im Bezug auf wildtypische Zellen bzw. die entsprechenden nicht sortierten Zellen (Markierung des Bezugs mit Klammern). Signifikanz wurde mittels gepaartem zweiseitigem t-Test auf Basis der Proliferationsraten berechnet. n=3; \* p<0,05; \*\* p<0,01.

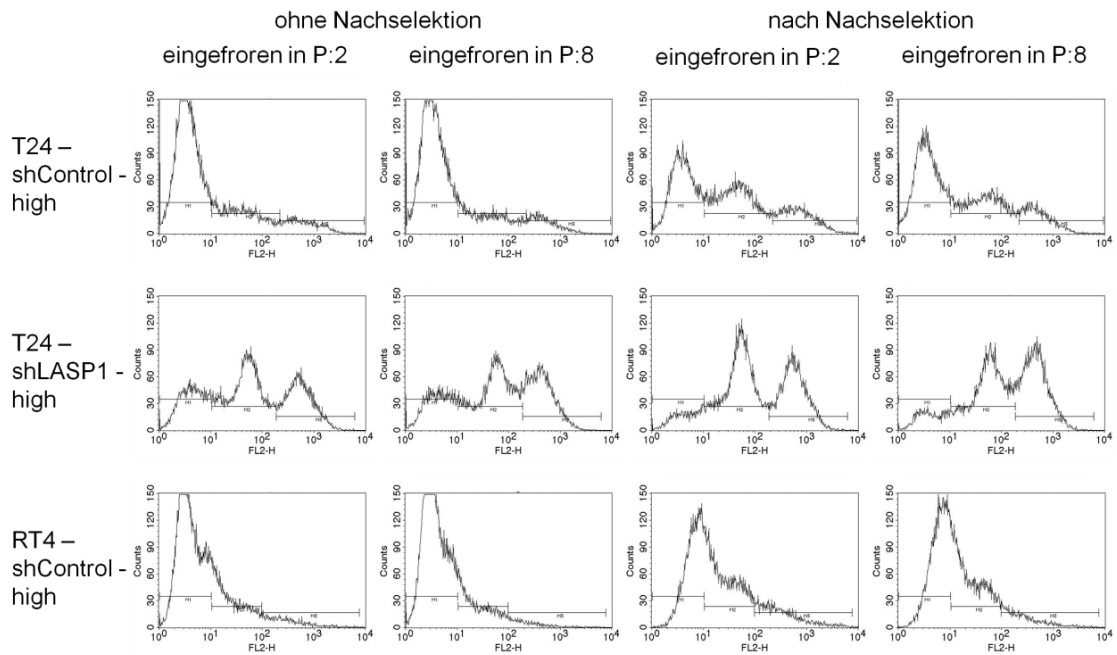
Entsprechend ist davon auszugehen, dass bereits die lentivirale Transduktion, die Selektion und das Sortieren das Proliferationsverhalten von Zellen verändert, derart prozessierte Zellen also von wildtypischen auch ohne aktiviertes shRNA Konstrukt im Verhalten abweichen und daher eventuell kein optimales Modell für den Effekt eines LASP1-KDs im TCC darstellen.

Zuletzt kann noch in Betracht gezogen werden, dass der LASP1-KD, der selten 50 % überstieg, nicht für die Ausprägung eines Phänotyps genügte. Als mögliche Ursache des geringen LASP1-KD wurden, neben einer insuffizienten shRNA, eine zu geringe Expression der shRNA bzw. Verlust der genomisch integrierten shRNA-Sequenz über die Zeit erwogen. Da die shRNA-Expression mit der von tRFP einhergeht, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierzu wurden exemplarisch T24shControl-high, T24shLASP1-high und RT4shControl-high Zellen teilweise für 4 Tage mit Puromycin nachselektiert, jeweils ein Aliquot eingefroren, die übrigen Zellen weitere sechs Passagen prozessiert und dann eingefroren. Alle Zellen wurden gleichzeitig wieder

aufgetaut, für 5 Tage mit und ohne 0,5 µg/ml Dox inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer bezüglich ihrer Fluoreszenz analysiert. Durch die nicht mit Dox behandelten Zellen konnte ein Markerbereich für "keine Fluoreszenz" (99 % aller nicht Dox behandelten Zellen enthaltend) gesetzt werden. Entsprechend sich abzeichnender Populationen wurden weitere Markerbereiche für niedrige und hohe Fluoreszenz gesetzt.

Bei allen Linien war der Anteil von Zellen ohne Fluoreszenz nach Nachselektion deutlich verringert, während umgekehrt der Anteil Zellen mit niedriger und hoher Fluoreszenz zunahm (Abb. 45). Für die shControl-transduzierten Zellen zeigte sich nach den sechs weiteren Passagen bis zum Einfrieren der Zellen ein Abfall des Anteils von Zellen im Markerbereich "low" und "high" und damit einhergehend eine Zunahme des Anteils von Zellen im Markerbereich "no". Für shLASP1-transduzierte Zellen blieb der Anteil von "high" und "low" sortierten Zellen über sechs Passagen konstant. Die shLASP1-transduzierten Zellen wiesen zusätzlich einen geringeren Anteil nicht fluoreszierender Zellen auf als die shControl-transduzierten (Abb. 45, Tabelle 4). Allerdings wurden für alle hier gemessenen Linien keine Zellen im Markerbereich "no" erwartet, da die Linien durch Auswahl von Zellen mit hoher Fluoreszenzintensität generiert wurden.

Zusammenfassend scheinen die transduzierten Zellen ihr Fluoreszenzsignal, und damit wahrscheinlich auch die shRNA-Expression zu verlieren, was durch Nachselektion der Zellen wieder kompensierbar wäre - allerdings dem Ziel einer stabilen, dauerhaften Modulation der LASP1-Expression widerspricht.



**Abb. 45: Nachselektion erhöht den Anteil fluoreszierender Zellen, shControl-transduzierte Zellen verlieren an Fluoreszenz über sechs Passagen.** Dargestellt sind die Fluoreszenz (x-Achse) und die entsprechenden Counts (y-Achse) für T24shControl-high, T24shLASP1-high und RT4shControl-high (von oben nach unten), je zwei Plots links ohne Nachselektion, rechts mit Nachselektion; in den jeweiligen Paaren wiederum rechts Zellen, die sechs Passagen nach denen links eingefroren wurden. 30.000 Events wurden gezählt, Markerbereiche M1-M3 (von links nach rechts) für "no", "low" und "high" Fluoreszenz gesetzt.

**Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse zu Abb. 45.** Angegeben sind für die links bezeichneten Zellen und den jeweiligen Markerbereich und für die oben angegebenen Bedingung (ohne/ nach Nachselektion, in Passage 2/ 8 eingefroren) der Anteil aller als vital "gegateter" Zellen [%]. TCH: T24shControl-high; TLH: T24shLASP1-high; RCH: RT4shControl-high; P: Passagezahl.

		Ohne Nachselektion		Nach Nachselektion	
		Eingefroren	Eingefroren	Eingefroren	Eingefroren
		in P:2	in P:8	in P:2	in P:8
TCH	no	69.74	72.14	41.47	50.84
	low	21.89	19.68	41.14	34.77
	high	8.31	8.1	17.34	14.36
TLH	no	24.52	22.51	10.34	10.21
	low	45.66	44.84	52.19	46.74
	high	29.78	32.63	37.46	43.13
RCH	no	69.86	78.23	40.02	47.8
	low	24.24	18.61	44.5	43.09
	high	5.69	3.03	15.18	8.85

## 4. Diskussion

Der Blasenkrebs, in 95 % der Fälle ein Transitionalzellkarzinom (TCC) (Malats and Real, 2015), ist die vierthäufigste Krebserkrankung des Mannes in westlichen Ländern. Wegen des hohen Rezidivrisikos des nicht-muskelinvasiven TCCs hat das TCC eine hohe Prävalenz (Burger *et al.*, 2013). Eine frühe und zuverlässige Diagnostik des TCC und seines Rezidivs sind entscheidend für das Überleben und die Lebensqualität der Patienten. Sowohl fortgeschrittene Erkrankungen als auch Rezidive werden mit einer radikalen Zystektomie behandelt. Diese Operation verlangt wiederum die Konstruktion einer alternativen Harnableitung und wirkt sich entsprechend auf das soziale Leben der Betroffenen aus (Babjuk *et al.*, 2017; Witjes *et al.*, 2017). Der Goldstandard zur Früherkennung eines Rezidivs ist die Zystoskopie (Babjuk *et al.*, 2017). Dieses Verfahren ist aber invasiv, beinhaltet daher ein Infektionsrisiko, ist vom fachlichen Können des Arztes abhängig und wird von Patienten als unangenehm empfunden (Yossepowitch *et al.*, 2007). Tatsächlich ist das Blasenkarzinom wegen dieser Untersuchungsmethode die teuerste Krebserkrankung pro Patient (Sievert *et al.*, 2009). Biomarker als Alternative zur Zystoskopie weisen bisher aber keine genügende Sensitivität und Spezifität auf (D'Costa *et al.*, 2016). Die Verwendung solcher Marker würde entsprechend zu vielen nicht indizierten Zystoskopien von falsch positiv befundenen Patienten führen. Für eine verbesserte Patientenversorgung wird daher nach Rezidivmarkern gesucht. LASP1 stellt hierbei einen vielversprechenden Kandidaten dar.

Bedingt durch seinen Domänenaufbau, der vielfältige Interaktionen mit Bindepartnern ermöglicht, ist LASP1 in viele physiologische Prozesse eingebunden (Orth *et al.*, 2015). Aber auch in pathologischen Prozessen ist LASP1 involviert. Besonders in Karzinomen wurde eine Überexpression von LASP1 nachgewiesen und die hohe LASP1-Expression mit erhöhter Tumoraggressivität assoziiert - sowohl in *in vitro* und *in vivo* Versuchen als auch in klinischen Studien zur prognostischen Relevanz von LASP1 (Orth *et al.*,

2015; Ruggieri *et al.*, 2017). Ein Beispiel ist das Prostata-Karzinom, für welches LASP1 Bestandteil einer prognostischen Signatur ist (Erho *et al.*, 2013).

Ardelt *et al.* konnten einen erhöhten LASP1 Gehalt im Urinpellet von Blasenkarzinompatienten, verglichen mit gesunden Probanden, feststellen. Bei einem Grenzwert von 1 ng LASP1/500 µl Urin errechnete sich eine Sensitivität von 83,1 % und eine Spezifität von 85,3 %. Damit zeigte der LASP1 Nachweis gleichwertige und teilweise sogar bessere statistische Werte wie bzw. als die besten und neuesten kommerziell erhältlichen Marker für das Blasenkarzinom (Ardelt *et al.*, 2013). In der Studie wurde außerdem ein hemmender Effekt von LASP1-KD auf die Migration von T24 TCC-Zellen festgestellt, passend zu ersten Ergebnissen von Chiyomaru *et al.* zur funktionellen Relevanz von LASP1 im TCC (Chiyomaru *et al.*, 2012; Ardelt *et al.*, 2013).

Daher wurden als Ziele dieser Arbeit formuliert: 1) die Generierung von stabil transfizierten, induzierbar *LASP1* spezifische shRNA exprimierenden Transitionalzellkarzinomzelllinien. Diese sollten 2) die funktionelle Charakterisierung eines *LASP1*-Knockdowns *in vitro* ermöglichen. Dadurch sollten zum einen bisherige funktionellen Daten, zum anderen die Zellen selbst als für *in vivo* Studien geeignet validiert werden. Außerdem wurde 3) der Vergleich von Eigenschaften von *LASP1* im Transitionalzellkarzinom mit denen in anderen Karzinomen angestrebt. So sollte gezeigt werden, ob gehäufte Erkenntnisse über *LASP1*-Überexpression in Karzinomen, die mögliche Vermittlung des Effekts von *LASP1* durch nukleäre Lokalisation (Mihlan *et al.*, 2013), die Regulation der *LASP1*-Expression durch miRs (Orth *et al.*, 2015; Ruggieri *et al.*, 2017) und die prognostische Relevanz von *LASP1* auch auf das TCC zutreffen. Als Ergebnisse dieser Arbeit sollten 1) Zelllinien für *in vivo* Xenotransplantationsversuche zur Verfügung stehen, 2) erhobene Daten Auskunft über die Relevanz von *LASP1* als Mediator von Tumoraggressivität in einem breiten Spektrum von Krebsentitäten und speziell im TCC geben, und 3) die diagnostische Bedeutung von *LASP1* im Transitionalzellkarzinom erklärt werden.

Hierzu wurden die TCC-Zelllinien T24 und RT4 verwendet. Ein Auswahlkriterium für die Zelllinien war ein bereits beschriebenes erfolgreiches

Wachstum der Zellen im Mausmodell (Azuma *et al.*, 2003; Mohammed *et al.*, 2006). T24 weist eine *p53* Mutation auf (Cooper *et al.*, 1994) und wurde bereits zur Evaluation der funktionellen Relevanz von LASP1 im TCC verwendet (Chiyomaru *et al.*, 2012; Ardelt *et al.*, 2013). RT4 hingegen ist nicht *p53* mutiert (Cooper *et al.*, 1994) und der Ursprungstumor war ein gut differenzierter papillärer Tumor (Rigby and Franks, 1970). Angesichts der beschriebenen Hemmung von LASP1 durch *p53* (Wang *et al.*, 2009b) und dem häufigen Auftreten von *p53* Mutationen im muskelinvasiven TCC (Mitra *et al.*, 2006) war es ebenso von Interesse zu klären, ob in T24 Zellen LASP1 höher exprimiert wird und Ergebnisse für die funktionelle Relevanz dieses Proteins in dieser Zelllinien von denen in RT4 abweichen. Beide Zelllinien zeigten aber eine sehr ähnliche hohe Expression von LASP1, sowohl in CCLE Daten zur Expression von *LASP1* auf mRNA Level in Blasenkarzinomzelllinien als auch im Western Blot auf Proteinebene. Ein Vergleich der Expression von LASP1 in T24 und RT4 mit der in Urothel-Primärkultur ergab eine 4-5 fach erhöhte Expression von LASP1 in den Zelllinien. Das Ergebnis auf Proteinebene für T24 steht damit im Einklang mit einer früheren Analyse auf mRNA Ebene (ca. 6-Fache Expression im Vergleich zur Kontrolle) (Chiyomaru *et al.*, 2012). Die Überexpression von LASP1 in den Zelllinien ist ein deutlicher Hinweis auf die Validität dieser Zelllinien als Modell für das TCC angesichts der beobachteten Überexpression von LASP1 in diesem Karzinom in eigenen Microarray-Analysen, den qRT-PCR Daten von Chiyomaru *et al.* und dem immunhistochemischen Nachweis von LASP1 durch Ardelt *et al.* (Chiyomaru *et al.*, 2012; Ardelt *et al.*, 2013). Interessanterweise ist die Überexpression von LASP1 in den Zelllinien wesentlich ausgeprägter als in den Gewebeproben. Eventuell könnte aber gerade diese besonders hohe Überexpression zu einem besonders aggressiven Tumor geführt haben, der sich damals leichter als Zelllinie etablieren ließ. Dagegen spricht, dass RT4 von einem gut differenzierten Tumor stammt (Rigby and Franks, 1970).

Insgesamt konnte eine Überexpression von LASP1 im TCC mittels Microarray-Analysen und Vergleich der LASP1-Expression in Zelllinien versus primärer Urothelkultur bestätigt werden.

In Anbetracht der hohen Expression von LASP1 in T24 und RT4 war der KD von LASP1 Mittel der Wahl zur Evaluation der funktionellen Rolle von LASP1 in diesen Zelllinien. Eine weitere Überexpression von LASP1 wäre nicht zielführend. Die Überexpression von LASP1 alleine, ohne seine Bindepartner, führt in Zellen mit hoher endogener LASP1-Expression zu inkonsistentem Zellverhalten im Vergleich zum LASP1-KD (Lin *et al.*, 2004; Grunewald *et al.*, 2006). Erfolgreiche funktionelle Analysen einer LASP1-Überexpression gelangen bisher nur in wenigen Zelllinien mit niedriger endogener LASP1-Expression wie etwa PtK2 (Butt *et al.*, 2003) und SW480 (Zhao *et al.*, 2010). Um einen LASP1-KD zu erzielen, wurde die lentivirale Transduktion mit einem *LASP1* spezifische shRNA exprimierenden Konstrukt gewählt. Im Gegensatz zur Verwendung von siRNA, wird durch die lentivirale Transduktion die Sequenz der shRNA genomisch integriert. Daher kann mit shRNA auch der Effekt eines LASP1-KD *in vivo* untersucht werden. shRNA kann konstitutiv oder induzierbar exprimiert werden. Während bei der ersten Variante zwar keine weiteren induzierenden Reagenzien benötigt werden, die evtl. selbst zu verändertem Verhalten der Zellen führen könnten oder nur schwierig kontrolliert applizierbar sind, wie etwa in der Maus (Cawthorne *et al.*, 2007), hat sie aber auch entscheidende Nachteile: Durch den konstanten KD liegt auch der damit verbundene Phänotyp konstant vor und Kompensationsmechanismen können sich ausbilden. Der konstante Phänotyp kann das Wachstum dieser Zellen beeinträchtigen, einen Selektionsdruck darstellen oder ein Anwachsen im Tiermodell verhindern. Kompensationsmechanismen können den Phänotyp in diversen Analysen maskieren. Daher wurde ein durch Doxycyclin induzierbar (über ein sogenanntes Tetracyclin responsables Element) shRNA exprimierendes Konstrukt gewählt. Ein weiterer Vorteil des gewählten Konstrukts ist das direkt der shRNA Sequenz vorangestellte und dem Tetracyclin responsible Element nachgestellte tRFP. Dadurch konnte eine erfolgreiche Transduktion der Zellen und eine erfolgreiche KD Induktion fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Ebenso kann das tRFP für das Imaging der Zellen im Mausmodell genutzt werden (Hoffman, 2015). Nach



Transduktion der Zellen konnte ein LASP1-KD um ca. 30-40 % induziert werden, der noch neun Tage nach KD Induktion stabil war.

Um einen verbesserten KD zu erreichen, wurde hier bewusst nicht die Methode des Einzelzellklonens verwendet. Diese ist je nach Zelllinie nur sehr schwierig durchzuführen, da einige Zelllinien autokrine und parakrine Signale für ihr Wachstum benötigen (Li, 2009; Lim *et al.*, 2013). Außerdem ist der Nachteil eines isogenen Klons, dass mögliche Mutationen den Klon vom Verhalten primärer Blasenkarzinomzellen abweichen lassen könnten und nicht durch Heterogenität der Zellen ausgeglichen würden. Unter der Annahme, dass vermehrte Fluoreszenzintensität von tRFP eine vermehrte Transkription der shRNA und damit einen verbesserten KD bedeutet, wurden die lentiviral transduzierten T24 und RT4 Zellen anhand der Fluoreszenzintensität in solche mit der höchsten Fluoreszenzintensität (Top 20 %) und in solche mit niedrigerer Fluoreszenzintensität aufgetrennt. Es konnte jedoch kein Unterschied im KD zwischen diesen beiden Varianten festgestellt werden. Dies ist eventuell durch die im Dichteplot dargestellten verschiedenen Populationen der transduzierten Zellen begründet. Die Zellen einer Population könnten zum Beispiel in der Anzahl integrierter shRNA Konstrukte im Genom übereinstimmen. Teilt man nun die Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität auf, so werden von der gleichen Population durch die Streuung ihrer Fluoreszenzintensität Zellen in verschiedene Gruppen einsortiert. Diese können dann in beiden Gruppen die gesamte Population mit gleicher Fluoreszenz wieder ausbilden, und weitere Populationen überwachsen. Im Endeffekt liegt bzw. liegen dann in beiden Gruppen die gleiche Population bzw. gleiche Populationen vor. Diese These könnte durch engmaschige Durchflusszytometrie nach dem Sorten der Zellen kontrolliert werden.

Trotz ähnlichem KD wurden sowohl die "low" als auch "high" gesorteten Zellen in den funktionellen Analysen verwendet, in der Annahme, dass erhöhte Replikatzahlen eventuell doch eine differentielle LASP1-Expression zeigen, und diese zu verschiedenen stark ausgeprägten Effekten in den Versuchen führen könnte.

Als wichtigster funktioneller Assay wurde in dieser Arbeit der Adhäsionsassay betrachtet. Es ist bisher nicht definitiv geklärt, wie es zu einem vermehrten LASP1-Proteingehalt im Urinpellet von TCC-Patienten kommt (Ardelt *et al.*, 2013; Butt *et al.*, 2017). Als mögliche Erklärung wurde eine vermehrte Abschilferung von Tumorzellen als Ergebnis einer verringerten Adhäsion diskutiert (Ardelt *et al.*, 2013). Eine verringerte Adhäsion von aggressiveren Blasenkarzinomzellen wurde bereits gezeigt, etwa durch Verlust von E-Cadherin (Patriarca *et al.*, 2009). Außerdem wurde eine vermehrte Adhäsion nach LASP1-KD im Medulloblastom und im Mammakarzinom gezeigt (Traenka *et al.*, 2010; Duvall-Noelle *et al.*, 2016). Ebenso zeigten Ardelt *et al.* eine geringfügig, aber signifikant erhöhte Adhäsion von T24 Zellen nach transientem LASP1-KD (Ardelt *et al.*, 2013).

Um die Adhäsion optimal zu testen, wurde ein einfacher Adhäsionsassay optimiert, der auf dem Aussäen von Zellen in einer Kulturplatte und dem Abwaschen nicht adhärenter Zellen nach einer bestimmten Adhäsionszeit mit konsekutiver Fixierung und Färbung der adhären Zellen basiert. Die von Ardelt *et al.* beobachtete Adhäsionssteigerung nach LASP1-KD konnte dennoch nicht bestätigt werden. Allerdings wurden von Ardelt *et al.* Fibrinogen beschichtete Platten verwendet (Ardelt *et al.*, 2013), hier wurden hingegen Fibronectin beschichtete Platten verwendet, da Fibronectin eine wichtige Rolle in der Metastasierung als Adhäsionsmolekül spielt (Akiyama *et al.*, 1995). Um abschließend den Einfluss von LASP1 auf die Adhäsion von TCC-Zellen an der Basalmembran zu bewerten, könnten Assays mit Laminin als Beschichtung verwendet werden, da Laminin das hauptsächlichste Verankerungsprotein für epitheliale Zellen in der Basalmembran darstellt (Mercurio and Shaw, 1991). Zusätzlich ist anzumerken, dass bei einem Adhäsionsassay einer Zellpopulation die Adhäsion und Ablösung der Zellen untersucht werden kann, also die Geschwindigkeit, mit der Zellen adhären, und die Kraft, die zum Ablösen der Zellen nötig ist (Khalili and Ahmad, 2015). Das Ergebnis des hier verwendeten Waschassays hängt von beiden Aspekten ab. Möchte man beide Aspekte der Adhäsion differenzierter betrachten, sind Assays etabliert, welche die Adhäsionsgeschwindigkeit direkt auf elektrischen Sensoren mit Beschichtung

messen, zum Beispiel XCelligence, oder die Adhäsionskraft durch Ablösen vorher adhärenter Zellen, zum Beispiel im Zentrifugationsassay (Khalili and Ahmad, 2015). In dem hier durchgeführten Assay ist es durchaus möglich, dass die Adhäsionszeit für die getesteten Bedingungen zwar die gleiche war, die Adhäsionsstärke aber differierte. Das vorsichtige Abwaschen nicht adhärenter Zellen könnte nicht ausreichend gewesen sein, um weniger stark adhärente Zellen abzuwaschen und den Phänotyp damit im Assay zu präsentieren.

Zur Betrachtung von Proliferation als ein weiteres Kriterium der Tumoraggressivität wurde sowohl ein auf Zellmetabolismus (ATP) basierender Assay als auch Zellzählung angewandt. Als Limitation von auf Zellmetabolismus basierenden Assays wird oft angeführt, dass bei Beeinflussung des Metabolismus durch verschiedenen Bedingungen, wie etwa mit und ohne LASP1-KD, der Unterschied im Metabolismus gemessen wird und nicht ein Unterschied in der Zellzahl (Riss et al., 2004). Geringe Effekte lassen sich aber durch viele technische Replikate einfacher im metabolischen Assay als in der Zellzählung nachweisen, weshalb beide Methoden verwendet wurden. Es konnte weder im metabolischen Assay noch im gezählten Proliferationsassay ein Effekt eines LASP1-KDs auf Zellteilung gemessen werden. Für T24 ist dieses Ergebnis konsistent zu bisherigen Publikationen. Weder Ardelt *et al.* noch Chiyomaru *et al.* konnten einen Effekt eines LASP1-KDs auf die Proliferation von T24 beobachten (Chiyomaru *et al.*, 2012; Ardelt *et al.*, 2013). Bisher wurde ausschließlich für die TCC-Zelllinien BOY und KK47 eine Reduktion der Proliferation nach LASP1-KD gezeigt (Chiyomaru *et al.*, 2012), dies allerdings nur durch den metabolischen XTT Assay, der auf einer Spaltung eines Tetrazoliums Salzes in Folge von NAD(P)H Produktion beruht (Riss *et al.*, 2004). Angesichts der bisher in allen anderen Tumorentitäten beobachteten Proliferationshemmung nach LASP1-KD (Orth *et al.*, 2015) und der hier durchgeführten GSEA von TCGA Daten für das Blasenkarzinom, handelt es sich bei der hier beobachteten unveränderten Zellteilung in TCC-Zelllinien um ein unerwartetes Ergebnis. Die GSEA ergab mehrere mit *LASP1*-Expression signifikant assoziierte Gen-Sets, die mit Zellzyklusprogression annotiert waren. Dies passt auch zu bisherigen Studien mit Nachweis eines G2/M Arrests im

Falle eines LASP1-KDs, wie im Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Gallenblasenkarzinom (Grunewald *et al.*, 2006, 2007a; Frietsch *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016) oder eines G1 Phase Arrests im Prostatakarzinom (Sun *et al.*, 2017b), dort assoziiert mit reduzierter Cyclin D1 Expression nach LASP1-KD (Dejima *et al.*, 2017). Die GSEA selbst kann wegen des hochsignifikant korrelierten Gen-Sets für im Blasenkrebs regulierte Gene als valide angesehen werden.

Auch im Klonogenitätsassay konnte kein Effekt eines LASP1-KDs auf Proliferation oder Klonogenität von T24 und RT4 gezeigt werden. Die Auswertung fand allerdings bereits relativ früh nach sechs Tagen statt, weshalb eine geringere Zellzahl in diesem Assay verwendet werden sollte. Außerdem war der KD am Ende des Assays sehr gering. Dies ist wahrscheinlich dadurch begründet, dass das Medium nicht gewechselt wurde, um keine Kolonien abzulösen. Die Halbwertszeit von Doxycyclin in Zellkulturmedium beträgt aber nur 24 h (Angaben des Herstellers der lentiviralen Vektoren). Es könnte versucht werden, den KD durch höhere Konzentration von Doxycyclin, vorsichtigen Mediumwechsel mit frischem Doxycyclin und Zugabe von Doxycyclin-haltigem Medium zu steigern. Nichtsdestotrotz sollte zumindest über kurze Zeit ein KD nach erstmaliger Doxycyclingabe bestanden haben. Da das Medium in keinem der Wells verbraucht war, sollte es nicht zu einem ausgleichenden Wachstum der Doxycyclin behandelten Zellen nach Verlust eines KDs gekommen sein. Jedoch ist allgemein dieser Assays für diese Zelllinien wenig geeignet, da T24 und RT4 keine dichten Kolonien bildeten und eine Färbung nicht zur Darstellung farbintensiver scharf abgegrenzter Klone führte.

In Transwellassays konnte eine signifikante um 22 % und 12 % reduzierte Migration für T24 und RT4 nachgewiesen werden. Dies passt zu den Ergebnissen in Transwellassays von Ardelt *et al.* und zu den Wundheilungsassays von Chiyomaru *et al.* (Chiyomaru *et al.*, 2012; Ardelt *et al.*, 2013). Der Effekt war hier aber geringer ausgeprägt, was möglicherweise mit einem geringeren LASP1-KD zusammenhängt. Zusammenfassend konnte eine funktionelle Relevanz von LASP1 in der Migration von TCC-Zellen

bestätigt werden. Dieser Effekt entspricht den Beobachtungen in anderen Karzinomen wie im Mammakarzinom und Prostatakarzinom (Grunewald *et al.*, 2006; Hailer *et al.*, 2014).

In der Zusammenschau des hier beobachteten Einflusses von LASP1 auf Migration von TCC-Zelllinien, der hoch signifikant mit *LASP1*-Expression korrelierten Gen-Sets mit Annotation für Metastasierung in der GSEA sowie des Nachweises einer LASP1 abhängigen Regulation von Matrixmetalloproteinasen in T24 (Endres *et al.*, 2016) kann eine wichtige Rolle von LASP1 in der Metastasierung des TCCs angenommen werden. Zwar war in den TCGA Daten für das Blasenkarzinom von 23 MMPs nur eine Protease positiv und signifikant LASP1 co-reguliert, nämlich MMP7, aber auch Endres *et al.* diskutierten bereits, dass es sich bei der Hochregulation der MMPs eventuell um einen kurzfristigen Effekt während der Metastasierung handelt, der dementsprechend in Expressionsdaten schlecht abgebildet wird (Endres *et al.*, 2016). Als weiteren Assay zur Darstellung des Metastasierungsverhaltens von LASP1 depletierten Zellen könnte ein Invasionsassay durchgeführt werden. Bereits Chiyomaru *et al.* zeigten eine verringerte Invasion von TCC-Zelllinien in einem Matrigel Assay nach LASP1-KD (Chiyomaru *et al.*, 2012).

In der Literatur wird derzeit intensiv die Vermittlung des Effekts von LASP1 durch seine nukleäre Lokalisation diskutiert (Mihlan *et al.*, 2013; Duvall-Noelle *et al.*, 2016). Daher wurde die nukleäre Lokalisation von LASP1 in den TCC-Zelllinien untersucht. In der Immunhistochemie zeigte sich eine vorrangig nukleäre Lokalisation von an Serin-146 phosphoryliertem LASP1. Da kein Konfokalmikroskop zur Verfügung stand, wurde zum Ausschluss fehlleitender Überlagerungseffekte eine Kern-Cytosol-Trennung vorgenommen. In dieser konnte die nukleäre Lokalisation von LASP1 und die Anreicherung von Serin-146 phosphoryliertem LASP1 im Nukleus bestätigt werden. Eine nukleäre Lokalisation von LASP1 wurde auch in Blasenkarzinomzellen im Patientenurin beobachtet (Butt *et al.*, 2017). Daher liegt LASP1 wahrscheinlich nicht nur im Zelllinienmodell sondern zumindest partiell auch in TCC-Patienten nukleär vor. Die Regulation von LASP1 wurde lange kontrovers diskutiert. Während im Mammakarzinom eine Überexpression als Folge von *Copy Number*

Veränderung oder *p53* Mutation negiert wurde (Frietsch *et al.*, 2010), konnte der inhibierende Effekt von *p53* auf *LASP1*-Expression im hepatozellulären Karzinom gezeigt werden (Wang *et al.*, 2009a). In letzter Zeit wird aber vor allem die Regulation der *LASP1*-Expression durch verschiedene miRs (Ruggieri *et al.*, 2017), vor allem miR-133a und miR-203, in diversen Tumorentitäten nachgewiesen (Takeshita *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012, 2013b; Benaich *et al.*, 2014; Hailer *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016). Bereits Chiyomaru *et al.* konnten *LASP1* als direktes Target von miR-1, miR-133a und miR-218 im Blasenkarzinom identifizieren (Chiyomaru *et al.*, 2012). Für alle drei miRs, miR-1 (Song *et al.*, 2010; Yoshino *et al.*, 2011), miR-133a (Ichimi *et al.*, 2009; Pignot *et al.*, 2013) und miR-218 (Yamasaki *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2015) wurde eine Herunterregulation im Blasenkarzinom beschrieben. Jedoch ist die Spezifität dieser miRs für *LASP1* fraglich, da bei Transfektion mit miR-1 und miR-133a eine verringerte Zellviabilität für T24 gemessen wurde, die sich nicht allein durch *LASP1*-KD erklären lässt (Chiyomaru *et al.*, 2012). Außerdem wurden weitere Targets dieser miRs im Blasenkarzinom bereits beschrieben (Yoshino *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Um mögliche relevante *LASP1*-Expression in TCC regulierende miRs zu identifizieren, wurde hier in den miR-Expressionsdaten des TCGA Blasenkarzinom Datensets nach signifikant niedriger exprimierten miRs in *LASP1* höher exprimierenden Patienten gesucht. Dabei konnte miR-203 als am signifikantesten niedriger exprimiert in *LASP1* hoch exprimierenden Patienten detektiert werden. Die Regressionsanalyse ergab eine hochsignifikant negative Korrelation von miR-203 Expression mit *LASP1*-Expression ( $r=-0,311$ ). Dieses Ergebnis erscheint glaubwürdig, da bereits eine Regulation von *LASP1*-Expression durch miR-203 in Ösophagus-Plattenepithelkarzinom und Prostata-Karzinom gezeigt wurde (Takeshita *et al.*, 2012; Hailer *et al.*, 2014). Diese Analyse konnte allerdings nur eine differenzielle Expression von miR-203 und die Korrelation mit *LASP1*-Expression in Transitionalzellkarzinompatienten zeigen. Um bewerten zu können, ob eine miR-203 Herunterregulation in Tumoren, verglichen mit Normalgewebe, vorliegt, welche zur *LASP1*-Überexpression führen könnte, müssten zusätzliche miR-Expressionsdaten von normalem Urothel vorliegen.

Während eine Studie, mit allerdings nur zwei Kontrollen, im Jahr 2007 die miR-203 im Blasenkarzinom hochreguliert fand, (Gottardo *et al.*, 2007), wurde 2011 in einer Kohorte mit 13 Tumoren und neun Normalgeweben eine miR-203 Herunterregulation in den Tumoren beobachtet (Bo *et al.*, 2011). Interessanterweise wurde die miR-203 Expression als signifikant geringer in Patienten mit Progression von Blasenkrebs eingestuft und mit schlechter Prognose assoziiert (Zhang *et al.*, 2015). Außerdem wurde ein Einfluss von miR-203 auf die Proliferation im TCC-Zelllinienmodell beschrieben (Bo *et al.*, 2011). Inwiefern diese Befunde durch LASP1 Regulation zu erklären sind, ist derzeit unklar.

Neben der funktionellen Relevanz von LASP1 in Krebserkrankungen und dessen Regulation durch miRs, wird mehr und mehr die prognostische Relevanz von LASP1, zum Beispiel im Mamma- oder Colonkarzinom diskutiert (Frietsch *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010). Entsprechend wurde in TCGA Daten für das Blasenkarzinom der Zusammenhang zwischen *LASP1*-Expression und klinischen und pathologischen Parametern untersucht. Es konnte für die *LASP1*-Expression weder eine signifikante Korrelation mit Überleben oder einem der anderen untersuchten klinischen Parameter noch mit pathologischen Parametern festgestellt werden. Allerdings ist die bisherige Datenlage zum Zusammenhang von *LASP1*-Expression und Grading auch nicht kongruent. Während Chiyomura *et al.* eine geringere RNA Expression von *LASP1* in Proben mit höherem Grading und Stadium beschreiben (Chiyomaru *et al.*, 2012), berichten Ardelt *et al.* von einem höherem *LASP1*-Proteingehalt im Urinpellet bei höherem Grading (Ardelt *et al.*, 2013). Außerdem muss kritisch angemerkt werden, dass für die hier durchgeführten Berechnungen nur genügend Expressionsdaten auf mRNA Level vorhanden waren, während in anderen Studien die Assoziation zwischen Prognose und *LASP1*-Expression auf Proteinebene anhand immunhistochemischer Anfärbung stattfand, so etwa im Mammakarzinom (Frietsch *et al.*, 2010), colorektalen Karzinom (Zhao *et al.*, 2010), hepatozellulären Karzinom (Wang *et al.*, 2013a), klarzelligen Nierenzellkarzinom (Yang *et al.*, 2014), Magenkrebs (Zheng *et al.*, 2014), Pankreaskarzinom (Zhao *et al.*, 2015) und Prostatakarzinom (Hailer *et al.*,

2014). Chiyomaru *et al.* beobachteten eine Diskrepanz zwischen *LASP1*-Expression auf mRNA und Protein Level, die sie mit möglicher posttranslationaler Modifikation von *LASP1*, wie Ubiquitinierung oder Proteolyse, begründeten (Chiyomaru *et al.*, 2012). Dies könnte auch erklären, warum nur für das hepatozelluläre Karzinom die bekannte Korrelation von hoher *LASP1*-Expression mit verringertem Gesamtüberleben in den TCGA Daten bestätigt werden konnte, nicht jedoch für zum Beispiel das Mammakarzinom und das colorektale Karzinom. Des Weiteren umfassen die TCGA Kohorten Patienten mit verschiedenen Tumorstadien und unterschiedlichen Therapien, seltener auch ohne Behandlung. Dadurch kann der prognostische Wert eines Proteins für eine bestimmte Gruppe von Patienten mit einer bestimmten Therapie natürlich maskiert werden. Im Falle des Blasenkarzinoms lag aber in der über 400 Patienten großen Kohorte lediglich für drei Patienten ein pathologisch bestätigtes nicht-muskelinvasives Karzinom vor. Entsprechend sollte das muskelinvasive TCC gut abgebildet sein. Hingegen kann mit diesen Daten keine Aussage für das nicht-muskelinvasive TCC getroffen werden, also auch nicht gezeigt werden, ob *LASP1*-Expression mit dem Rezidivrisiko im nicht-muskelinvasiven TCC korreliert.

Die deutlich geringeren Effekte auf die Migration (hier Reduktion um 22 % und 12 % für T24 und RT4) im Vergleich zu bisherigen Publikationen über *LASP1* im Blasenkarzinom (Reduktion um ca. 30 % für T24 im Transwellassay und 34 % im Wundheilungsassay), und der eher schwache *LASP1*-KD von durchschnittlich 50 % verlangten eine kritische Betrachtung der hier generierten Zellen. Es wurde erwogen, dass durch lentivirale Transduktion, Selektion und Sorten das Zellverhalten, im Vergleich zum Wildtyp, verändert worden sein könnte, sodass die generierten Zellen eventuell nicht mehr repräsentativ für das TCC wären. In Anbetracht der langwierigen Selektionsverfahren bei der Etablierung der hier verwendeten und als valide angesehenen TCC-Zelllinien T24 und RT4 (Rigby and Franks, 1970; Bubeník *et al.*, 1973) ist allerdings nicht zu erwarten, dass es zu erheblichen Veränderungen im Zellverhalten durch lentivirale Transduktion, Selektion und Sorten gekommen sein könnte.



Weder Durchflusszytometrie (zum Größenvergleich der Zellen) noch Proteinmengenbestimmung ergaben eindeutige Ergebnisse. Hingegen konnte im gezählten Proliferationsassay eine, im Vergleich zum Wildtyp, signifikant erhöhte Zellteilungsrate mehrerer lentiviral transduzierter und gesorteter Zellen festgestellt werden. Die einzige Ausnahme waren die RT4shLASP1-high Zellen. Die veränderte Proliferationsrate der lentiviral transduzierten und gesorteten Zellen hatte aber offensichtlich keinen Einfluss auf die hier gemessenen Effekte eines LASP1-KDs, da auch RT4shLASP1-high Zellen wie T24shLASP1-high Zellen keine stark ausgeprägte Migrationshemmung nach LASP1-KD aufwiesen. Noch dazu können die Ergebnisse im Proliferationsassay und Migrationsassay der hier generierten Zellen in Zusammenschau mit der Literatur als plausibel angesehen werden, weshalb die hier generierten Zelllinien wahrscheinlich valide Modelle für das TCC darstellen.

Eine überraschende Feststellung bei der Kontrolle der Fluoreszenz der transduzierten Zellen in der Durchflusszytometrie war, dass "high"-gesortete Zellen über mehrere Passagen ihr Fluoreszenzsignal wieder verlieren. Die "high"-gesorteten Zellen wurden aus einer Zellpopulation heraus wegen ihrer höchsten Fluoreszenzintensität gefiltert und einem Überwachsen der Zellen durch wildtypische Zellen widerspricht die signifikant geringere Proliferationsrate der wildtypischen Zellen. Daher muss am ehesten von einem Verlust des shRNA exprimierenden Konstrukts aus den Zellen oder von einer verringerten Doxycyclin-Responsibilität ausgegangen werden. Der deutlich erhöhte Anteil fluoreszierender Zellen nach Nachselektion der Zellen mit Puromycin spricht deutlich für den tatsächlichen Verlust des gesamten lentiviral transduzierten Konstruktes aus den Zellen. Durch regelmäßige Nachselektion der Zellen kann dies ausgeglichen werden. Jedoch deutet eine solche Dynamik in den lentiviral transduzierten Zellen darauf hin, dass auch als isogen betrachtete Einzelzellklone nicht isogen bleiben und daher die Anwendung dieser bzw. deren Nutzen kritisch betrachtet werden muss.

Ein möglicher weiterer Grund für den geringen KD von LASP1 und die beobachteten schwachen Effekte in den *in vitro* Assays könnte theoretisch auch Doxycyclin im verwendeten FCS sein. Durch Anwendung von Antibiose in der

Tierhaltung kann FCS Tetracycline enthalten, weshalb mittlerweile, allerdings gegen Aufpreis, auf Tetracycline getestetes FCS erhältlich ist (Mulhardt, 2010, p 215). Durch das Tetracyclin im FCS könnten bereits die Kontrollzellen shRNA exprimiert haben, sodass durch Zugabe von Doxycyclin in den Versuchen nur noch eine geringe Steigerung der shRNA Transkription und den damit verbundenen Phänotypen eintrat. Dieses Szenario ist allerdings für die Versuche dieser Arbeit eher unwahrscheinlich, weil zu keinem Zeitpunkt fluoreszenzmikroskopisch, und auch nicht in der Durchflusszytometrie, eine Fluoreszenz von nicht mit Doxycyclin behandelten Zellen detektiert wurde. Für die Generierung von Blasenkarzinomzellen mit LASP1-KD für *in vivo* Versuche sollte angesichts des hier eher geringen KDs und dem hier beschriebenen veränderten Zellverhalten und Konstrukt-Verlustes als Alternative die Verwendung des CRISPR/Cas9 Systems in Erwägung gezogen werden (Sánchez-Rivera and Jacks, 2015).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erfolgreich induzierbar *LASP1* spezifische shRNA exprimierende Blasenkarzinomzelllinien generiert und die funktionelle Relevanz von *LASP1* in der Migration von TCC-Zelllinien bestätigt werden. Jedoch ist angesichts eines eher geringen *LASP1*-KD von nur circa 50 % und des Verlusts des shRNA exprimierenden Konstrukts in den transduzierten Zellen für die weitere Evaluation der funktionellen Relevanz von *LASP1 in vivo* die Generierung von *LASP1*-KD Zelllinien durch die CRISPR/Cas9 Methode zu erwägen. Mit solchen Zellen könnte nochmals der Effekt von *LASP1* auf Adhäsion in einem Assay mit Laminin-Beschichtung evaluiert werden, um damit eine mögliche vermehrte Abschilferung von TCC-Zellen als Ursache für den erhöhten *LASP1*-Proteingehalt im Urinpellet von TCC-Patienten erklären zu können. Außerdem weisen bioinformatische Enrichment Analysen auf einen Zusammenhang von *LASP1* mit Metastasierung hin, weshalb auch Invasionsassays durchgeführt werden sollten. In dieser Arbeit konnte die Überexpression von *LASP1* im TCC bestätigt werden, erstmalig eine nukleäre *LASP1* Lokalisation in TCC-Zelllinien nachgewiesen

werden, und bioinformatisch eine Regulation von LASP1 durch miR-203 im Blasenkarzinom gezeigt werden.

Damit bestätigt sich einmal mehr die Rolle von LASP1 als Vermittler von Tumoraggressivität in diversen Krebserkrankungen. Eine weitere Aufklärung der Mechanismen, wie LASP1 Tumoraggressivität vermittelt und welche Interaktionen LASP1 im Zellkern eingeht, könnte mögliche Ziele für eine gerichtete Therapie ergeben. Neue therapeutische Strategien könnten die Versorgung von Patienten mit muskelinvasivem TCC verbessern. Angesichts der LASP1 vermittelten Tumoraggressivität und seiner Assoziation mit klinischem Ergebnis in diversen Karzinomen und Medulloblastom sollte LASP1 als ein vielversprechender prognostischer Marker weiter erforscht werden. Gerade im Blasenkarzinom ist LASP1 sogar als diagnostischer Marker besonders vielversprechend, da im Gegensatz zu anderen Krebserkrankungen kein Biopsie- oder OP-Material nötig ist, sondern nicht-invasiv gewonnener Urin das Probenmaterial darstellt. Dieses diagnostische Verfahren könnte die Nachsorge für Patienten mit nicht-muskelinvasivem TCC verbessern.

## 5. Zusammenfassung

LASP1 spielt eine Schlüsselrolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie etwa in der Entwicklung, Zellstruktur, Zellkommunikation, Tumorgenese und Metastasierung. Die Vielseitigkeit von LASP1 ist hauptsächlich durch seine besondere Proteinstruktur bedingt, die eine Interaktion mit vielen verschiedenen Bindepartnern ermöglicht. Effekte von LASP1 werden aber wahrscheinlich nicht nur durch cytosolische Interaktion mit Bindepartnern vermittelt, sondern auch, in Folge einer Translokation in den Zellkern, durch nukleäre Interaktion, evtl. als transkriptioneller Co-Faktor.

Besonders die Rolle von LASP1 in diversen Krebserkrankungen stand in den letzten Jahren im Fokus der Forschung. Sowohl in Karzinomen, als auch in Medulloblastom und Leukämien wächst die Evidenz für eine LASP1-Überexpression, die vor allem durch fehlende microRNA Regulation und Mutationen im *p53* Tumorsuppressor bedingt scheint. Die hohe LASP1-Expression konnte in vielen *in vitro* und *in vivo* Studien mit vermehrter Proliferation, Migration und/ oder Invasion von Krebszelllinien in direkten Zusammenhang gebracht werden. Dieser Effekt von LASP1 auf Tumoraggressivität ist eine mögliche Erklärung für die mit hoher LASP1-Expression korrelierte schlechtere Prognose in verschiedenen Krebserkrankungen.

Das Transitionalzellkarzinom ist die fünfthäufigste Krebserkrankung des Menschen und weist eine hohe Rezidivrate auf. Daher sind regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen notwendig. Angesichts bisher fehlender verlässlicher Biomarker für das Transitionalzellkarzinom ist die Zystoskopie weiterhin der Goldstandard in der Nachsorge. Diese wird aber von Patienten als unangenehm empfunden, ist mit einem Infektionsrisiko verbunden, von der Erfahrung des Untersuchers abhängig und kostenintensiv. Tatsächlich ist das Transitionalzellkarzinom eine der teuersten Krebserkrankungen in der Nachsorge, weshalb die Entwicklung alternativer Diagnostikverfahren auch gesundheitsökonomische Relevanz hat.

LASP1 wurde als ein vielversprechender Biomarker des Transitionalzellkarzinom-Rezidivs identifiziert, der durch einfache Proteinmengenbestimmung mittels Western Blot im Urinpellet evaluiert werden kann. Zum damaligen Zeitpunkt gab es außerdem bereits erste Hinweise auf eine funktionelle Relevanz von LASP1 im Blasenkarzinom *in vitro*.

Angesichts dieser Erkenntnisse wurden als Ziele dieser Arbeit formuliert, 1) die Generierung von stabil transfizierten, induzierbar *LASP1* spezifische shRNA exprimierenden Transitionalzellkarzinomzelllinien, 2) die funktionelle Charakterisierung eines *LASP1*-Knockdowns in selbigen *in vitro*, und 3) der Vergleich von Eigenschaften von *LASP1* im Transitionalzellkarzinom mit denen in anderen Karzinomen.

Für die zwei Transitionalzellkarzinomzelllinien T24 und RT4 konnte eine 4-5-Fache *LASP1*-Überexpression, verglichen mit normalem Urothel, gezeigt werden. Beide Zelllinien wurden erfolgreich mit einem induzierbar shRNA gegen *LASP1* exprimierenden Konstrukt transduziert, sodass ein 50 % *LASP1*-Knockdown durch Doxycyclin induziert werden kann. Bei der Evaluierung des Effektes des *LASP1*-Knockdowns auf die Adhäsion, Proliferation und Migration dieser Zelllinien *in vitro* konnte eine signifikante Reduktion der Migration in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Passend dazu ergab eine GSEA von TCGA Daten zum Blasenkarzinom eine Korrelation von *LASP1*-Expression mit diversen Gen-Sets, die mit dem Phänotyp Metastasierung annotiert sind. Des Weiteren konnte für T24 und RT4 eine nukleäre *LASP1*-Lokalisation nachgewiesen werden, die abhängig von der Serin-146 Phosphorylierung war. Bioinformatische Analysen ergaben eine hochsignifikante, negative Korrelation von *LASP1*-Expression und miR-203 im Blasenkarzinom.

Eine Korrelation von *LASP1*-Expression mit Prognose konnte mittels TCGA Daten für das Blasenkarzinom nicht festgestellt werden. Jedoch lagen lediglich Expressionsdaten auf mRNA Level vor, die meisten *LASP1* mit Prognose assoziierenden Studien basieren hingegen auf Immunhistochemie, also der Expression auf Proteinlevel, welche in Blasenkrebszelllinien von der Expression auf mRNA Level abweichen kann.

Die generierten Zelllinien wiesen nach lentiviraler Transduktion, Selektion und Sorten im Vergleich zum Wildtyp teilweise veränderte Zelleigenschaften auf, und ein Verlust des Fluoreszenzsignals des der shRNA vorangestellten tRFP wurde beobachtet. Daher müssen die Zellen bei weiterer Verwendung regelmäßig mit Puromycin nachselektioniert werden und die Validität dieser Zellen als Modell für das Transitionalzellkarzinom, besonders im Xenograft Mausmodell, ist kritisch zu hinterfragen.

Entsprechend sind die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit bisherigen Studien zu LASP1. Damit unterstreicht diese Arbeit einmal mehr die Relevanz von LASP1 in diversen Krebserkrankungen. Weitere Studien zum Wert von LASP1 als prognostischer oder gar diagnostischer Marker erscheinen daher vielversprechend.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agaimy, A., and Hartmann, A. 2016. [Mesenchymal tumors of the urinary bladder]. *Der Pathologe*, 37: 61–70.
- Akiyama, S. K., Olden, K., and Yamada, K. M. 1995. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 14: 173–189.
- Ardelt, P., Grünemay, N., Strehl, A., Jilg, C., Miernik, A., Kneitz, B., and Butt, E. 2013. LASP-1, a novel urinary marker for detection of bladder cancer. *Urologic Oncology*, 31: 1591–1598.
- Asaka, S.-I., Fujimoto, T., Akaishi, J., Ogawa, K., and Onda, M. 2006. Genetic prognostic index influences patient outcome for node-positive breast cancer. *Surgery Today*, 36: 793–801.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., *et al.* 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25: 25–29.
- Azuma, H., Takahara, S., Horie, S., Muto, S., Otsuki, Y., and Katsuoka, Y. 2003. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment. *The Journal of Urology*, 169: 2372–2377.
- Babjuk, M., Böhle, A., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Compérat, E. M., Hernández, V., *et al.* 2017. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *European Urology*, 71: 447–461.
- Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A. A., Kim, S., Wilson, C. J., *et al.* 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*, 483: 603–607.
- Benaich, N., Woodhouse, S., Goldie, S. J., Mishra, A., Quist, S. R., and Watt, F. M. 2014. Rewiring of an epithelial differentiation factor, miR-203, to inhibit human squamous cell carcinoma metastasis. *Cell Reports*, 9: 104–117.
- Bliss, K. T., Chu, M., Jones-Weinert, C. M., and Gregorio, C. C. 2013. Investigating lasp-2 in cell adhesion: new binding partners and roles in motility. *Molecular Biology of the Cell*, 24: 995–1006.
- Bo, J., Yang, G., Huo, K., Jiang, H., Zhang, L., Liu, D., and Huang, Y. 2011. microRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression. *The FEBS journal*, 278: 786–792.
- Brüske-Hohlfeld, I. 1999. Occupational cancer in Germany. *Environmental Health Perspectives*, 107 Suppl 2: 253–258.
- Bubeník, J., Baresová, M., Víklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H., and Donner, J. 1973. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International Journal of Cancer*, 11: 765–773.
- Burger, M., Catto, J. W. F., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., Kassouf, W., *et al.* 2013. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *European Urology*, 63: 234–241.
- Butt, E., Gambaryan, S., Göttfert, N., Galler, A., Marcus, K., and Meyer, H. E. 2003. Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 15601–15607.
- Butt, E., Ebbing, J., Bubendorf, L., and Ardelt, P. 2017. Influence of hematuria and infection on diagnostic accuracy of urinary LASP1: a new biomarker for bladder carcinoma. *Biomarkers in Medicine*, 11: 347–357.
- Cawthorne, C., Swindell, R., Stratford, I. J., Dive, C., and Welman, A. 2007. Comparison of Doxycycline Delivery Methods for Tet-Inducible Gene

- Expression in a Subcutaneous Xenograft Model. *Journal of Biomolecular Techniques* : JBT, 18: 120–123.
- Chen, W.-S., Leung, C.-M., Pan, H.-W., Hu, L.-Y., Li, S.-C., Ho, M.-R., and Tsai, K.-W. 2012. Silencing of miR-1-1 and miR-133a-2 cluster expression by DNA hypermethylation in colorectal cancer. *Oncology Reports*, 28: 1069–1076.
- Cheng, Y., Yang, X., Deng, X., Zhang, X., Li, P., Tao, J., and Lu, Q. 2015. MicroRNA-218 inhibits bladder cancer cell proliferation, migration, and invasion by targeting BMI-1. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36: 8015–8023.
- Chew, C. S., Parente, J. A., Zhou, C., Baranco, E., and Chen, X. 1998. Lasp-1 is a regulated phosphoprotein within the cAMP signaling pathway in the gastric parietal cell. *The American Journal of Physiology*, 275: C56-67.
- Chew, C. S., Parente, J. A., Chen, X., Chaponnier, C., and Cameron, R. S. 2000. The LIM and SH3 domain-containing protein, lasp-1, may link the cAMP signaling pathway with dynamic membrane restructuring activities in ion transporting epithelia. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 11): 2035–2045.
- Chiyomaru, T., Enokida, H., Tatarano, S., Kawahara, K., Uchida, Y., Nishiyama, K., Fujimura, L., *et al.* 2010. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 102: 883–891.
- Chiyomaru, T., Enokida, H., Kawakami, K., Tatarano, S., Uchida, Y., Kawahara, K., Nishiyama, K., *et al.* 2012. Functional role of LASP1 in cell viability and its regulation by microRNAs in bladder cancer. *Urologic Oncology*, 30: 434–443.
- Cooper, M. J., Haluschak, J. J., Johnson, D., Schwartz, S., Morrison, L. J., Lippa, M., Hatzivassiliou, G., *et al.* 1994. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncology Research*, 6: 569–579.
- Dalbagni, G., Vora, K., Kaag, M., Cronin, A., Bochner, B., Donat, S. M., and Herr, H. W. 2009. Clinical Outcome in a Contemporary Series of Restaged Patients with Clinical T1 Bladder Cancer. *European Urology*, 56: 903–910.
- D'Costa, J. J., Goldsmith, J. C., Wilson, J. S., Bryan, R. T., and Ward, D. G. 2016. A Systematic Review of the Diagnostic and Prognostic Value of Urinary Protein Biomarkers in Urothelial Bladder Cancer. *Bladder Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 2: 301–317.
- Dejima, T., Imada, K., Takeuchi, A., Shiota, M., Leong, J., Tombe, T., Tam, K., *et al.* 2017. Suppression of LIM and SH3 Domain Protein 1 (LASP1) Negatively Regulated by Androgen Receptor Delays Castration Resistant Prostate Cancer Progression. *The Prostate*, 77: 309–320.
- Dimova, I., Orsetti, B., Negre, V., Rouge, C., Ursule, L., Lasorsa, L., Dimitrov, R., *et al.* 2009. Genomic markers for ovarian cancer at chromosomes 1, 8 and 17 revealed by array CGH analysis. *Tumori*, 95: 357–366.
- Divrik, R. T., Yildirim, Ü., Zorlu, F., and Özen, H. 2006. The Effect of Repeat Transurethral Resection on Recurrence and Progression Rates in Patients With T1 Tumors of the Bladder Who Received Intravesical Mitomycin: A Prospective, Randomized Clinical Trial. *The Journal of Urology*, 175: 1641–1644.
- Du, Y.-Y., Zhao, L.-M., Chen, L., Sang, M.-X., Li, J., Ma, M., and Liu, J.-F. 2016. The tumor-suppressive function of miR-1 by targeting LASP1 and TAGLN2 in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31: 384–393.
- Duvall-Noelle, N., Karwandayar, A., Richmond, A., and Raman, D. 2016. LASP-1: a nuclear hub for the UHRF1-DNMT1-G9a-Snail1 complex. *Oncogene*, 35: 1122–1133.
- Endres, M., Kneitz, S., Orth, M. F., Perera, R. K., Zerneck, A., and Butt, E. 2016. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) expression and secretion in



- MDA-MB-231 breast cancer cells by LIM and SH3 protein 1 (LASP1). *Oncotarget*, 7: 64244–64259.
- Erho, N., Crisan, A., Vergara, I. A., Mitra, A. P., Ghadessi, M., Buerki, C., Bergstralh, E. J., *et al.* 2013. Discovery and validation of a prostate cancer genomic classifier that predicts early metastasis following radical prostatectomy. *PLoS One*, 8: e66855.
- Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., and Abnet, C. C. 2011. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *JAMA*, 306: 737–745.
- Frietsch, J. J., Grunewald, T. G. P., Jasper, S., Kammerer, U., Herterich, S., Kapp, M., Honig, A., *et al.* 2010. Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long-term survival in female breast cancer. *British Journal of Cancer*, 102: 1645–1653.
- Frietsch, J. J., Kastner, C., Grunewald, T. G. P., Schweigel, H., Nollau, P., Ziermann, J., Clement, J. H., *et al.* 2014. LASP1 is a novel BCR-ABL substrate and a phosphorylation-dependent binding partner of CRKL in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*, 5: 5257–5271.
- Giannarini, G., Birkhäuser, F. D., Recker, F., Thalmann, G. N., and Studer, U. E. 2014. Bacillus Calmette-Guérin failure in patients with non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder may be due to the urologist's failure to detect urothelial carcinoma of the upper urinary tract and urethra. *European Urology*, 65: 825–831.
- Gottardo, F., Liu, C. G., Ferracin, M., Calin, G. A., Fassan, M., Bassi, P., Seignani, C., *et al.* 2007. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urologic Oncology*, 25: 387–392.
- Gray, C. H., McGarry, L. C., Spence, H. J., Riboldi-Tunnicliffe, A., and Ozanne, B. W. 2009. Novel beta-propeller of the BTB-Kelch protein Krp1 provides a binding site for Lasp-1 that is necessary for pseudopodial extension. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 30498–30507.
- Griffiths, T. R. L. on behalf of A. on B. C. 2013. Current perspectives in bladder cancer management. *International Journal of Clinical Practice*, 67: 435–448.
- Grunewald, T. G., Pasedag, S. M., and Butt, E. 2009. Cell Adhesion and Transcriptional Activity - Defining the Role of the Novel Protooncogene LPP. *Translational Oncology*, 2: 107–116.
- Grunewald, T. G. P., Kammerer, U., Schulze, E., Schindler, D., Honig, A., Zimmer, M., and Butt, E. 2006. Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 312: 974–982.
- Grunewald, T. G. P., Kammerer, U., Winkler, C., Schindler, D., Sickmann, A., Honig, A., and Butt, E. 2007a. Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation. *British Journal of Cancer*, 96: 296–305.
- Grunewald, T. G. P., Kammerer, U., Kapp, M., Eck, M., Dietl, J., Butt, E., and Honig, A. 2007b. Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma. *BMC cancer*, 7: 198.
- Hailer, A., Grunewald, T. G. P., Orth, M., Reiss, C., Kneitz, B., Spahn, M., and Butt, E. 2014. Loss of tumor suppressor mir-203 mediates overexpression of LIM and SH3 Protein 1 (LASP1) in high-risk prostate cancer thereby increasing cell proliferation and migration. *Oncotarget*, 5: 4144–4153.
- Hammarström, A., Berndt, K. D., Sillard, R., Adermann, K., and Otting, G. 1996. Solution structure of a naturally-occurring zinc-peptide complex demonstrates

- that the N-terminal zinc-binding module of the Lasp-1 LIM domain is an independent folding unit. *Biochemistry*, 35: 12723–12732.
- He, B., Yin, B., Wang, B., Chen, C., Xia, Z., Tang, J., Yuan, Y., *et al.* 2013. Overexpression of LASP1 is associated with proliferation, migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 29: 1115–1123.
- Hermann-Kleiter, N., Ghaffari-Tabrizi, N., Blumer, M. J. F., Schwarzer, C., Mazur, M. A., and Artner, I. 2009. Lasp1 misexpression influences chondrocyte differentiation in the vertebral column. *The International Journal of Developmental Biology*, 53: 983–991.
- Hoffman, R. M. 2015. Application of GFP imaging in cancer. *Laboratory Investigation*, 95: 432–452.
- Hu, J.-J., Liu, Y.-W., He, M.-Y., Jin, D., Zhao, H., and Yu, B. 2014. Proteomic analysis on effectors involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of beagle bone marrow mesenchymal stem cells. *Proteome Science*, 12: 13.
- Hu, S., Ran, Y., Chen, W., Zhang, Y., and Xu, Y. 2017. MicroRNA-326 inhibits cell proliferation and invasion, activating apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting LIM and SH3 protein 1. *Oncology Reports*, 38: 1569–1578.
- Hu, Z., Cui, Y., Zhou, Y., Zhou, K., Qiao, X., Li, C., and Wang, S. 2016. MicroRNA-29a plays a suppressive role in non-small cell lung cancer cells via targeting LASP1. *OncoTargets and Therapy*, 9: 6999–7009.
- Hudson, R. S., Yi, M., Esposito, D., Watkins, S. K., Hurwitz, A. A., Yfantis, H. G., Lee, D. H., *et al.* 2012. MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. *Nucleic Acids Research*, 40: 3689–3703.
- Ichimi, T., Enokida, H., Okuno, Y., Kunimoto, R., Chiyomaru, T., Kawamoto, K., Kawahara, K., *et al.* 2009. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 125: 345–352.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., and Speed, T. P. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)*, 4: 249–264.
- Kamat, A. M., Hahn, N. M., Efsthathiou, J. A., Lerner, S. P., Malmström, P.-U., Choi, W., Guo, C. C., *et al.* 2016. Bladder cancer. *Lancet (London, England)*, 388: 2796–2810.
- Kang, G., Yun, H., Sun, C.-H., Park, I., Lee, S., Kwon, J., Do, I., *et al.* 2016. Integrated genomic analyses identify frequent gene fusion events and VHL inactivation in gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget*, 7: 6538–6551.
- Kang, H. C., Kim, I.-J., Park, J.-H., Shin, Y., Ku, J.-L., Jung, M. S., Yoo, B. C., *et al.* 2004. Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10: 272–284.
- Kaufman, D. S., Shipley, W. U., and Feldman, A. S. 2009. Bladder cancer. *Lancet (London, England)*, 374: 239–249.
- Kay, B. K. 2012. SH3 domains come of age. *FEBS letters*, 586: 2606–2608.
- Keicher, C., Gambaryan, S., Schulze, E., Marcus, K., Meyer, H. E., and Butt, E. 2004. Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324: 308–316.
- Khalili, A., and Ahmad, M. 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 18149–18184.

- Kołodziej, A., Krajewski, W., Matuszewski, M., and Tupikowski, K. 2016. Review of current optical diagnostic techniques for non-muscle-invasive bladder cancer. *Central European Journal of Urology*, 69: 150–156.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*, 11: 597–610.
- Lavery, H. J., Zaharieva, B., McFaddin, A., Heerema, N., and Pohar, K. S. 2017. A prospective comparison of UroVysion FISH and urine cytology in bladder cancer detection. *BMC cancer*, 17: 247.
- Leal, J., Luengo-Fernandez, R., Sullivan, R., and Witjes, J. A. 2016. Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *European Urology*, 69: 438–447.
- Li, B., Zhuang, L., and Trueb, B. 2004. Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 20401–20410.
- Li, F. 2009. Every Single Cell Clones from Cancer Cell Lines Growing Tumors In Vivo May Not Invalidate the Cancer Stem Cell Concept. *Molecules and cells*, 27: 491.
- Li, H., Xiang, Z., Liu, Y., Xu, B., and Tang, J. 2017a. MicroRNA-133b Inhibits Proliferation, Cellular Migration, and Invasion Via Targeting LASP1 in Hepatocarcinoma Cells. *Oncology Research*.
- Li, W., Li, H., Zhang, L., Hu, M., Li, F., Deng, J., An, M., *et al.* 2017b. Long non-coding RNA LINC00672 contributes to p53 protein-mediated gene suppression and promotes endometrial cancer chemosensitivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 292: 5801–5813.
- Li, Z., Chen, Y., Wang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Gao, Y., Weng, M., *et al.* 2016. LASP-1 induces proliferation, metastasis and cell cycle arrest at the G2/M phase in gallbladder cancer by down-regulating S100P via the PI3K/AKT pathway. *Cancer Letters*, 372: 239–250.
- Lim, U. M., Yap, M. G. S., Lim, Y. P., Goh, L.-T., and Ng, S. K. 2013. Identification of autocrine growth factors secreted by CHO cells for applications in single-cell cloning media. *Journal of Proteome Research*, 12: 3496–3510.
- Lin, Y. H., Park, Z.-Y., Lin, D., Brahmbhatt, A. A., Rio, M.-C., Yates, J. R., and Klemke, R. L. 2004. Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1. *The Journal of Cell Biology*, 165: 421–432.
- Loo, C.-S., Chen, C.-W., Wang, P.-J., Chen, P.-Y., Lin, S.-Y., Khoo, K.-H., Fenton, R. A., *et al.* 2013. Quantitative apical membrane proteomics reveals vasopressin-induced actin dynamics in collecting duct cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 17119–17124.
- Malats, N., and Real, F. X. 2015. Epidemiology of bladder cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 29: 177–189, vii.
- Mercurio, A. M., and Shaw, L. M. 1991. Laminin binding proteins. *BioEssays*, 13: 469–473.
- Mihlan, S., Reiß, C., Thalheimer, P., Herterich, S., Gaetzner, S., Kremerskothen, J., Pavenstädt, H. J., *et al.* 2013. Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene*, 32: 2107–2113.
- Mitra, A. P., Datar, R. H., and Cote, R. J. 2006. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24: 5552–5564.
- Mohammed, S. I., Dhawan, D., Abraham, S., Snyder, P. W., Waters, D. J., Craig, B. A., Lu, M., *et al.* 2006. Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: in vitro and in vivo effects. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5: 329–336.

- Mulhardt, C. 2010. *Molecular Biology and Genomics*. Academic Press. 273 pp.
- Nakagawa, H., Terasaki, A. G., Suzuki, H., Ohashi, K., and Miyamoto, S. 2006. Short-term retention of actin filament binding proteins on lamellipodial actin bundles. *FEBS letters*, 580: 3223–3228.
- Nikolsky, Y., Sviridov, E., Yao, J., Dosymbekov, D., Ustyansky, V., Kaznacheev, V., Dezso, Z., *et al.* 2008. Genome-wide functional synergy between amplified and mutated genes in human breast cancer. *Cancer Research*, 68: 9532–9540.
- Nishikawa, R., Goto, Y., Sakamoto, S., Chiyomaru, T., Enokida, H., Kojima, S., Kinoshita, T., *et al.* 2014. Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting of LASP1 in prostate cancer. *Cancer Science*, 105: 802–811.
- Niu, Y., Shao, Z., Wang, H., Yang, J., Zhang, F., Luo, Y., Xu, L., *et al.* 2016. LASP1-S100A11 axis promotes colorectal cancer aggressiveness by modulating TGF $\beta$ /Smad signaling. *Scientific Reports*, 6: 26112.
- Novina, C. D., and Sharp, P. A. 2004. The RNAi revolution. *Nature*, 430: 161–164.
- Okamoto, C. T., Li, R., Zhang, Z., Jeng, Y. Y., and Chew, C. S. 2002. Regulation of protein and vesicle trafficking at the apical membrane of epithelial cells. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 78: 35–41.
- Orth, M. F., Cazes, A., Butt, E., and Grunewald, T. G. P. 2015. An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1): a versatile structural, signaling, and biomarker protein. *Oncotarget*, 6: 26–42.
- Patriarca, C., Colombo, P., Pio Taronna, A., Wesseling, J., Franchi, G., Guddo, F., Naspro, R., *et al.* 2009. Cell discohesion and multifocality of carcinoma in situ of the bladder: new insight from the adhesion molecule profile (e-cadherin, Ep-CAM, and MUC1). *International Journal of Surgical Pathology*, 17: 99–106.
- Phillips, G. R., Anderson, T. R., Florens, L., Gudas, C., Magda, G., Yates, J. R., and Colman, D. R. 2004. Actin-binding proteins in a postsynaptic preparation: Lasp-1 is a component of central nervous system synapses and dendritic spines. *Journal of Neuroscience Research*, 78: 38–48.
- Pietzak, E. J. 2017. The Impact of Blue Light Cystoscopy on the Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer. *Current Urology Reports*, 18: 39.
- Pignot, G., Cizeron-Clairac, G., Vacher, S., Susini, A., Tozlu, S., Vieillefond, A., Zerbib, M., *et al.* 2013. microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *International Journal of Cancer*, 132: 2479–2491.
- Proctor, I., Stoeber, K., and Williams, G. H. 2010. Biomarkers in bladder cancer. *Histopathology*, 57: 1–13.
- Rachlin, A. S., and Otey, C. A. 2006. Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin. *Journal of Cell Science*, 119: 995–1004.
- Raman, D., Sai, J., Neel, N. F., Chew, C. S., and Richmond, A. 2010. LIM and SH3 protein-1 modulates CXCR2-mediated cell migration. *PloS One*, 5: e10050.
- Rigby, C. C., and Franks, L. M. 1970. A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *British Journal of Cancer*, 24: 746–754.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., and Minor, L. 2004. *Cell Viability Assays*. In *Assay Guidance Manual*. Ed. by G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, *et al.* Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/> (Accessed 21 August 2017).

- Ruggieri, V., Agriesti, F., Tataranni, T., Perris, R., and Mangieri, D. 2017. Paving the path for invasion: The polyedric role of LASP1 in cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39: 1010428317705757.
- Saluja, M., and Gilling, P. 2017. Intravesical bacillus Calmette–Guérin instillation in non-muscle-invasive bladder cancer: A review. *International Journal of Urology*: n/a-n/a.
- Salvi, A., Bongarzone, I., Miccichè, F., Arici, B., Barlati, S., and De Petro, G. 2009. Proteomic identification of LASP-1 down-regulation after RNAi urokinase silencing in human hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11: 207–219.
- Salvi, A., Bongarzone, I., Ferrari, L., Abeni, E., Arici, B., De Bortoli, M., Scuri, S., *et al.* 2015. Molecular characterization of LASP-1 expression reveals vimentin as its new partner in human hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 46: 1901–1912.
- Sánchez-Rivera, F. J., and Jacks, T. 2015. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature Reviews. Cancer*, 15: 387–395.
- Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E., and Lotan, Y. 2017. Bladder cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3: 17022.
- Schmitz-Dräger, C., Bonberg, N., Pesch, B., Todenhöfer, T., Sahin, S., Behrens, T., Brüning, T., *et al.* 2016. Replacing cystoscopy by urine markers in the follow-up of patients with low-risk non-muscle-invasive bladder cancer?—An International Bladder Cancer Network project. *Urologic Oncology*, 34: 452–459.
- Schreiber, V., Moog-Lutz, C., Régnier, C. H., Chenard, M. P., Boeuf, H., Vonesch, J. L., Tomasetto, C., *et al.* 1998. Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 4: 675–687.
- Segerer, S. E., Bartmann, C., Kaspar, S., Müller, N., Kapp, M., Butt, E., and Kämmerer, U. 2016. The cytoskeletal protein LASP-1 differentially regulates migratory activities of choriocarcinoma cells. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293: 407–414.
- Shao, Z., Cai, Y., Xu, L., Yao, X., Shi, J., Zhang, F., Luo, Y., *et al.* 2016. Loss of the 14-3-3 $\sigma$  is essential for LASP1-mediated colorectal cancer progression via activating PI3K/AKT signaling pathway. *Scientific Reports*, 6: 25631.
- Shimizu, F., Shiiba, M., Ogawara, K., Kimura, R., Minakawa, Y., Baba, T., Yokota, S., *et al.* 2013. Overexpression of LIM and SH3 Protein 1 leading to accelerated G2/M phase transition contributes to enhanced tumorigenesis in oral cancer. *PloS One*, 8: e83187.
- Sievert, K. D., Amend, B., Nagele, U., Schilling, D., Bedke, J., Horstmann, M., Hennenlotter, J., *et al.* 2009. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World Journal of Urology*, 27: 295–300.
- Sokolova, I. A., Halling, K. C., Jenkins, R. B., Burkhardt, H. M., Meyer, R. G., Seelig, S. A., and King, W. 2000. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in urine. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 2: 116–123.
- Song, T., Xia, W., Shao, N., Zhang, X., Wang, C., Wu, Y., Dong, J., *et al.* 2010. Differential miRNA expression profiles in bladder urothelial carcinomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 11: 905–911.
- Spence, H. J., McGarry, L., Chew, C. S., Carragher, N. O., Scott-Carragher, L. A., Yuan, Z., Croft, D. R., *et al.* 2006. AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 26: 1480–1495.

- Stölting, M., Wiesner, C., van Vliet, V., Butt, E., Pavenstädt, H., Linder, S., and Kremerskothen, J. 2012. Lasp-1 regulates podosome function. *PloS One*, 7: e35340.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., *et al.* 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 15545–15550.
- Sun, W., Guo, L., Shao, G., Liu, X., Guan, Y., Su, L., and Zhao, S. 2017a. Suppression of LASP-1 attenuates the carcinogenesis of prostatic cancer cell lines: Key role of the NF- $\kappa$ B pathway. *Oncology Reports*, 37: 341–347.
- Sun, W., Guo, L., Shao, G., Liu, X., Guan, Y., Su, L., and Zhao, S. 2017b. Suppression of LASP-1 attenuates the carcinogenesis of prostatic cancer cell lines: Key role of the NF- $\kappa$ B pathway. *Oncology Reports*, 37: 341–347.
- Takeshita, N., Mori, M., Kano, M., Hoshino, I., Akutsu, Y., Hanari, N., Yoneyama, Y., *et al.* 2012. miR-203 inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by regulating LASP1. *International Journal of Oncology*, 41: 1653–1661.
- Tang, R., Kong, F., Hu, L., You, H., Zhang, P., Du, W., and Zheng, K. 2012. Role of hepatitis B virus X protein in regulating LIM and SH3 protein 1 (LASP-1) expression to mediate proliferation and migration of hepatoma cells. *Virology Journal*, 9: 163.
- Tomasetto, C., Régnier, C., Moog-Lutz, C., Mattei, M. G., Chenard, M. P., Lidereau, R., Basset, P., *et al.* 1995a. Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics*, 28: 367–376.
- Tomasetto, C., Moog-Lutz, C., Régnier, C. H., Schreiber, V., Basset, P., and Rio, M. C. 1995b. Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains. *FEBS letters*, 373: 245–249.
- Traenka, C., Remke, M., Korshunov, A., Bender, S., Hielscher, T., Northcott, P. A., Witt, H., *et al.* 2010. Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma. *Cancer Research*, 70: 8003–8014.
- Traenka, J., Hauck, C. R., Lewandrowski, U., Sickmann, A., Gambaryan, S., Thalheimer, P., and Butt, E. 2009. Integrin-dependent translocation of LASP-1 to the cytoskeleton of activated platelets correlates with LASP-1 phosphorylation at tyrosine 171 by Src-kinase. *Thrombosis and Haemostasis*, 102: 520–528.
- Vaman V. S., A., Poppe, H., Houben, R., Grunewald, T. G. P., Goebeler, M., and Butt, E. 2015. LASP1, a Newly Identified Melanocytic Protein with a Possible Role in Melanin Release, but Not in Melanoma Progression. *PloS One*, 10: e0129219.
- van den Bosch, S., and Alfred Witjes, J. 2011. Long-term Cancer-specific Survival in Patients with High-risk, Non-muscle-invasive Bladder Cancer and Tumour Progression: A Systematic Review. *European Urology*, 60: 493–500.
- van Kessel, K. E. M., Beukers, W., Lurkin, I., Ziel-van der Made, A., van der Keur, K. A., Boormans, J. L., Dyrskjøt, L., *et al.* 2017. Validation of a DNA Methylation-Mutation Urine Assay to Select Patients with Hematuria for Cystoscopy. *The Journal of Urology*, 197: 590–595.
- Viticchiè, G., Lena, A. M., Latina, A., Formosa, A., Gregersen, L. H., Lund, A. H., Bernardini, S., *et al.* 2011. MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 10: 1121–1131.

- Wang, B., Feng, P., Xiao, Z., and Ren, E.-C. 2009a. LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 50: 528–537.
- Wang, B., Xiao, Z., and Ren, E. C. 2009b. Redefining the p53 response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 14373–14378.
- Wang, C., Zheng, X., Shen, C., and Shi, Y. 2012. MicroRNA-203 suppresses cell proliferation and migration by targeting BIRC5 and LASP1 in human triple-negative breast cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 31: 58.
- Wang, H., Li, W., Jin, X., Cui, S., and Zhao, L. 2013a. LIM and SH3 protein 1, a promoter of cell proliferation and migration, is a novel independent prognostic indicator in hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49: 974–983.
- Wang, H., An, H., Wang, B., Liao, Q., Li, W., Jin, X., Cui, S., *et al.* 2013b. miR-133a represses tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting LIM and SH3 protein 1 and inhibiting the MAPK pathway. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49: 3924–3935.
- Wang, H., Shi, J., Luo, Y., Liao, Q., Niu, Y., Zhang, F., Shao, Z., *et al.* 2014. LIM and SH3 protein 1 induces TGF $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer by regulating S100A4 expression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20: 5835–5847.
- Wang, L.-L., Wang, L., Wang, X.-Y., Shang, D., Yin, S.-J., Sun, L.-L., and Ji, H.-B. 2016a. MicroRNA-218 inhibits the proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis of gastric cancer cells by targeting LASP1. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37: 15241–15252.
- Wang, W., Ji, G., Xiao, X., Chen, X., Qin, W.-W., Yang, F., Li, Y.-F., *et al.* 2016b. Epigenetically regulated miR-145 suppresses colon cancer invasion and metastasis by targeting LASP1. *Oncotarget*, 7: 68674–68687.
- Wang, W., Shen, F., Wang, C., Lu, W., Wei, J., Shang, A., and Wang, C. 2017. MiR-1-3p inhibits the proliferation and invasion of bladder cancer cells by suppressing CCL2 expression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39: 1010428317698383.
- Weitzdörfer, R., Höger, H., Shim, K.-S., Cekici, L., Pollak, A., and Lubec, G. 2008. Changes of hippocampal signaling protein levels during postnatal brain development in the rat. *Hippocampus*, 18: 807–813.
- Witjes, J. A., Lebrecht, T., Compérat, E. M., Cowan, N. C., De Santis, M., Bruins, H. M., Hernández, V., *et al.* 2017. Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European Urology*, 71: 462–475.
- Xu, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, G., Ding, Y., and Zhao, L. 2014. Tumor suppressor miR-1 restrains epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma via the MAPK and PI3K/AKT pathway. *Journal of Translational Medicine*, 12: 244.
- Yamasaki, T., Seki, N., Yoshino, H., Itesako, T., Hidaka, H., Yamada, Y., Tatarano, S., *et al.* 2013. MicroRNA-218 inhibits cell migration and invasion in renal cell carcinoma through targeting caveolin-2 involved in focal adhesion pathway. *The Journal of Urology*, 190: 1059–1068.
- Yang, F., Zhou, X., Du, S., Zhao, Y., Ren, W., Deng, Q., Wang, F., *et al.* 2014. LIM and SH3 domain protein 1 (LASP-1) overexpression was associated with aggressive phenotype and poor prognosis in clear cell renal cell cancer. *PLoS One*, 9: e100557.

- Yeung, C., Dinh, T., and Lee, J. 2014. The health economics of bladder cancer: an updated review of the published literature. *Pharmacoeconomics*, 32: 1093–1104.
- Yoshino, H., Chiyomaru, T., Enokida, H., Kawakami, K., Tatarano, S., Nishiyama, K., Nohata, N., *et al.* 2011. The tumour-suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 104: 808–818.
- Yossepowitch, O., Herr, H. W., and Donat, S. M. 2007. Use of Urinary Biomarkers for Bladder Cancer Surveillance: Patient Perspectives. *The Journal of Urology*, 177: 1277–1282.
- Zhang, H., Li, Z., Chu, B., Zhang, F., Zhang, Y., Ke, F., Chen, Y., *et al.* 2016. Upregulated LASP-1 correlates with a malignant phenotype and its potential therapeutic role in human cholangiocarcinoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37: 8305–8315.
- Zhang, X., Zhang, Y., Liu, X., Fang, A., Li, P., Li, Z., Liu, T., *et al.* 2015. MicroRNA-203 Is a Prognostic Indicator in Bladder Cancer and Enhances Chemosensitivity to Cisplatin via Apoptosis by Targeting Bcl-w and Survivin. *PloS One*, 10: e0143441.
- Zhao, L., Wang, H., Liu, C., Liu, Y., Wang, X., Wang, S., Sun, X., *et al.* 2010. Promotion of colorectal cancer growth and metastasis by the LIM and SH3 domain protein 1. *Gut*, 59: 1226–1235.
- Zhao, T., Ren, H., Li, J., Chen, J., Zhang, H., Xin, W., Sun, Y., *et al.* 2015. LASP1 is a HIF1 $\alpha$  target gene critical for metastasis of pancreatic cancer. *Cancer Research*, 75: 111–119.
- Zheng, J., Yu, S., Qiao, Y., Zhang, H., Liang, S., Wang, H., Liu, Y., *et al.* 2014. LASP-1 promotes tumor proliferation and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140: 1891–1899.
- Zheng, J., Wang, F., Lu, S., and Wang, X. 2016. LASP-1, regulated by miR-203, promotes tumor proliferation and aggressiveness in human non-small cell lung cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 100: 116–124.



## 7. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1: T-Stadieneinteilung des Blasenkarzinoms.</b> Modifiziert aus Sanli <i>et al.</i> , 2017. .....	<b>3</b>
<b>Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänen des LASP1 Proteins.</b> Aus Orth <i>et al.</i> , 2015.....	<b>8</b>
<b>Abb. 3: Schema des Gitters einer Neubauer-Kammer.</b> Zellen im blau markierten Bereich und auf dicken blauen Linien werden gezählt.....	<b>31</b>
<b>Abb. 4: Schema zur Funktionsweise von siRNA.</b> siRNA ist ein doppelsträngiges Oligonukleotid. In der Zelle wird das Oligonukleotid zu Einzelsträngen aufgesplittet, der zur mRNA komplementäre Strang, der anti-sense Strang, bildet mit cytosolischen Proteinen den RISC und lagert an die mRNA an. Die mRNA wird daraufhin abgebaut. ....	<b>33</b>
<b>Abb. 5: Aufbau der endogenen microRNA-30 (oben) im Vergleich zum Aufbau der Haarnadelstruktur mit shRNA (unten).</b> Abbildung aus Handbuch des Herstellers. .....	<b>35</b>
<b>Abb. 6: Aufbau des Vectors, der bei der lentiviralen Transduktion in die Zielzellen eingebracht wird.</b> LTR: <i>Long terminal repeats</i> ; TRE: Tetracyclin responsables Element zur Aktivierung der Expression; tRFP: turboRFP als Marker der Expression; Puro <sup>r</sup> : Puromycin-Resistenzkassette zur Selektion. Aus dem Handbuch des Herstellers.....	<b>35</b>
<b>Abb. 7: Schema einer 48-Wellplatte für den Adhäsionsassay.</b> In den Zeilen befinden sich die verschieden behandelten Zellen, wildtypische und transduzierte, solche, die mit Doxycyclin (+Dox) vorbehandelt wurden oder nicht (-Dox). In den ersten fünf Wells wird ein Signal der adhärennten Zellen gemessen, nachdem diese 2h adhärnten und die nicht adhärennten mittels Waschen entfernt wurden. In den letzten drei Wells wird das Signal aller ausgesäeter Zellen bestimmt.....	<b>43</b>
<b>Abb. 8: Schema einer 48-Wellplatte für den Proliferationsassay.</b> In den Zeilen befinden sich die verschieden behandelten Zellen, wildtypische und transduzierte, solche, die mit Doxycyclin (+Dox) behandelt wurden oder nicht (-Dox). Die letzten beiden Wells einer Zeile wurden für einen Western Blot zur Kontrolle des Knockdowns geerntet. ....	<b>45</b>
<b>Abb. 9: Funktionsweise der Immunhistochemie.</b> Das Zielprotein in oder auf einer fixierten Zelle wird durch einen Erstantikörper spezifisch gebunden. Der Erstantikörper wird von einem Zweitantikörper gebunden, der ein Fluorophor oder Enzym trägt, welches die Detektion des Antikörpers ermöglicht. ....	<b>49</b>
<b>Abb. 10: Aufbau einer SDS-Page-Gelelektrophoresekammer.</b> ....	<b>55</b>
<b>Abb. 11: Anordnung von Membran und Gel beim Western Blot.</b> Das Gel liegt auf der Nitrocellulosemembran auf. Beides liegt zwischen zwei Schichten Whatman-Papier in einer mit Puffer gefüllten Kammer. Beim Anschluss der Spannung muss die Reihenfolge Kathode, Gel, Membran, Anode eingehalten werden. ....	<b>56</b>
<b>Abb. 12: Bandenhöhen des Western-Blot Markers.</b> Aus Handbuch des Herstellers. .....	<b>58</b>
<b>Abb. 13: LASP1 ist überexprimiert in Ta, T1-T4 Tumoren verglichen mit normalem Urothel.</b> Balkendiagramm mit Angabe des Gewebes und Auftragung der mRNA Expression als Mittelwert (natürliche Skala) mit Standardfehler des Mittelwerts. ** p<0,01; *** p<0,001. ....	<b>66</b>
<b>Abb. 14: Fotografien von T24 und RT4 Zellen.</b> Aufnahme unter Auflichtmikroskop. Die Zellen wachsen adhärennt.....	<b>67</b>

- Abb. 15: Fotografien von primärer Urothelkultur.** Aufnahmen unter Auflichtmikroskop. A und B zeigen die Zellen in Stadien verschiedenener Konfluenz..... 67
- Abb. 16: LASP1 ist überexprimiert in T24 und RT4 TCC-Zelllinien verglichen mit normalem Urothel.** Western Blot von primärem Urothel, T24 und RT4 für LASP1. Die Proben wurden für Aktin angeglichen. Es zeigt sich eine deutlich geringere LASP1-Expression im primärem Urothel..... 68
- Abb. 17: LASP1 ist hoch exprimiert in Blasenkrebs-Zelllinien.** Balkendiagramm mit Auftragung der Blasenkrebszelllinien im CCLE Projekt und deren Expression (log<sub>2</sub> transformiert); T24 rot, RT4 grün markiert. .... 69
- Abb. 18: tRFP Signal in Fluoreszenzmikroskop zeigt erfolgreiche lentivirale Transduktion.** Dargestellt sind (A) T24shLASP1 und (B) T24shControl Zellen nach dreitägiger Doxycyclingabe. .... 70
- Abb. 19: LASP1 wird durch shLASP1 in T24 und RT4 herunterreguliert.** Oben: Zeitverlauf mit Angabe der Tage Doxycyclinbehandlung (0,5 µg/ml) und der LASP1-Expression, bestimmt mittels Western Blot im Vergleich zu den gleichen Zellen ohne Doxycyclingabe. Unten: Western Blot für T24shLASP1 mit Aktin (als Housekeeping-Gen) und LASP1. Die Bandenzuordnung entspricht den Tagen auf der x-Achse des Diagramms oben. .... 71
- Abb. 20: Dichteplot für T24sLASP1 und -shControl Zellen mit und ohne Doxycyclingabe.** In grün Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenz; von links nach rechts zunehmende Fluoreszenz. Darüber Dichteplot für Fluoreszenz und SSC. Es zeigen sich Subpopulationen bei verschiedenen Fluoreszenzsignalintensitäten. . 72
- Abb. 21: Doxycyclingabe führt zum LASP1-KD in "low" und "high" gesorteten T24shLASP1 und RT4shLASP1 Zellen.** Balkendiagramme für transduzierte und sortierte T24 (oben) und RT4 (unten) Zellen. Angabe der Zelllinie und der Dox-Konzentration auf der x-Achse, im Western Blot bestimmte Protein-Expression auf der y-Achse (relativ zu Probe mit 0 µg/ml Dox, Mittelwert und Standardabweichung). Schwarze Balken repräsentieren Proben nach 3 Tagen, graue nach 5 Tagen Dox-Gabe; n=3..... 73
- Abb. 22: Die Expression der Bindepartner von LASP1 bleibt nach Doxycyclingabe gleich.** Es zeigt sich lediglich ein LASP1-KD bei den shLASP1-transduzierten Zellen. Western Blot mit Aktin als Ladekontrolle; exemplarische Darstellung. .... 74
- Abb. 23: LASP1 wird ausschließlich in shLASP1-transduzierten Zellen nach Dox-Gabe differentiell exprimiert; die Expression der LASP1 Bindepartner ist in allen Zelllinien mit und ohne Dox-Gabe gleich.** Balkendiagramme für T24 (oben) und RT4 (unten) Zellen. Auf der x-Achse sind die gemessenen Bindepartner aufgetragen, auf der y-Achse das Verhältnis der Aktin-normalisierten Protein-Expression in Zellen mit versus ohne Dox-Gabe. Die verschiedenen Balkenfarben indizieren die rechts angegebenen verschiedenen transduzierten und sortierten Zellen; n=3. .... 75
- Abb. 24: Die gemessene Absorption als Wert der Adhäsion verhält sich bei Verwendung von 96- und 48-Wellplatten ähnlich und ist linear zur verwendeten Zellzahl.** 10.000 bis 80.000 Zellen wurden für 4,5 h auf einer 48- (grün) und 96- (rot) Wellplatte ausgesät, PFA fixiert und mit KV gefärbt, danach wurde die Absorption des KV-Eluats bestimmt. Zellzahl auf x-Achse aufgetragen, Absorption relativ zu der maximalen Absorption in 48-Wellplatte angegeben; nicht durchgängige Linien zeigen optimalen linearen Verlauf des Signals; n=3. .... 78
- Abb. 25: Fibronektin steigert die Adhäsion von T24 und RT4, 50 % Adhärenz nach 2h erreicht.** Zeitverlauf der Adhäsion von T24 (oben) und RT4 (unten) wildtypischen Zellen auf unbeschichteten (blau) und Fibronektin beschichteten

- (lila) Platten. Adhäsionszeit als Stunden auf der x-Achse aufgetragen, auf der y-Achse der Anteil adhärenter Zellen in Prozent; rote Linie zeigt 50 %; n=3. .... 81
- Abb. 26: Vergleich der Adhärenz von T24 und RT4 Zellen an Gewebe- und Suspensionskulturplatten mit und ohne ohne Fibronektin- oder Kollagenbeschichtung.**  $1 \times 10^4$  Zellen wurden für 2h auf Gewebekulturplatten (grau) und Suspensionskulturplatten (schwarz) ausgesät mit der angegebenen Beschichtung; Auswertung mit CellTiter-Glo. Adhäsion als Mittelwert adhärenter Zellen in Prozent angegeben mit Standardabweichung; n=3. .... 82
- Abb. 27: LASP1-KD hat keinen Effekt auf die Adhäsion von T24 Zellen.** Links ist die Adhäsion der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Adhäsion von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt. n>=3; \* p<0,05..... 83
- Abb. 28: LASP1-KD hat keinen Effekt auf die Adhäsion von RT4 Zellen.** Links ist die Adhäsion der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Adhäsion von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt. n>=3..... 83
- Abb. 29: Dox verringert die Proliferation von T24 Zellen; LASP1-KD hat keinen einheitlichen Effekt auf Proliferaion im metabolischen Assay.** Links ist die Proliferation im metabolischen Assay der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert des Lumineszens-Signals nach 4-5 Tagen Proliferation von 5.000 Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Sterne auf den Balken geben die Signifikanz verglichen zur jeweiligen Kontrolle an, Sterne auf Klammern die Signifikanz zwischen den Enden selbiger. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt. n>=3; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. .... 85
- Abb. 30: LASP1-KD hat keinen Effekt auf gezählte Proliferation in T24 Zellen.** Links ist die gezählte Proliferation der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Anzahl Zellen nach 5 Tagen Proliferation von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Hier keine Darstellung von Western Blots, da dieselben Proben für Adhäsionsassays verwendet wurden und der KD bereits dort validiert wurde. n>=3. .... 86
- Abb. 31: Dox verringert die Proliferation von RT4 Zellen, LASP1-KD hat keinen einheitlichen Effekt auf Proliferaion im metabolischem Assay.** Links ist die Proliferation im metabolischem Assay der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox

behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert des Lumineszenz-Signals nach 4-5 Tagen Proliferation von 4.000 Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Sterne auf den Balken geben die Signifikanz verglichen zur jeweiligen Kontrolle an, Sterne auf Klammern die Signifikanz zwischen den Enden selbiger. Unter den Balkendiagrammen sind jeweils exemplarische Western Blots zu den darüber angegebenen Bedingungen mit Aktin als Housekeeping-Gen und LASP1 dargestellt. n>=3; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. .... 87

**Abb. 32: LASP1-KD hat keinen Effekt auf gezählte Proliferation in RT4 Zellen.**

Links ist die gezählte Proliferation der wildtypischen und shRNA-transduzierten Zellen, rechts die der transient transfizierten Zellen als Balkendiagramme dargestellt; in grau jeweilige Kontrollbedingungen, schwarz Dox behandelte Zellen bzw. mit siLASP1 transfizierte Zellen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Anzahl Zellen nach 5 Tagen Proliferation von Dox behandelten bzw. siRNA transfizierten Zellen relativ zur jeweiligen Kontrolle mit Standardabweichung. Hier keine Darstellung von Western Blots, da dieselben Proben für Adhäsionsassays verwendet wurden und der KD bereits dort validiert wurde. n>=3. .... 87

**Abb. 33: Dox und LASP1-KD zeigen keinen Effekt auf Klonogenität von T24 und RT4.**

Exemplarische Darstellung von Wells mit durch Kristallviolett gefärbten Kolonien von shControl-high (links) und shLASP1-high (rechts) T24 (oben) und RT4 (unten) Zellen. 1.000 Zellen wurden ausgesät, Auswertung nach 6 Tagen... 89

**Abb. 34: LASP1-KD reduziert die Migration von T24 und RT4 Zellen.**

Links Mittelwerte für Migration relativ zur Kontrolle ohne Dox für transduzierte und "high" sortierte T24 Zellen, rechts für RT4 Zellen als Balkendiagramme aufgetragen. Fehlerindizes geben Standardabweichung an, graue Balken repräsentieren Zellen ohne Dox, schwarze mit Dox Inkubation. Sterne über Klammern geben die Signifikanz eines Unterschiedes zwischen den Enden an. Darunter exemplarische Western Blots für die darüber bezeichneten Proben mit Aktin und LASP1. n=3; \*\* p>0,01; \*\*\* p<0,001. .... 90

**Abb. 35: LASP1 erscheint prädominant cytosolisch lokalisiert und kolokalisiert mit Aktin an Zellfortsätzen; pLASP1 Färbung findet sich vor allem im Bereich des Zellkerns.**

Überlagerung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von T24 Zellen als einzelne Zellen (A, C) und im als Zellverband (B, D). Zellkern mit DAPI blau gefärbt, Aktin grün (Oregon green), LASP1 (A, B) und pLASP1 (C, D) rot (Cy3)..... 91

**Abb. 36: Auch nach Hungern ohne FCS über Nacht zeigt sich die gleiche Verteilung von LASP1 und pLASP1 wie bei Wachstum in FCS (zum Vergleich Abb. 35).**

Überlagerung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von über Nacht FCS gehungerten RT4 Zellen als einzelne Zellen (A, C) und im Verband (B, D). Zellkern mit DAPI blau gefärbt, Aktin grün (Oregon green), LASP1 (A, B) und pLASP1 (C, D) rot (Cy3). .... 92

**Abb. 37: pLASP1 und LASP1 sind im nukleären Kompartiment nachweisbar in T24 und RT4 Zellen; Stimulation mit FCS und Forskolin führt zu erhöhtem cytosolischem pLASP1 und erhöhtem nukleärem LASP1 und pLASP1.**

Western Blot für T24 (links) und RT4 (rechts). Banden zeigen abwechselnd das cytosolische (C) und nukleäre (N) Fragment nach Hungern (-FCS), Hungern und Stimulation mit Forskolin (+Forskolin), Stimulation mit FCS und Stimulation mit FCS und Forskolin. Oben sind Western Blots für Aktin und LASP1, unten für Aktin und pLASP1 dargestellt. Es wurde cytosolisches Lysat und nukleäres Lysat im Verhältnis 1:3 aufgetragen; nukleäres Kompartiment wurde zuvor im halben Volumen Lyse-Puffer im Vergleich zum cytosolischem Präparat aufgenommen. . 93

**Abb. 38: Stimulation von T24 und RT4 Zellen führt zu erhöhtem cytosolischem pLASP1.**

Balkendiagramm basierend auf Western Blot Analysen für T24 und RT4

- mit Darstellung des Mittelwertes des cytosolischen pLASP1 relativ zu dem in gehungerten Zellen. Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung. .... 94
- Abb. 39: Das nukleäre Gesamt-LASP1 und pLASP1 steigt mit zunehmender Stimulation von T24 und RT4 Zellen mit FCS und Forskolin im Verhältnis zum cytosolischem Gesamt-LASP1 bzw. pLASP1.** Balkendiagramme für den Anteil nukleären LASP1 (links) und nukleären pLASP1 (rechts) im Verhältnis zum jeweils cytosolischen in T24 und RT4. Verschiedene Grauschattierungen zeigen die Stimulation der Zellen an, Fehlerbalken die Standardabweichung; n=3. .... 95
- Abb. 40: *LASP1*-Expression erscheint in der GSEA mit Proliferation, Metastasierung und Doxorubicin-Resistenz assoziiert.** Dargestellt sind exemplarische GSEA für verschiedene Gen-Sets, die im jeweiligen Titel angegeben sind. Von rot nach blau sind die *LASP1* co- bis antikorrelierten Gene aufgetragen, jeder schwarze Balken steht für ein Gen im Spektrum der korrelierten Gene, das auch im Gene-Set vorhanden ist. An jeder Position von links nach rechts nimmt der Enrichment-Score bei einem solchen Treffer zu, gewichtet nach Korrelation, sonst fällt er ab. Daraus ergibt sich der NES, der mit dem für multiples Testen korrigiertem p-Value unter den jeweiligen Analysen angegeben ist. .... 98
- Abb. 41: miR-203 ist hochsignifikant negativ korreliert mit *LASP1*-Expression im Blasenkarzinom.** Auf der x-Achse des Volcano-Plots ist der log<sub>2</sub>-transformierte Fold-Change zwischen den Counts einer bestimmten miR in der Hälfte der Patienten mit höherer *LASP1*-Expression vs. der Hälfte mit niedrigerer aufgetragen, auf der y-Achse der negative 10er Logarithmus des p-Values für einen Unterschied im miR-Count in Patienten mit hoher und niedriger *LASP1*-Expression. Jeder Punkt repräsentiert eine miR, grün markiert sind solche mit signifikanter negativer Korrelation mit *LASP1*-Expression, rot miR-203. .... 100
- Abb. 42: *LASP1* hoch exprimierende Patienten zeigen keinen Überlebensvorteil oder Nachteil im Gesamt- und eventfreiem Überleben.** Kaplan-Meier-Plots für Gesamtüberleben (links) und eventfreies Überleben (rechts). Auf der x-Achse ist die Überlebenszeit, auf der y-Achse die Rate noch Überlebender zum jeweiligen Zeitpunkt aufgetragen. *LASP1* hoch exprimierende Patienten (Top 33%) sind im roten Graph dargestellt, die anderen im blauen Graph. Der p-Value wurde mit dem Mantel-Haenszel-Test berechnet. .... 101
- Abb. 43: "Low" sortierte T24 Zellen erscheinen kleiner als "high" sortierte, nicht-sortierte transduzierte und wildtypische T24 Zellen in der Durchflusszytometrie.** Dargestellt sind die Counts für die verschiedenen Zellgrößen (FSC-H). M1 umfasst 80% aller T24sh*LASP1*-high, M2 80% aller T24shControl-high Zellen. .... 104
- Abb. 44: Lentivirale Transduktion, Selektion und Sortieren verändern das Proliferationsverhalten von T24 und RT4 Zellen.** Dargestellt sind die Proliferationsraten nach drei Tagen relativ zu der Proliferationsrate wildtypischer Zellen für T24 (links) und RT4 (rechts) als Balkendiagramme. Sterne zeigen das Signifikanzniveau einer veränderten Proliferationsrate im Bezug auf wildtypische Zellen bzw. die entsprechenden nicht sortierten Zellen (Markierung des Bezugs mit Klammern). Signifikanz wurde mittels gepaartem zweiseitigem t-Test auf Basis der Proliferationsraten berechnet. n=3; \* p<0,05; \*\* p<0,01. .... 105
- Abb. 45: Nachselektion erhöht den Anteil fluoreszierender Zellen, shControl-transduzierte Zellen verlieren an Fluoreszenz über sechs Passagen.** Dargestellt sind die Fluoreszenz (x-Achse) und die entsprechenden Counts (y-Achse) für T24shControl-high, T24sh*LASP1*-high und RT4shControl-high (von oben nach unten), je zwei Plots links ohne Nachselektion, rechts mit Nachselektion; in den jeweiligen Paaren wiederum rechts Zellen, die sechs Passagen nach denen links eingefroren wurden. 30.000 Events wurden gezählt,

Markerbereiche M1-M3 (von links nach rechts) für "no", "low" und "high"  
Fluoreszenz gesetzt..... **107**

## 8. Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CIS	Carcinoma in situ
CFA	Colony-Forming-Assay, Klonogenitätsassay
CT	Computertomographie
CER	Cytoplasmic Extraction Reagent
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyclin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECL	Elektrochemilumineszenz
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal Calf Serum
FE	Fisher-Exakt Test
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FSC	Forward Scatter
GSEA	Gene-Set Enrichment Analysis
KD	Knockdown
KV	Kristallviolett
LLD	<i>lowest lethal dosis</i>
MWU	Mann-Whitney-U-Test
MMP	Matrixmetalloproteinase
miR	microRNA
MOI	<i>multiplicity of infection</i>

NES	normalisierter Enrichment-Score
NER	Nuclear Extraction Reagent
PFA	Paraformaldehyd
PAGE	Polyacrylamidgel
PCR	Polymerase Chain Reaction
RISC	<i>RNA-induced-silencing complex</i>
pLASP1	Serin-146 phosphoryliertes LASP1
SCC	Side Scatter
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat, Natriumdodecylsulfat
SRB	Sulforhodamin B
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCC	Transitionalzellkarzinom, Urothelkarzinom
TCA	Trichloressigsäure



## Danksagung

Mein Dank geht zuerst und vor allem an Frau Prof. Elke Butt für die Zuteilung des Themas, die stetige Betreuung der Doktorarbeit und die Unterstützung und Kooperation weit über diese Arbeit hinaus. Ein besonderer Dank geht auch an Frau Petra Thalheimer für die Einarbeitung in die Methoden und technische Hilfe. Frau Dr. Cora Reiß, Centrum für Thrombose und Hämostase der Universitätsmedizin Mainz, möchte ich danken für die Einführung ins Labor und die Methodik, speziell die der lentiviralen Transduktion, und die anfängliche Betreuung. Frau Dr. Amelie Hailer, internistische Assistenzärztin Klinikum Kaufbeuren, danke ich herzlichst für viele anregende Diskussionen, ihre Freundschaft und Hilfe in vielen Lebenslagen. Herrn Dr. Thomas Grünewald, Leiter der Max-Eder-Nachwuchsgruppe für pädiatrische Sarkombiologie am Institut für Pathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, möchte ich für lohnende ausgiebige Diskussionen und Einblicke in die Bioinformatik danken. Des Weiteren danke ich Herrn Peter Ardelt, Oberarzt der Urologie des Universitätsspitals Basel, für die Zusendung der Urothel-Präparate.

Ohne die Unterstützung dieser Personen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Nochmals vielen Dank für diese lohnende Erfahrung.

Zuletzt danke ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes e.V. für die Förderung während meiner Studienzeit.

## Publikationsverzeichnis

- Baldauf MC\*, **Orth MF\***, Dallymayer M\* *et al.* Robust diagnosis of Ewing sarcoma by immunohistochemical detection of super-enhancer-driven EWSR1-ETS targets. *Oncotarget*, 2017
- Boeva V, Louis-Brennetot C, Peltier A, Durand S, Pierre-Eugène C, Raynal V, Etchevers HC, Thomas S, Lermine A, Daudigeos-Dubus E, Georger B, **Orth MF** *et al.* Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries. *Nature Genetics*, 2017 Sep;49(9):1408-1413
- Sannino G, **Orth MF**, Grünewald TG. Next steps in Ewing sarcoma (epi-)genomics. *Future Oncology*, 2017 Jun;13(14):1207-1211
- Elia I, Broekaert D, Christen S, Boon R, Radaelli E, **Orth MF** *et al.* Proline metabolism supports metastasis formation and could be inhibited to selectively target metastasizing cancer cells. *Nature Communications*, 2017 May 11;8:15267
- Christen S, Lorendeau D, Schmieder R, Broekaert D, Metzger K, Veys K, Elia I, Buescher JM, **Orth MF** *et al.* Breast Cancer-Derived Lung Metastases Show Increased Pyruvate Carboxylase-Dependent Anaplerosis. *Cell Reports*, 2016 Oct 11;17(3):837-848
- Endres M, Kneitz S, **Orth MF** *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) expression and secretion in MDA-MB-231 breast cancer cells by LIM and SH3 protein 1 (**LASP1**). *Oncotarget*, 2016 Sep 27; 7(39):64244-64259
- Musa J, **Orth MF** *et al.* Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1): A master regulator of mRNA translation involved in tumorigenesis. *Oncogene*, 2016 Sep 8;35(36):4675-88
- **Orth MF** *et al.* An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (**LASP1**): a versatile structural, signaling, and biomarker protein. *Oncotarget*, 2015 Jan 1;6(1):26-42

- Hailer A, Grunewald TG, **Orth M** *et al.* Loss of tumor suppressor mir-203 mediates overexpression of LIM and SH3 Protein 1 (**LASP1**) in high-risk prostate cancer thereby increasing cell proliferation and migration. *Oncotarget*, 2014 Jan 30;5(12):4144-4153