

Biologie

Dissertationsthema

Zur Bedeutung des S100P im kortikalen Zytoskelett

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Judith Austermann

aus Münster

2007

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Sachser
Erster Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Gerke
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Schmidt
Tag der mündlichen Prüfung:	06.12.2007
Tag der Promotion:	14.12.2007

Meinen Eltern

1. Einleitung	1
1.1 Calcium-bindende Proteine	1
1.1.1 Die S100 Proteinfamilie	1
1.1.1.1 Spezifische Expression und intrazelluläre Funktionen der S100 Proteine	4
1.1.1.2 S100 Proteine und Tumore	6
1.1.1.3 Extrazelluläre Funktionen der S100 Proteine	7
1.1.2 S100P	8
1.2 Die ERM-Proteinfamilie	11
1.2.1 Ezrin	15
1.2.1.1 Die Aktivierung des Ezrin-Moleküls	17
1.2.1.2 Funktionen von Ezrin und anderen ERM-Proteinen in der Tumorzell-.....	
migration	18
1.3 Zielsetzung	22
2. Material	23
2.1 Zelllinien	23
2.2 Bakterienstämme	23
2.3 Antikörper	24
2.3.1 Primärantikörper	24
2.3.2 Sekundärantikörper	24
2.4 Enzyme	25
2.5 Vektoren und DNA-Konstrukte	25
2.5.1 Vektoren	25
2.5.2 DNA-Konstrukte	25
2.6 Oligonucleotide	27
2.7 Zellkulturmedien	28
2.8 Chemikalien und sonstige Hilfsmittel	29
2.8.1 Chemikalien	29
2.8.2 Allgemeine Materialien	30
2.8.3 Geräte	31
2.8.4 Mikroskopie	32
2.8.5 Zentrifugen	32
3. Methoden	33
3.1 Kultivierung von Bakterien	33
3.1.1 Bestimmung des Bakteriumwachstums (Trübungsmessung)	33
3.1.2 Erzeugung kompetenter <i>E. coli</i>	34
3.1.2.1 Erzeugung elektrokompenter <i>E. coli</i> TOP10F'	34

3.1.2.2	Erzeugung Calcium-kompetenter <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	34
3.1.3	Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i>	34
3.1.4	Transformation Calcium-kompetenter <i>E. coli</i>	35
3.2	DNA-Techniken.....	35
3.2.1	Plasmidisolierung aus Bakterien.....	35
3.2.1.1	Plasmidisolierung im Mini-Format.....	35
3.2.1.2	Plasmidisolierung im Maxi-Format (Plasmid-purification Kit; Genomed)....	36
3.2.2	RNA-Isolierung.....	36
3.2.3	Bestimmung von DNA-/RNA-Konzentrationen.....	36
3.2.4	Reverse-Transkriptase (RT-PCR).....	37
3.2.4.1	Ribonuclease H-Verdau.....	37
3.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	38
3.2.5.1	PCR Bedingungen zum Nachweis der Expression des endogenen S100P in... verschiedenen Zelllinien.....	38
3.2.5.2	PCR Bedingungen zur Erzeugung C-terminal verkürzter Ezrin- und S100P-.. Konstrukte.....	39
3.2.5.3	PCR Bedingungen zur Erzeugung der Ezrin T567D und T567A Konstrukte	40
3.2.5.4	PCR Bedingungen zur Erzeugung des S100P pa Konstruktes.....	41
3.2.6	Reinigung von PCR-Produkten.....	44
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
3.2.7.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (QIAquick Gel..... Extraction Kit).....	44
3.2.8	Restriktion.....	45
3.2.9	Ligation.....	45
3.2.10	Klonierung der DNA-Konstrukte.....	46
3.2.10.1	Generierung der C-terminal verkürzten S100P und Ezrin Konstrukte.....	46
3.2.10.2	Generierung der Ezrin T567A und T567D Konstrukte.....	46
3.2.10.3	Generierung des S100P pa Konstruktes.....	46
3.2.11	DNA-Sequenzierung.....	47
3.3	Zellbiologische Methoden.....	47
3.3.1	Passagieren von adhären wachsenden Zellen.....	47
3.3.2	Zellzahlbestimmung.....	47
3.3.3	Einfrieren von Zellen.....	48
3.3.4	Auftauen von Stickstoffkulturen.....	48
3.3.5	Erzeugung stabiler HTB58-Mischklonpopulationen.....	48
3.3.6	Stimulierung von Zellen.....	48
3.3.7	Transfektion von Säugerzellen.....	49

3.3.7.1 Liposomen vermittelte Transfektion.....	49
3.3.7.1.A Transfektion mit Effectene.....	49
3.3.7.2 Transfektion mittels Elektroporation.....	49
3.3.7.2.A Elektroporation.....	49
3.3.7.2.B Nukleofektion von A431-Zellen (Amaxa).....	50
3.3.8 Immunfluoreszenz.....	50
3.3.9 Transendothelialer Migrationstest (Transwellssystem).....	51
3.3.9.1 Vorbereitung der Transwell-Filter.....	51
3.3.9.2 Durchführung des transendothelialen Migrationstests.....	51
3.3.9.3 Kontrollfärbung der Endothel-Monolayer.....	51
3.3.9.4 Messung der Transmigrationsrate mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	52
3.3.10 Herstellung von Zelllysaten.....	53
3.3.10.1 Zellyse mittels heißem 4fach SDS-Probenpuffer.....	53
3.3.10.2 Erzeugung von Zelllysaten mit Lysispuffer.....	53
3.3.11 Anreicherung von endogenem S100P aus Zelllysaten.....	54
3.4 Proteinbiochemische Methoden.....	54
3.4.1 Proteinbestimmung.....	54
3.4.2 TCA-Fällung von Proteinen.....	54
3.4.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.4.3.1 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue.....	55
3.4.3.2 Proteinfärbung mit Silber.....	56
3.4.3.3 Trocknung von Polyacrylamidgelen.....	56
3.4.4 Westernblot.....	57
3.4.4.1 Transfer.....	57
3.4.4.2 Proteinfärbung.....	57
3.4.4.3 Immunodetektion von Proteinen auf Membranen.....	58
3.4.4.4 Strippen von Membranen.....	58
3.4.5 Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	59
3.4.5.1 Rekombinante Expression der Proteine in <i>E. coli</i>	59
3.4.5.2 Reinigung rekombinant exprimierter Proteine.....	61
3.4.5.2.A Reinigung von His ₆ -Fusionsproteinen.....	61
3.4.5.2.B Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	62
3.4.5.2.C Reinigung von unfusionierten Proteinen.....	62
3.4.6 Abspaltung des His ₆ - oder GST- <i>Tag</i> durch Thrombinverdau.....	64
3.4.7 <i>In vitro</i> -Bindungsstudien.....	65
3.4.7.1 Charakterisierung der S100P-Ezrin Bindungsstellen.....	65
3.4.7.2 Charakterisierung der Ca ²⁺ -Abhängigkeit der S100P pa-Ezrin Interaktion.....	66

3.4.8	Charakterisierung der hydrophoben Eigenschaften des S100P pa Proteins	67
3.4.9	Chemisches Vernetzen von S100P Proteinen.....	67
3.4.10	Liposomen-Co-Sedimentation.....	68
4.	Ergebnisse	69
4.1	Kartierung des S100P-Ezrin Interaktionsmotivs	69
4.1.1	Generierung und Reinigung rekombinanter Ezrin und S100P Proteine	70
4.1.1.1	Rekombinante Expression C-terminal verkürzter Ezrin Proteine	70
4.1.1.2	Rekombinante Expression C-terminal verkürzter S100P Proteine	73
4.1.2	<i>In vitro</i> Bindungsstudien	76
4.1.2.1	Identifizierung der S100P-Bindungsstelle innerhalb des Ezrin Moleküls	76
4.1.2.2	Identifizierung der Ezrin-Bindungsstelle innerhalb des S100P Moleküls	78
4.1.3	Dimerisierungseigenschaften C-terminal verkürzter S100P Proteine	80
4.2	S100P-vermittelte, PtdIns(4,5)P ₂ -unabhängige Aktivierung des Ezrin Moleküls	82
4.3	Relevanz der S100P-Ezrin Interaktion in der Tumorzellmigration	85
4.4	Expression und Lokalisation von endogenem S100P und Ezrin in humanen Zelllinien	89
4.4.1	Untersuchung der Expression von endogenem S100P in humanen Zelllinien	90
4.4.1.1	Nachweis des endogenen S100P auf Proteinebene.....	90
4.4.1.1	Nachweis von endogenem S100P auf mRNA-Ebene.....	92
4.4.2	Lokalisation von endogenem S100P und Ezrin in humanen Zelllinien.....	93
4.5	Relevanz von Ca ²⁺ für die S100P-Ezrin Interaktion.....	96
4.5.1	Rekombinante Expression des permanent aktiven S100P pa Proteins	99
4.5.2	Hydrophobe Eigenschaften des S100P pa Proteins	101
4.5.3	<i>In vitro</i> Bindungsstudien	103
4.5.4	Ektopische Expression und subzelluläre Lokalisation des S100P pa Fusionproteins in A431 Zellen.....	105
5.	Diskussion	111
5.1	Expression und Lokalisation von endogenem S100P und Ezrin in humanen Zelllinien ...	112
5.2	Die S100P-Ezrin Interaktion.....	114
5.2.1	Expression und Reinigung rekombinant exprimierter S100P- und Ezrin-Derivate.....	114
5.2.2	Kartierung des S100P-Ezrin Interaktionsmotivs und Analyse des S100P-vermittelten Aktivierungsmechanismus.....	115
5.2.3	Relevanz von Ca ²⁺ für die S100P-Ezrin Interaktion.....	121
5.3	Die S100P-Ezrin Interaktion in der Tumorzellmigration	126
6.	Zusammenfassung.....	129
7.	Literaturverzeichnis.....	131

8. Anhang	142
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	142
8.2 Sequenzen	146
8.2.1 Sequenz Ezrin human (gi 31282)	146
8.2.2 Sequenz S100P human (gi 36177).....	147

1. Einleitung

1.1 Calcium-bindende Proteine

Das Ca^{2+} -Ion ist ein ubiquitärer cytosolischer Botenstoff. Der cytosolische Ca^{2+} -Spiegel einer nichterregten Zelle liegt typischerweise bei ca. 100 nM, verglichen mit einer extrazellulären Konzentration von 1,5 mM. Ein Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum oder dem Endoplasmatischen Reticulum bedingt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und führt über die Bindung an Calcium-Sensor-Proteine zur Aktivierung von zahlreichen Signalwegen.

Die Superfamilie der EF-Hand Proteine repräsentiert die größte und am besten charakterisierte Gruppe Calcium-bindender Proteine und umfasst im humanen Genom etwa 600 Mitglieder (Santamaria-Kisiel *et al.*, 2006). Sie haben ein gemeinsames Strukturmotiv, das EF-Hand-Motiv, welches eine Ca^{2+} -bindende Schleife, flankiert von zwei α -Helices, beinhaltet. Ein grundlegendes Strukturmerkmal aller EF-Hand Proteine ist das Doppel-EF-Hand Motiv, das für die korrekte Faltung der Proteine und die Kooperativität der Bindung benötigt wird (Shaw *et al.*, 1990). Zu der Gruppe der EF-Hand-Proteine gehören unter anderem Calmodulin, Troponin C, Parvalbumin und die S100 Proteine.

1.1.1 Die S100 Proteinfamilie

S100-Proteine wurden erstmals 1965 (Moore 1965) identifiziert und bilden mit bisher 25 im humanen Genom identifizierten Mitgliedern die größte Untergruppe innerhalb der Calcium-bindenden EF-Hand Proteine. Die S100 Proteine sind verhältnismäßig kleine und saure Proteine, die ein apparentes Molekulargewicht von 10-12 kDa besitzen. Sie bilden typischerweise Homodimere, können aber in einigen Fällen auch heterodimere Strukturen mit anderen S100 Proteinen ausbilden. Eine Ausnahme bildet Calbindin welches stets als Monomer vorliegt (Santamaria-Kisiel *et al.*, 2006). Bisher wurden S100 Proteine ausschließlich in Vertebraten identifiziert (Schäfer and Heizmann, 1996) und S100 Proteine weisen untereinander eine 25-65 %ige Sequenzhomologie auf. Sie besitzen sowohl im C- als auch im N-Terminus Ca^{2+} -bindende EF-Hand Domänen, die über eine zentrale Sequenz miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1).

Die C-terminale EF-Hand der S100 Proteine stellt eine klassische EF-Hand dar, die einen typischen aus 12 Aminosäuren bestehenden Bindungsloop beinhaltet, der von zwei α -Helices (H_{III} und H_{IV}) flankiert wird. Im Gegensatz dazu besteht der N-terminale EF-Hand-Loop aus 14 Aminosäuren, der von zwei α -Helices (H_{I} und H_{II}) flankiert wird. Dieses abgewandelte EF-Hand-Motiv wird als „S100 spezifische EF-Hand“ oder „pseudo-EF-Hand“ bezeichnet

und ist ausschließlich bei S100 Proteinen zu finden (Marenholz *et al.*, 2004). Die Modifikation der Ca^{2+} -bindenden Schleife der N-terminalen EF-Hand führt zu einer signifikanten Verringerung ihrer Ca^{2+} -Affinität (Baudier and Gerard, 1986). Während die klassischen EF-Hände Dissoziationskonstanten von 1-50 μM aufweisen, wurden für die N-terminalen „S100-spezifischen EF-Hände“ lediglich Dissoziationskonstanten von 200-500 μM ermittelt (Baudier and Gerard, 1986; Becker *et al.*, 1992; Fohr *et al.*, 1995; Pedrocchi *et al.*, 1994). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass unter intrazellulären Bedingungen eine Koordination des Ca^{2+} nur über die C-terminale EF-Hand erfolgt.

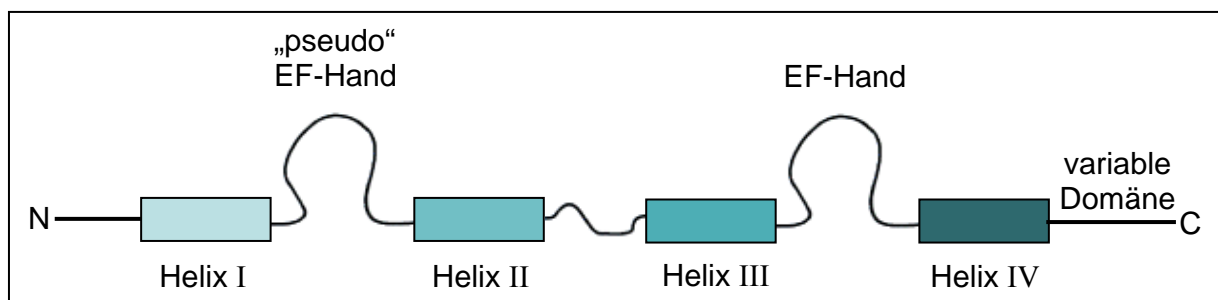


Abbildung 1: Schematische Darstellung des S100 Proteins

S100 Proteine besitzen zwei Ca^{2+} -bindende EF-Hand-Domänen, die unterschiedliche Ca^{2+} -Affinitäten besitzen. Die EF-Hände sind über eine zentrale Region miteinander verbunden, die zusammen mit dem C-Terminus den variabelsten Bereich innerhalb der S100 Proteine darstellt.

Generell binden S100 Proteine vier Ca^{2+} -Ionen pro Dimer. Wie viele andere EF-Hand Proteine, können S100 Proteine auch Mg^{2+} -Ionen mit ihren EF-Hand Motiven binden, allerdings sind die Affinitäten für Mg^{2+} sehr gering ($K_d = 1-125 \text{ mM}$) weshalb das Mg^{2+} unter physiologischen Bedingungen (Mg^{2+} Konzentration von 0,5 mM) keinen Einfluss auf die Ca^{2+} -Bindung hat.

Neben Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen vermögen einige S100 Proteine auch Zn^{2+} -Ionen mit unterschiedlich hohen Affinitäten ($K_d = 4 \text{ nM}$ bis 2 mM) zu binden. Interessanterweise zeigt S100A3 die höchste Affinität zu Zn^{2+} -Ionen ($K_d = 4 \text{ nM}$), besitzt aber unter den S100 Proteinen gleichzeitig die geringste Affinität für Ca^{2+} -Ionen ($K_d = \sim 20 \text{ mM}$). Daher scheint S100A3 eher als Zn^{2+} -bindendes Signalprotein zu fungieren. Allerdings sind im Zytoplasma der Zelle nur geringe Konzentrationen an freiem Zn^{2+} (2-10 nM) vorhanden, so dass eine Bindung von Zn^{2+} *in vivo* für die meisten S100 Proteine unwahrscheinlich ist, wie im Falle von S100B und S100A6 bereits bestätigt werden konnte (Fritz *et al.*, 2002). Dagegen könnte in Vesikeln (Zn^{2+} -Konzentration im μM bis mM Bereich) oder dem extrazellulären Raum (Zn^{2+} -Konzentration im mM Bereich) eine Bindung von Zn^{2+} -Ionen erfolgen.

Als ein weiteres metallisches Ion, das an S100 Proteine bindet wurde Cu^{2+} identifiziert. So wurde für S100B ($K_d = 0,46 \mu\text{M}$) und S100A5 ($K_d = \sim 4 \mu\text{M}$) eine Bindung von vier Cu^{2+} -

Ionen pro Homodimer festgestellt (Übersicht in Marenholz *et al.*, 2004). Für S100B konnte darüberhinaus gezeigt werden, dass die Bindung von Cu^{2+} -Ionen eine schützende Wirkung auf Neuronen hat. So wird S100B u.a. bei Rindern verstärkt im Gehirn exprimiert, wo es effizient Cu^{2+} -Ionen bindet und dadurch, von Cu^{2+} -Ionen hervorgerufene Zellschäden verhindert (Shiraishi and Nishikimi, 1998).

Die EF-Hände der S100 Proteine werden durch eine kurze Region, die zwischen den Helices H_{II} und H_{III} lokalisiert ist, verknüpft (siehe Abbildung 1). Darüber hinaus besitzen fast alle Mitglieder der S100 Familie N- und C-terminale Regionen deren Länge innerhalb der S100 Familie variabel ist. Diese weniger konservierten Bereiche und die Verbindungsregion zwischen den Helices H_{II} und H_{III} sind maßgeblich an der Bindung von Effektorproteinen beteiligt. Gleichzeitig erhöht die geringe Homologie innerhalb dieser Sequenzen die Spezifität der Wechselwirkung der einzelnen S100 Proteine mit gezielten Effektorproteinen (Kligman and Hilt, 1988).

Die Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen verursacht eine Konformationsänderung der S100 Proteine, welche vor allem auf die starke Reorientierung der Helix H_{III} in der klassischen EF-Hand zurückzuführen ist. Hierbei werden die Positionen der Helix H_{IV} und auch der N-terminalen EF-Hand beibehalten. Durch diese Konformationsänderung erfolgt eine Öffnung der S100 Proteine, die in einer Freilegung einer hydrophoben Spalte resultiert. Diese hydrophobe Fläche stellt die Interaktionsregion der S100 Proteine mit ihren Zielproteinen dar und wird aus den Aminosäureresten der zentralen Linkerregion, der Helix H_{III} und der C-terminalen Sequenz gebildet. Über diese Bindung kann die Regulation der biologischen Aktivität von Zielproteinen erfolgen.

Obwohl die meisten Interaktionen der S100 Proteine Ca^{2+} -abhängig erfolgen, wurden auch eine Reihe Ca^{2+} -unabhängiger Interaktionen beschrieben (siehe Abbildung 2). Die häufigsten Bindungspartner für Apo-S100 Proteine sind Enzyme. So binden z.B. S100A10 und S100A11 Ca^{2+} -unabhängig an die Transglutaminase (Ruse *et al.*, 2001).

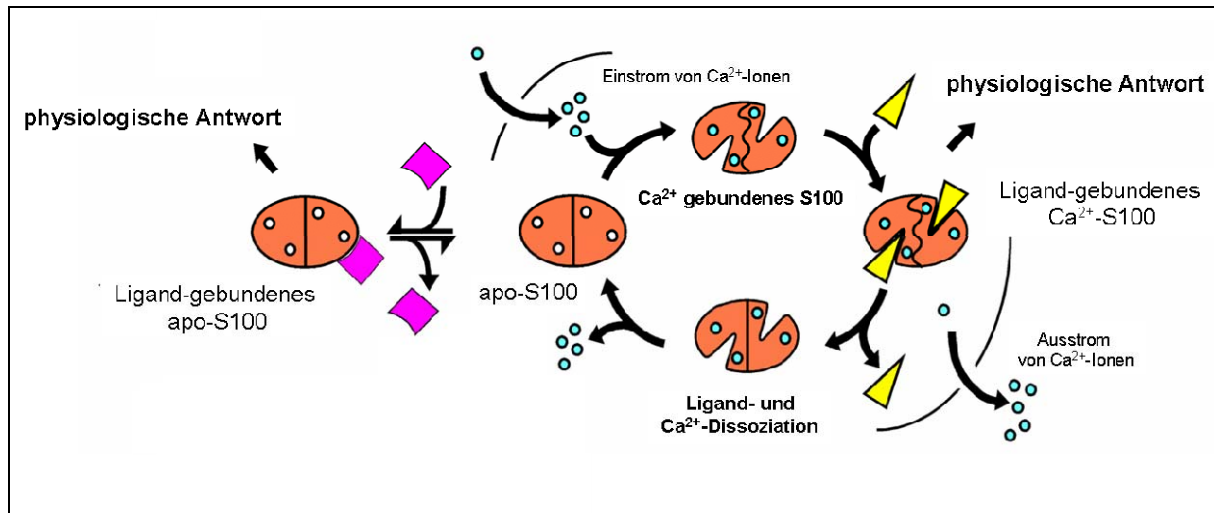


Abbildung 2: Calcium-abhängige und Calcium-unabhängige Interaktionen von S100 Proteinen
 Dargestellt sind die intrazellulären Ca²⁺-abhängigen und -unabhängigen Interaktionen der S100 Proteine mit ihren Zielproteinen. Die Ca²⁺-unabhängigen Interaktionen erfolgen jedoch vergleichsweise selten.

1.1.1.1 Spezifische Expression und intrazelluläre Funktionen der S100

Proteine

Die Mehrzahl der S100 Gene des Menschen sind in einem „gene-cluster“ auf Chromosom 1q21 lokalisiert. S100 Proteine weisen, im Gegensatz zum ubiquitär vorkommenden Calmodulin, eine spezifische und nur teilweise überlappende Gewebeverteilung auf (Donato, 2001). Demzufolge scheinen die meisten S100 Proteine nur ein oder wenige spezifische Effektorproteine mit vergleichbarer Gewebeverteilung zu regulieren. So wird S100A2 im Kern glatter Muskelzellen exprimiert (Mandinova *et al.*, 1998). Auch das S100P Gen wird beispielsweise in einer Vielzahl von Geweben unterschiedlich stark exprimiert und es wurde u.a. eine verstärkte Expression im Plazentagewebe (Becker *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 2003) festgestellt.

Einige S100 Proteine zeigen zudem eine zellzyklusabhängige Expression, so werden S100B und S100A6 in der G₁-Phase und S100A4 in der S-Phase des Zellzyklus verstärkt exprimiert (Kligman and Hilt, 1988). Ferner werden viele S100 Proteine während der Zelldifferenzierung unterschiedlich stark exprimiert. S100A4 wird beispielsweise verstärkt während der neuronalen Differenzierung exprimiert. Einige S100 Proteine scheinen an der Regulation des Energiemetabolismus beteiligt zu sein, da sie u.a. einen Einfluss auf die Aktivität verschiedener Enzyme besitzen. So bindet und inhibiert z.B. S100A1 die Glycogenphosphorylase und die Phosphoglucomutase, wohingegen S100B letztere eher stimuliert. Zudem stimulieren S100B und S100A1 im Zellkern eine Serin/Theonin Kinase, die für die Regulation der Zellteilung und der Zellmorphologie bedeutsam ist.

Die häufigsten und signifikantesten Interaktionspartner der S100 Proteine stellen jedoch Komponenten des Zytoskeletts wie Tubulin, Aktin, Myosin und Tropomyosin dar. S100B kontrolliert z.B. die Assemblierung von Mikrotubuli und S100A11 scheint in Zellen im Zusammenhang mit Annexin A1 an der Reifung von multivesikulären Endosomen beteiligt zu sein (Gerke *et al.*, 2005). Auch andere S100 Proteine, einschließlich S100A1, S100A2, S100A4 und S100A6, interagieren auf ähnliche Weise mit Komponenten des Zytosklett und regulieren darüber die Zytoskelettdynamik (Übersicht in Donato, 2003; Santamaria-Kisiel *et al.*, 2006). Folglich können S100 Proteine generell als multifunktionale Signalproteine betrachtet werden, die an der Regulation diverser zellulärer Funktionen wie der Zelldifferenzierung, der Zellbewegung, dem Zellwachstum, dem Zellmetabolismus, der Transkription, dem Zellzyklus sowie der Protein-Phosphorylierung beteiligt sind (Donato, 2001; Heizmann *et al.*, 2002).

Veränderte Expressionsniveaus der S100 Proteine wurden auch in Zusammenhang mit einigen inflammatorischen wie z.B. rheumatischer Arthritis und neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer gebracht (Marenholz *et al.*, 2004). Zudem wurden erhöhte Expressionsniveaus der S100 Proteine auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen festgestellt (siehe Tabelle 1, Übersicht in Marenholz *et al.*, 2004).

Tabelle 1: Involvierung einiger S100 Proteine in verschiedenen Krankheitsbildern

S100 Protein	assoziierte Krankheiten
S100B	Alzheimer Krankheit Down Syndrom
S100A1	Kardiomyopathie
S100A2	Krebs
S100A4	Krebs und Metastasierung
S100A6	Krebs
S100A7	Schuppenflechte
S100A8/A9	Entzündungen Wundheilung
S100A11	Krebs
S100A12	Entzündungen
S100P	Krebs

1.1.1.2 S100 Proteine und Tumore

Den S100 Proteinen wird eine wichtige Rolle in der Neoplasie zugeschrieben, da für viele Mitglieder der S100 Proteine unterschiedlich hohe Expressionslevel in verschiedenen Stadien und Arten von Krebs festgestellt wurde.

S100A4 scheint z.B. in die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen involviert zu sein und zudem ist die selektive Expression von S100A4 bei vielen Krebsarten von prognostischer Bedeutung. So steht beispielsweise bei Speiseröhrenkrebs die Stärke des S100A4 Expressionsniveaus in direktem Zusammenhang mit dem Fortschreiten des Tumorwachstums und der Überlebensprognose des Patienten (Ninomiya *et al.*, 2001). Eine erhöhte S100A4 Expression wurde nicht nur bei Speiseröhrenkrebs, sondern auch in metastasierenden Formen von Brust-, Prostata-, und Magenkrebs festgestellt. So zeigten beispielsweise Untersuchungen mit Brustkrebs-Zellmodellen, dass die Überexpression von S100A4 in normalerweise nicht metastasierenden Tumorzellen zur Metastasierung dieser Zellen führt (Übersicht in Garrett *et al.*, 2006).

Zudem zeigten Studien, dass S100A4 als angiogener Faktor wirken kann. S100A4 besitzt möglicherweise einen Einfluss auf die für das Tumorwachstum und das Fortschreiten des Krebses bedeutsame Tumor-Angiogenese, in dem es extrazellulär mit RAGE (Rezeptor für fortgeschrittene Glykosilierungsendprodukte) interagiert (siehe 1.1.1.4). Demnach wäre es denkbar, dass die Tumor-Angiogenese durch die Blockierung der S100A4-Sekretion oder dessen Funktion verhindert werden kann (Ambartsumian *et al.*, 2001).

S100A2 hingegen dient als prognostischer Marker für Kehlkopfkrebs und dessen Expression wird zur Abschätzung des Risikos für Patienten verwendet, deren Lymphknoten noch nicht befallen sind und je nach Expressionslevel von S100A2 wird über die Intensität der Therapie für den Patienten entschieden. Eine erhöhte Expression von S100A2 und S100P ist auch in frühen Stadien von Lungenkrebs festzustellen (Diederichs *et al.*, 2004). Die Funktion von S100P in der Neoplasie soll im späteren Verlauf explizit erläutert werden.

Generell betrachtet scheinen demnach Mitglieder der S100 Proteinfamilie über verschiedene Wege, wie z.B. der Interaktion mit dem Zelloberflächenrezeptor RAGE (siehe 1.1.1.4) oder p53 (Markowitz *et al.*, 2004; Fernandez-Fernandez *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2005) sowie durch deren spezifische Funktion in der Zellvitalität und Apoptose die Tumorentstehung zu fördern.

1.1.1.3 Extrazelluläre Funktionen der S100 Proteine

Viele S100 Proteine, wie S100B, S100A8/S100A9, S100A4 und S100A12 besitzen zusätzlich zu ihren intrazellulären auch extrazelluläre Funktionen. Sie werden vermutlich Ca^{2+} -abhängig auf bisher unbekanntem Weg von den Zellen in den extrazellulären Raum sekretiert. So wurde z.B. gezeigt, dass kultivierte Fibroblasten S100A4 in das Kulturmedium abgeben (Watanabe *et al.*, 1992) und Gliazellen S100B in den extrazellulären Raum sekretieren (Davey *et al.*, 2001). Im extrazellulären Raum bilden die S100 Proteine in Gegenwart hoher Ca^{2+} - und Zn^{2+} - Konzentrationen oligomere Strukturen und binden u.a. an den RAGE-Rezeptor (siehe Abbildung 3, Marenholz *et al.*, 2004). Obwohl bisher noch kein intrazelluläres Adapterprotein für RAGE identifiziert worden ist, wird die Aktivierung des RAGE-Signalwegs in Zusammenhang mit einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse wie Wundheilung, Tumorwachstum, systemischer Amyloidose und Entzündungen gebracht (Hofmann, *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003; Hofmann *et al.*, 2002).

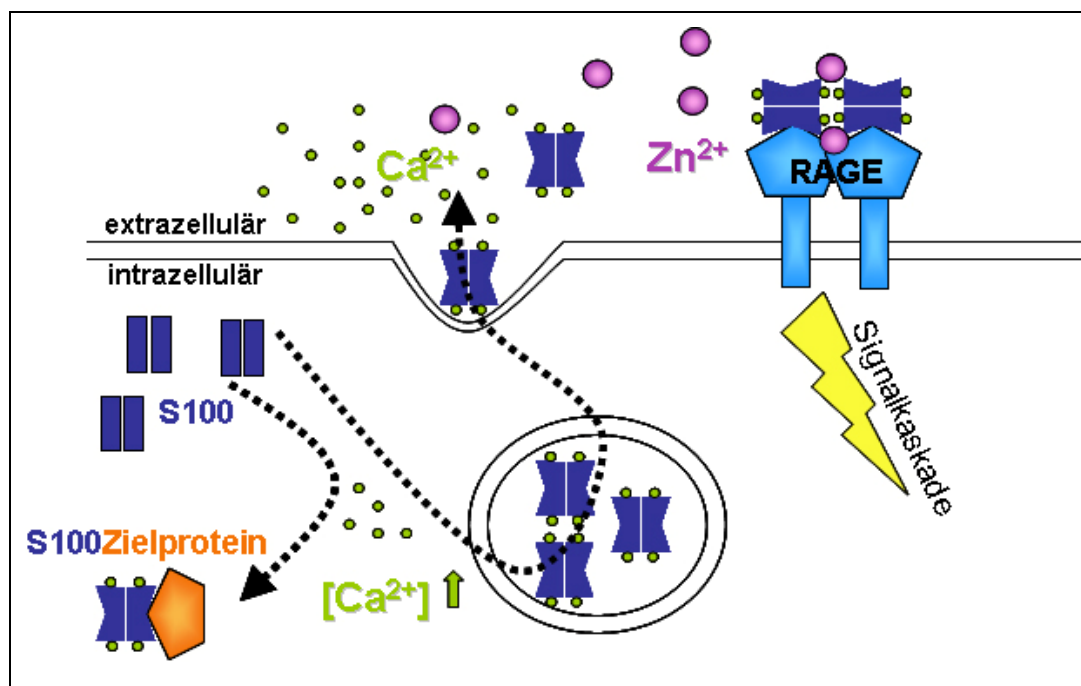


Abbildung 3: Bindung von S100 Proteinen an RAGE

Im extrazellulären Raum binden S100 Proteine (rot) in Gegenwart hoher Konzentrationen von entweder Ca^{2+} , Cu^{2+} oder Zn^{2+} Ionen an den RAGE-Rezeptor (blau) und üben zytokinähnliche Funktionen aus. (Abbildung modifiziert nach Marenholz *et al.* 2004)

So fördert z.B. extrazelluläres S100B (Konzentration im nanomolaren Bereich) durch die Interaktion mit RAGE das Nervenwachstum und die Vitalität von Neuronen im humanen Gehirn. Studien zeigten, dass im humanen Gehirn verschiedene oligomere Formen des S100B mit unterschiedlichen Affinitäten zu RAGE vorliegen. So besitzen S100B-Tetramere eine höhere Affinität zu RAGE als S100B-Dimere. Die Ergebnisse dieser Studien implizieren

zudem ein Modell, bei dem ein S100B-Tetramer zwei RAGE Moleküle über deren V-Domäne bindet und dadurch die RAGE-Dimerisierung eingehend mit einer Aktivierung der RAGE Rezeptoren vermittelt (Ostendorp *et al.*, 2007).

S100A12 wird von aktivierten Granulozyten in den extrazellulären Raum sekretiert (Foell *et al.*, 2003; Boussac and Garin 2000) und übt dort in Verbindung mit RAGE eine entzündungsfördernde Funktion aus (Hofmann *et al.*, 1999). Für das S100A8/S100A9 Heterodimer und für S100A4 wurden ebenfalls extrazelluläre Funktionen beschrieben. Das S100A8/S100A9 Heterodimer wirkt extrazellulär als chemotaktisches Molekül in der Entzündungsreaktion und S100A4 besitzt einen Einfluss auf die Angiogenese (Marenholz *et al.*, 2004).

Auch für S100P wurde eine Sekretion in den extrazellulären Raum sowie eine Interaktion mit RAGE beschrieben (Arumugam *et al.*, 2004). Hier zeigten erste *in vitro* Studien, dass die S100P vermittelte Aktivierung von RAGE bedeutsam für das Wachstum und die Invasion von Bauchspeicheldrüsenkrebs zu sein scheint (Arumugam *et al.*, 2005).

Allgemein betrachtet scheinen demzufolge viele der S100 Proteine zytokinähnliche Funktionen im extrazellulären Raum auszuüben.

1.1.2 S100P

S100P ist ein Mitglied der S100 Proteinfamilie und wurde erstmals 1992 aus humaner Plazenta isoliert (Becker *et al.*, 1992; Emoto *et al.*, 1992). Das S100P-Gen wird in vielen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Eine verstärkte Expression des humanen S100P-Gens wurde in der Plazenta, der Lunge, dem Herzen, dem Skelettmuskel, der Milz und in Leukozyten festgestellt (Jin *et al.*, 2003).

S100P besteht aus 95 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 10 kDa. Die Proteinsequenz von S100P zeigt eine 50 %ige Identität zu den nächsten Sequenzverwandten der S100 Familie S100A1 und S100B. S100P besitzt zwei funktionale EF-Hände von denen die N-terminale eine geringe Ca^{2+} -Affinität ($K_d = 800 \mu\text{M}$) und die C-terminale eine hohe Ca^{2+} -Affinität ($K_d = 1,6 \mu\text{M}$) zeigt. Die Monomere des S100P Proteins besitzen eine starke Affinität zueinander und eine Heterodimerisierung wurde für S100P bisher nur mit S100Z und S100A1 beschrieben (Koltzsch *et al.*, 2000; Gribenko *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004). Die Homodimer-Bildung des S100P Proteins wurde mittels des „yeast two hybrid“ Systems untersucht, wobei sich zeigte, dass der Aminosäurerest Phenylalanin 15 essentiell für die Dimerisierung des S100P Proteins ist (siehe Abbildung 4). So führte die Substitution des Phenylalanin 15 durch ein Alanin zur vollständigen Eliminierung der Dimerisierung des

S100P Proteins, die S100P F15A Mutante bildet stets monomere Strukturen aus (Koltzsch and Gerke, 2000).

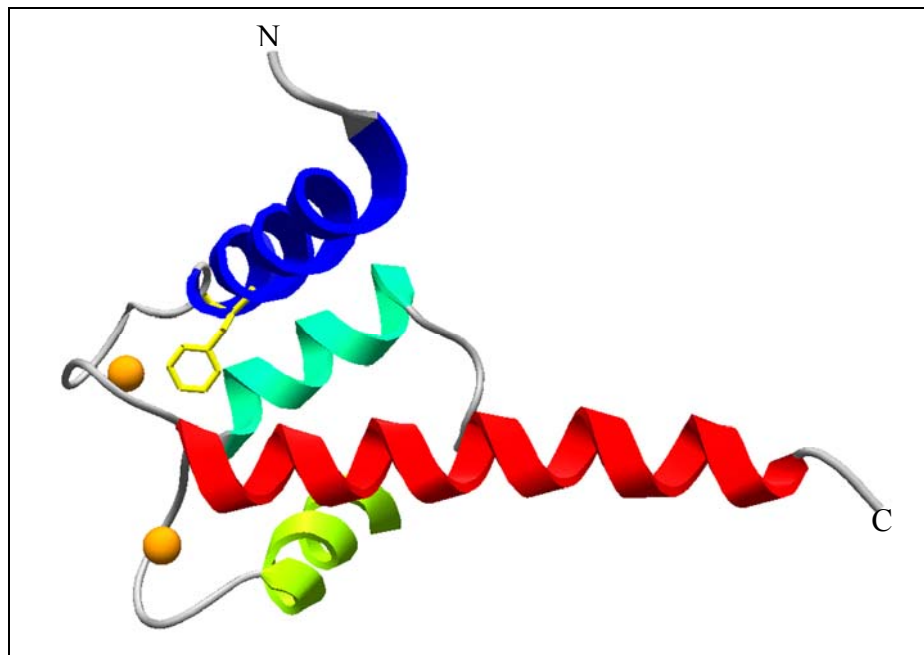


Abbildung 4: Kristallstruktur des Ca^{2+} -gebundenen humanen S100P Monomers
Die Kristallstruktur lässt die vier Helices des S100P Moleküls und die gebundenen Ca^{2+} Ionen (orange) erkennen. Der Phenylalaninrest F15, der an der Dimerisierung des S100P Moleküls beteiligt ist, ist ebenfalls hervorgehoben (gelb).

Auch S100P kann nach einer Ca^{2+} -abhängigen Konformationsänderung mit seinen Liganden interagieren. Für dieses biologisch aktive Dimer wurden mittels Affinitätschromatographie das Gerüstprotein IQGAP1 und das Plasmamembran-Zytoskelett verknüpfende Protein Ezrin als spezifische Interaktionspartner identifiziert (Koltzsch *et al.*, 2003, unveröffentlichte Daten). Die Interaktion von S100P mit Ezrin erfolgt Ca^{2+} -abhängig. Unter anderem zeigte sich dies in *in vivo* Experimenten mit A431-Zellen, in denen nach Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels S100P wie auch Ezrin simultan an die Plasmamembran rekrutiert werden und in Mikrovilli-Strukturen kolokalisieren (Koltzsch *et al.*, 2003). Als S100P-Bindungsstelle konnte im Ezrin Molekül die N-ERMAD Domäne, die u.a. auch Bindungsstellen für $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ enthält, identifiziert werden. Die Bindung von S100P an Ezrin verursacht dessen Konformationsänderung, die wiederum zu einer Freilegung der F-Aktin-Bindungsstelle in der C-terminalen C-ERMAD des Ezrins führt. Demnach scheint es zumindest partiell zu einer Aktivierung von Ezrin zu kommen und S100P kann als ein Aktivator des Ezrins betrachtet werden. Hierdurch kann die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels direkt in Zusammenhang mit der Aktivierung der Verbindungsfunktion (Plasmamembran und F-Aktin) von Ezrin gebracht werden.

Wie von vielen S100 Proteinen ist auch von S100P eine erhöhte Expression in verschiedenen Tumor-Arten, wie z.B. Dickdarmkrebs, festgestellt worden. *In vitro* Studien zeigten in diesem Zusammenhang, dass extrazelluläres S100P das Wachstum und die Migration von Dickdarmkrebszellen fördert und vermutlich über die Bindung an RAGE die Phosphorylierung von *Erk* und die Aktivierung von NF κ B auslöst (Fuentes *et al.*, 2007). Die Interaktion von S100P mit RAGE scheint auch bei Bauspeicheldrüsenkrebs von Bedeutung zu sein. So wurde zum einen gezeigt, dass S100P hier verstärkt exprimiert wird und die Zellproliferation, die Migration und die Invasion der Tumorzellen fördert (Ohuchida *et al.*, 2006; Downen *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2004). Zum anderen wurde durch Co-Immunopräzipitationen eine Interaktion zwischen S100P und RAGE nachgewiesen (Arumugam *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2007). Zudem wurde auch in Prostatakrebs (Fuentes *et al.*, 2007; Chuang *et al.*, 2007; Mousses *et al.*, 2002), Magenkrebs (Liang *et al.*, 2007; Bertin *et al.*, 2007), Brustkrebs (Russo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Schor *et al.*, 2006; Guerreiro *et al.*, 2000), Leukämie (Ishii *et al.*, 2005) und Lungenkrebs eine erhöhte Expression von S100P festgestellt. Dies gilt auch in NSCLC („*non small cell lung cancer*“), eine Form von Lungenkrebs. Hier steht die erhöhte Expression in direktem Zusammenhang mit einer gesteigerten Metastasierung und Lethalitätsrate bei NSCLC-Patienten. Es wird vermutet, dass S100P entweder ebenfalls extrazellulär über RAGE oder aber intrazellulär durch die Interaktion mit Ezrin die Metastasierung von NSCLC-Zellen beeinflusst (Diederichs *et al.*, 2004). Für letztere Annahme würde zum einen sprechen, dass Ezrin in vielen verschiedenen zellulären Prozessen involviert ist, die eine Umstrukturierung des Zytoskeletts wie bei der Zellmigration erfordern und zum anderen auch Ezrin in einigen Tumoren verstärkt exprimiert wird (siehe 1.2.1). Hinzu kommt, dass wie bereits erwähnt, die Bindung von S100P zu einer Aktivierung von Ezrin führt. Im Folgenden soll daher näher auf Ezrin, ein Mitglied der ERM-Proteinfamilie, eingegangen werden.

1.2 Die ERM-Proteinfamilie

Die ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) -Proteinfamilie ist eine Familie weit verbreiteter Membran assoziierter Proteine, welche die Struktur und Funktion spezifischer Domänen des Zellkortex regulieren. ERM-Proteine erzeugen eine Verbindung zwischen Membranproteinen in der Plasmamembran und filamentösem Aktin im Zellkortex, die eine wesentliche Rolle für die Zelladhäsion und -bewegung spielt. ERM-Proteine sind daher in Prozesse wie der Zell-Zell Kommunikation, Karzinogenese und Metastasierung aber auch Apoptose, Phagozytose und Cytokinese involviert.

Die ERM-Familie beinhaltet die Proteine Ezrin, Radixin und Moesin, sowie Merlin. Sie repräsentieren eine Klasse der 4.1-Superfamilie und besitzen in ihrem N-Terminus eine ca. 300 Aminosäuren umfassende FERM (*F*our-*p*oint *o*ne, *E*zrin, *R*adixin, *M*oesin) Domäne die zu 30 % homolog zu der 4.1 R Domäne des 4.1 Proteins ist. Letztere wird als Prototyp dieser Proteinsuperfamilie angesehen (siehe Abbildung 5).

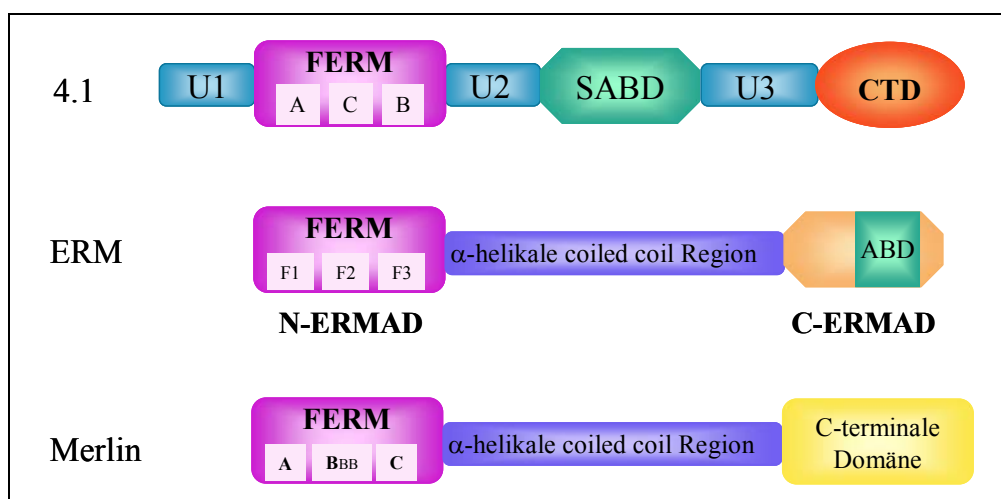


Abbildung 5: Schematischer Vergleich der Strukturdomänen der Mitglieder der 4.1 Superfamilie
ERM-Proteine und Merlin weisen eine FERM-Domäne auf die zu 30 % homolog zu der des 4.1 Proteins ist.

Die Mitglieder der ERM-Familie sind sehr homolog zueinander (Sequenzidentität von 75 %) und besonders die FERM-Domäne der ERM-Proteine ist sehr hoch konserviert. So zeigt die Aminosäuresequenz der FERM-Domäne innerhalb von Vertebraten eine Übereinstimmung von 85 % und die FERM-Domänen der ERM-Homologe im Seeigel (*Echinoidea*), Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und in der Schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*) weisen eine Homologie von 74-82 % zu denen der Vertebraten auf (Bretscher *et al.*, 2002). In der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde hingegen kein für die FERM-Domäne codierendes Gen identifiziert, was zu der Annahme führt, dass sich die FERM-

Domänen aufgrund eines Mehrzellstadiums und nicht als Zytoskelett Komponenten selbst entwickelt haben.

ERM-Proteine sind in Vertebraten durch Genduplikationen entstanden und die hohe Sequenzhomologie unter ihnen weist darauf hin, dass sie ähnliche oder zumindest überlappende Funktionen ausüben könnten. So wurde z.B. für die Moesin „*knockout*“ Maus kein erkennbarer Phänotyp festgestellt (Doi *et al.*, 1999). Eine Ausnahme dabei scheint jedoch in einigen Fällen Ezrin darzustellen, da es u.a. im Darmepithel viel stärker als die anderen ERM-Proteine, wenn nicht sogar ausschließlich exprimiert wird. Auch sind für die Ezrin „*knockout*“ Maus mehrere Phänotypen bekannt, die für eine Bedeutung bei der Epithelentwicklung verschiedener Gewebe sprechen. So wurde zum einen eine veränderte Morphogenese des Darmepithels (Zusammenfassung in Hughes and Fehon, 2006) und zum anderen eine Reduktion von apikalen Mikrovilli in dem retinalen Pigment-Epithelium und Müller-Zellen beschrieben (Bonilha *et al.*, 2006).

Die N-terminale FERM-Domäne der ERM-Proteine kann mit einer Affinität von bis zu 90 % an die C-terminale ERM-Domäne eines jeden ERM-Proteins binden, weshalb diese Domänen auch als N- und C-ERMAD (*ERM association domain*) bezeichnet werden.

ERM-Proteine können sowohl Homo- und Heterodimere als auch höherrangige oligomere Strukturen ausbilden, wie z.B. Moesin-Ezrin Heterodimere in A431-Zellen (Gary and Bretscher, 1993). *In vivo* Studien zeigten, dass ein Großteil des Ezrins im Zytoplasma als Monomer vorliegt in welchem die N-ERMAD und C-ERMAD Domäne miteinander interagieren (Berryman *et al.*, 1995; Bretscher *et al.*, 1995). Diese intramolekulare Interaktion führt zu einer Maskierung zahlreicher Bindungsstellen für Protein-Liganden wie z.B. F-Aktin und dem EBP50 (*ERM-binding phosphoprotein 50*). Aus diesem Grund kann die Interaktion zwischen den beiden ERMAD Domänen als eine Art negative Regulation betrachtet werden. Zur Aktivierung der ERM-Moleküle muss die intramolekulare Assoziation zwischen diesen beiden Domänen aufgehoben werden (Gary and Bretscher, 1995). Dies geschieht unter anderem durch die Phosphorylierung eines konservierten C-terminalen Threoninrestes, welche die Affinität der C-ERMAD Domäne zur FERM-Domäne senkt (Matsui *et al.*, 1998). Mittlerweile wurden zahlreiche Kinasen, wie die Rho Kinase (Matsui *et al.*, 1998; Tran Quang *et al.*, 2000) und verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC- θ (Pietromonaco *et al.*, 1998; Simons *et al.*, 1998), PKC- α (Ng *et al.*, 2001)) identifiziert, über die eine Phosphorylierung dieses Threoninrestes *in vivo* oder *in vitro* erfolgen kann (siehe Abbildung 6).

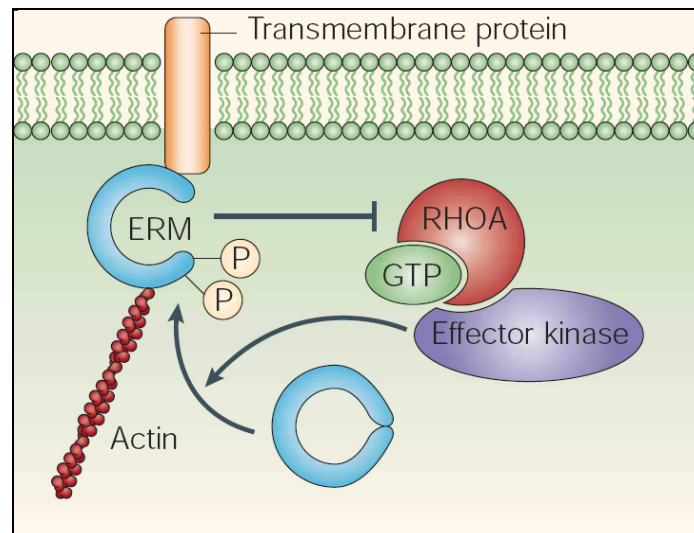


Abbildung 6: Aktivierung der ERM-Proteine durch Phosphorylierung (McClatchey, Nature Reviews 2003)
Die Phosphorylierung konservierter Threoninreste im C-Terminus der ERM-Proteine führt zu einer Aktivierung deren Membran-Zytoskelett verknüpfende Funktionen.

Die Phosphorylierung der ERM-Proteine wird wiederum über Signalkaskaden gesteuert, an denen eine Reihe von kleinen GTPasen der Rho-Unterfamilie der Ras-Superfamilie (Rho, Rac und Cdc42) beteiligt sind (Schmidt and Hall, 1998). Dabei ist Rho eher in die Ausbildung von Stressfasern und Mikrovilli, Rac in die Lamellipodienbildung und Cdc42 in die Bildung von Filopodien involviert (Übersicht in Hall, 2005). So wurde unter anderem gezeigt, dass Cdc42 während der Bildung von Filopodien die Phosphorylierung der ERM Proteine induziert (Nakamura *et al.*, 2000) und die Phosphorylierung von Moesin durch die Rho-Kinase wichtig für die Ausbildung von Mikrovilli ist (Oshiro *et al.*, 1998). Neben der Phosphorylierung scheint auch die Bindung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ eine regulatorische Funktion auf die Aktivität der ERM-Proteine zu besitzen. Zur genauen Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der ERM-Proteine könnte die Bestimmung der Proteinstruktur beitragen. Bisher konnte allerdings keine vollständige Struktur, sondern nur die der FERM-Domäne der ERM-Proteine ermittelt werden (Smith *et al.*, 2003; Hamada *et al.*, 2000; Edwards and Keep, 2001). Abbildung 7 zeigt die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne des Ezrins, die eine globuläre kleeblattartige Faltung besitzt.

Neben den FERM-Domänen konnte auch der Komplex aus der FERM-Domäne des Moesins und dessen C-terminaler Domäne kristallisiert werden (Pearson *et al.*, 2000). Hier zeigte sich, dass das C-terminale Ende eine gestreckt-gewundene Struktur besitzt und einen Großteil der FERM-Domäne bedeckt. Die beiden Domänen gehen über starke hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen eine enge Bindung ein, die sehr stabil gegenüber Proteolyse ist.

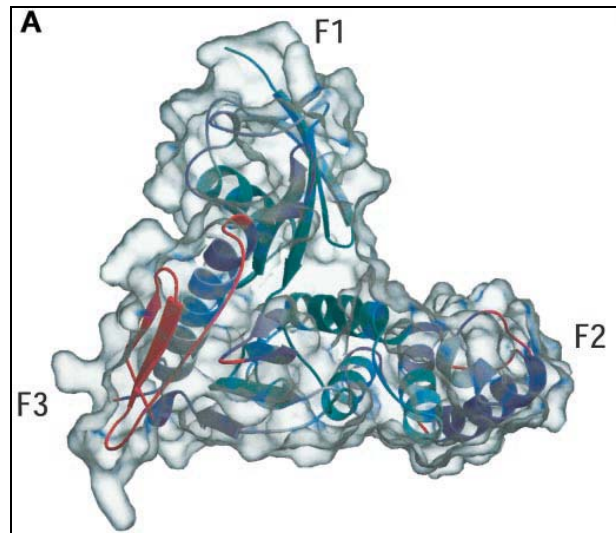


Abbildung 7: „ribbon“ Diagramm der FERM-Domäne von Ezrin in einer semitransparenten Darstellung der Moleküloberfläche

In dem Diagramm ist deutlich die kleeblattartige Struktur der FERM- Domäne von Ezrin mit den Subdomänen F1 (Reste 2-82), F2 (83-195) und F3 (196-297) zu erkennen (Diagramm aus Smith et al., 2003).

ERM-Proteine besitzen innerhalb ihrer C-ERMAD Domäne, genauso den letzten 30 C-terminalen Aminosäuren (Berryman and Bretscher 2000; Turunen *et al.*, 1994; Pestonjamas *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1998) eine F-Aktin-Bindungsstelle, die im monomeren Zustand maskiert ist. Neben dieser C-terminalen Aktin-Bindungsstelle wurden noch zwei weitere Aktin-Bindungsstellen in der mittleren Region und der N-ERMAD Domäne identifiziert (Martin 1997; Roy *et al.*, 1997).

Die N-ERMAD Domäne der ERM-Proteine vermag an Transmembranproteine zu binden. Es sind zwei verschiedene Wege der Interaktion mit Transmembranproteinen bekannt: eine direkte Bindung der FERM-Domäne an den zytoplasmatischen Bereich der Proteine und eine indirekte Bindung über die „scaffolding“ Proteine EBP50/NHE-RF und E3KARP (NHE Typ 3 Kinase A regulatorisches Protein), die ihrerseits über PDZ-Domänen an Membranproteine binden können. Eine direkte Bindung erfolgt beispielsweise an CD44 (Tsukita *et al.*, 1994) und ICAM2 (*intracellular adhesion molecule-2*, Heiska *et al.*, 1998), während eine indirekte Bindung für eine Vielzahl von Interaktionspartnern beschrieben wurde. Sowohl EBP50/NHE-RF als auch E3KARP besitzen zwei PDZ Domänen und die Bindung an Ezrin erfolgt über eine aus 30 Aminosäuren bestehende Sequenz im C-Terminus. EBP50/NHE-RF und E3KARP scheinen unter anderem an der Regulation der Endozytose vieler Membranproteine, an die sie binden, beteiligt zu sein. Als Beispiel ist hier der β 2-adrenerge Rezeptor zu nennen (Hall *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1999).

Die beschriebenen Mechanismen zur Aktivierung der ERM Proteine, d.h. die Phosphorylierung des konservierten Threoninrestes und die Bindung von Phospholipiden,

werden über Rho, PKC- α oder PKC- θ Signalwege vermittelt. ERM Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Umsetzung des Rho-Signalweges. So sind die Rho-induzierten Umstrukturierungen des Zytoskeletts abhängig von dem zytoplasmatischen Pool der ERM-Proteine und die Aktivierung des Rho-Signalwegs über GTP γ S führt zu einer Rekrutierung der ERM Proteine zur Plasmamembran. ERM Proteine werden indes nicht nur durch Rho reguliert, sondern sie selbst vermögen ebenfalls die Aktivität von Rho positiv zu regulieren. So wurde z.B. gezeigt, dass RhoGDI, ein negativer Regulator von Rho, an die FERM Domäne aktivierter ERM Proteine bindet und durch diese Bindung inaktives Rho vom GDI freigesetzt wird. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung des Rhos durch den Austausch von GDP zu GTP (Takahashi *et al.*, 1997).

1.2.1 Ezrin

Ezrin, auch als Cytovillin oder p81 bezeichnet, ist ein gut charakterisiertes Mitglied der ERM-Proteinfamilie mit einem Molekulargewicht von 82 kDa. Erstmals wurde Ezrin an der Ezra Cornell Universität aus einem Hühner-Darmentepithel isoliert woraus sich die Namensgebung Ezrin herleitet. Dort wurde es als ein Bestandteil von Mikrovilli identifiziert, in denen es eine Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem inneren Aktinbündel herstellt. Ezrin wird bevorzugt in Epithelien exprimiert, während z.B. Moesin eher in Endothelien exprimiert wird (Berryman *et al.*, 1993; Schwartz-Albiez *et al.*, 1995).

Das aus 13 Exons bestehende humane Ezrin Gen ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert. Das Ezrin Protein (UniProtKB/Swiss-Prot: P15311) besteht aus 585 Aminosäuren, von denen die ersten 296 Aminosäuren die N-ERMAD Domäne und die C-terminalen 107 Aminosäuren die C-ERMAD Domäne bilden.

Die N-ERMAD und C-ERMAD Domäne werden durch eine 172 Aminosäure große α -helikale Domäne, die eine Bindungsstelle für die RII-regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA; Dransfield *et al.*, 1997) beinhaltet, und einem sieben Aminosäure langen Polyprolin Segment, das eventuell eine Rolle bei der Rho-Aktiverung spielt (Takahashi *et al.*, 1997), getrennt (siehe Abbildung 8).

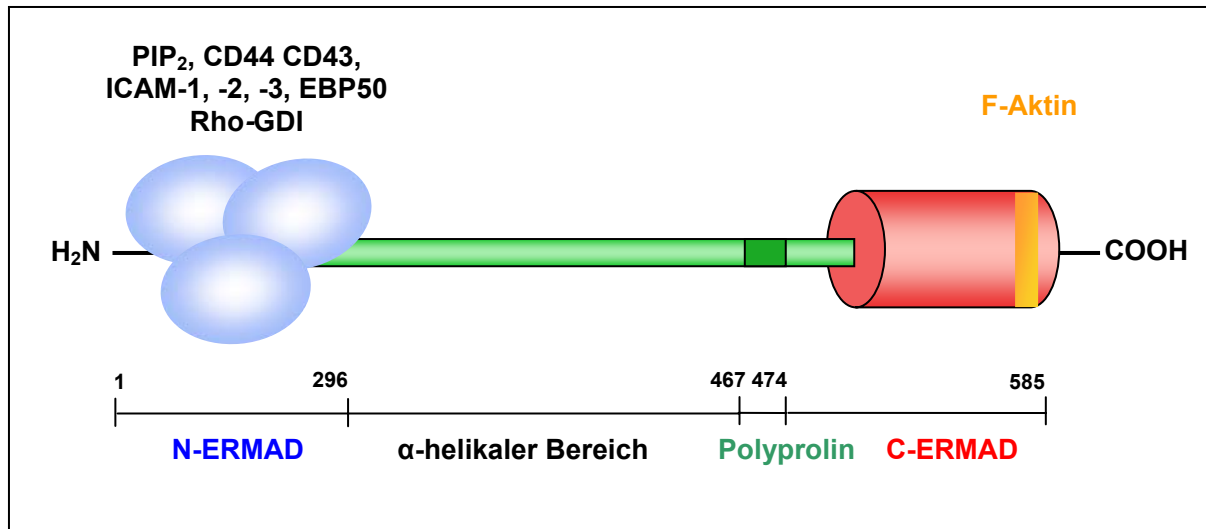


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufbaus von Ezrin

Über die globuläre N-ERMAD Domäne (blau) erfolgt die direkte oder indirekte Membranbindung, während die C-terminale Domäne (rot) eine F-Aktin Bindungsstelle (orange) aufweist. Die beiden Domänen werden durch einen α-helikalen Bereich (grün) getrennt der eine Polyprolinsequenz enthält.

Für Ezrin sind verschiedenste Bindungspartner identifiziert worden. So befinden sich in der N-ERMAD Domäne u.a. Bindungsstellen für Adhäsionsmoleküle wie dem Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 und ICAM-2, Faltungsmoleküle wie dem Phosphoprotein EBP50 und Signalmoleküle wie dem Rho-Aktivator RhoGDI. Außerdem binden PtdIns(4,5)P₂, das S100 Protein S100P und die ERMAD-Domänen anderer ERM-Proteine an die N-ERMAD Domäne von Ezrin. In der C-ERMAD Domäne stellen die C-terminalen 35 Aminosäuren eine Bindungsstelle für F-Aktin dar und zudem befindet sich dort eine N-ERMAD-Bindungsstelle. Über die ERMAD-Bindungsstellen in den N-/C-ERMAD Domänen kann zum einen eine Oligomerisierung des Ezrins sowie eine Assoziation mit Moesin und zum anderen eine intramolekulare Assoziation erfolgen, die zu einer Maskierung zahlreicher der beschriebenen Bindungsstellen führt. So sind u.a. in diesem auch als „*dormant state*“ bezeichneten Zustand die F-Aktin-Bindungsstelle sowie die meisten Bindungsstellen für Transmembran-Proteine maskiert.

1.2.1.1 Die Aktivierung des Ezrin-Moleküls

Wie bei allen ERM-Proteinen erfolgt auch die Aktivierung des Ezrins zum einen über die Phosphorylierung des konservierten Threoninrestes T567 im C-Terminus (Matsui *et al.*, 1998; Simons, *et al.*, 1998) durch Kinasen wie die Proteinkinase C und die Rho-Kinase. Zum anderen bedarf die Aktivierung des Ezrins neben der Phosphorylierung auch der Bindung von PtdIns(4,5)P₂. Hierbei scheint die Phosphorylierung des Threoninrestes die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ zu erfordern (Fievet *et al.*, 2004). Als Bindungsstellen für PtdIns(4,5)P₂ wurden die Regionen zwischen den Aminosäuren 12-115 und 233-310 identifiziert, die ein in der ERM-Familie konserviertes aus basischen Aminosäuren bestehendes KK(X)_(n)K/RK Bindungsmotiv enthalten (Niggli *et al.*, 1995; Barret *et al.*, 2000).

Neben diesem für ERM Proteine bekannten Aktivierungsmechanismus wurde ein weiterer neuartiger Mechanismus zur Aktivierung des Ezrin Moleküls beschrieben. In diesem führt die Bindung des S100 Proteins S100P zu einer Aktivierung des Ezrin Proteins bzw. zur Aufhebung der intramolekularen Maskierung der Bindungsstellen (siehe Abbildung 9; Koltzschner *et al.*, 2003). So kolokalisieren Ezrin und S100P nach Wachstumsfaktor-Stimulation in Mikrovilli-ähnlichen Strukturen und die Bindung von S100P setzt die F-Aktin Bindungsstelle im Ezrin frei. Die Bindung von S100P ist Ca²⁺ abhängig und erfolgt spezifisch für das S100P-Dimer. Das S100P bindet an eine Bindungsstelle innerhalb der N-ERMAD Domäne des Ezrins, die auch im „ruhenden“ Zustand des Moleküls zugänglich ist (Koltzschner *et al.*, 2003).

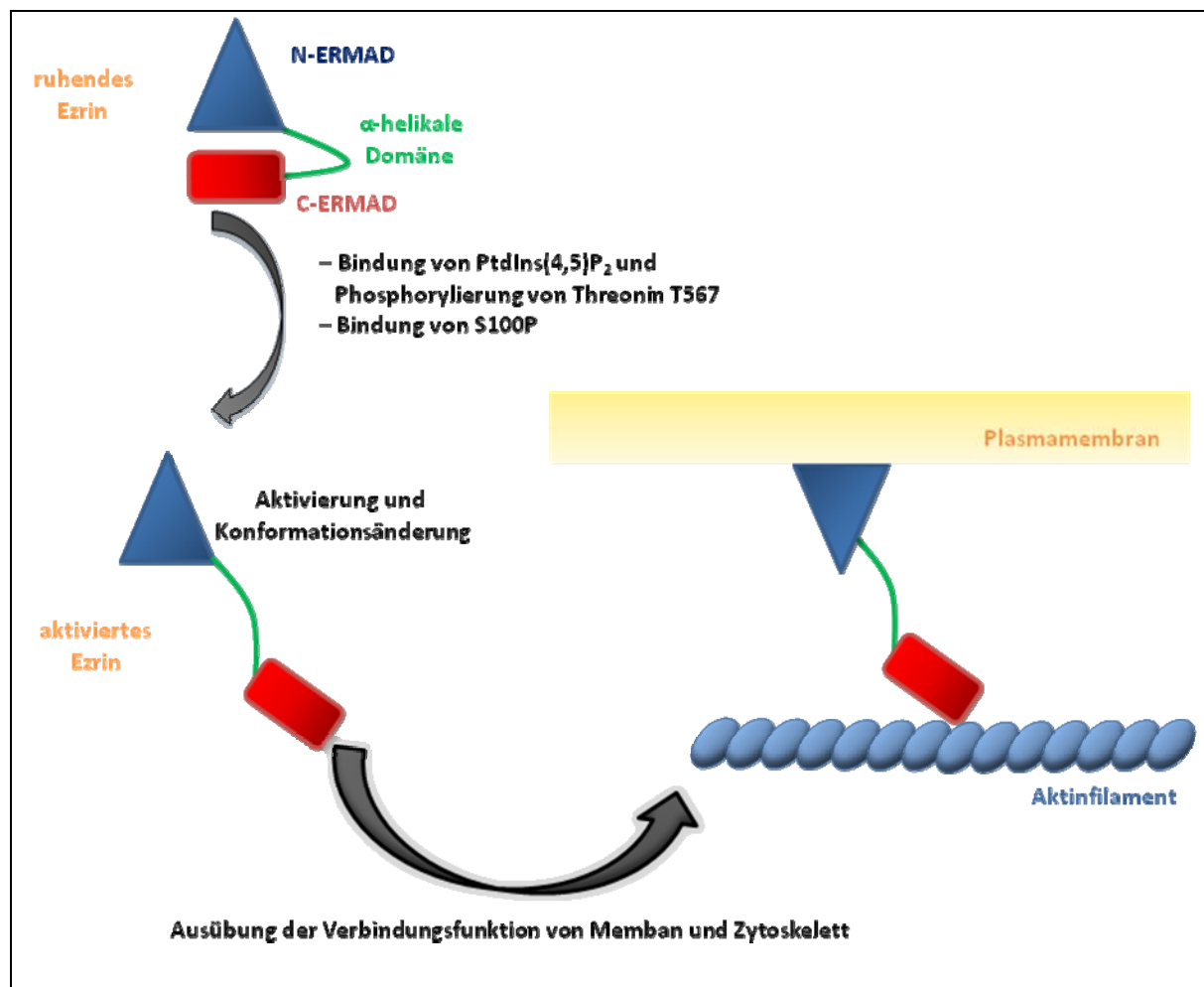


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Aktivierung von Ezrin
 Sowohl die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ zusammen mit der Phosphorylierung des Threoninrestes T567 als auch die Bindung von S100P führen zu einer Aktivierung von Ezrin.

1.2.1.2 Funktionen von Ezrin und anderen ERM-Proteinen in der Tumorzellmigration

Ezrin reguliert die Struktur des kortikalen Zytoskeletts und ist daher in vielen verschiedenen zellulären Prozessen involviert. Unter anderem steht auch eine erhöhte Expression des Ezrins in Zusammenhang mit der Metastasierung und Entwicklung epithelialer Tumore, indem es eine Verbindung zwischen Signaltransduktionsmolekülen und für die Metastasierung essentiellen Oberflächenmolekülen herstellt. Ezrin wird beispielsweise in zwei Formen des metastasierenden pädiatrischen Knochenkrebs signifikant überexprimiert und ist dort für die Metastasierung erforderlich (Khanna *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang zeigte sich auch, dass nur die Überexpression von Ezrin und nicht von anderen ERM-Proteine für die Metastasierung und Progression des Krebses verantwortlich ist.

Ferner zeigten histologische Untersuchungen, dass die Expression von Ezrin mit einer Reihe weiterer Krebsarten korreliert. So wurde eine verstärkte Expression in Karzinomen der

Gebärmutter, der Brust, des Dickdarms, der Eierstöcke, Melanomen der mittleren Augenhaut und der Epidermis, Gehirntumoren sowie Sarkomen des Weichgewebes festgestellt (Ohtani *et al.*, 2002; Makitie *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2003; Tynninen *et al.*, 2004).

Die genaue Funktion des Ezrins in der Karzinogenese ist wahrscheinlich sehr komplex und bisher noch nicht eindeutig charakterisiert worden. Limitierend für die Funktion von Ezrin könnte in diesem Zusammenhang dessen relative Expression in den entsprechenden Geweben, die Balance zwischen den exprimierten Kinasen und Phosphatasen als auch das Expressionslevel von Proteinen, die mit Ezrin interagieren, sein. Zudem werden in einigen Geweben Ezrin und Merlin gleichzeitig exprimiert. Ezrin und Merlin besitzen dort nicht nur die gleichen Bindungspartner, sondern interagieren auch direkt miteinander (McClatchey 2003; Lallemand *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2001). Es wäre ebenfalls möglich, dass Ezrin und Merlin gemeinsam Proteinkomplexe beeinflussen, welche an der Regulation verschiedener für die Krebsentwicklung erforderlicher Zellaktivitäten beteiligt sind (Bruce *et al.*, 2007). Hierbei könnte es sich um Prozesse wie die Zellproliferation, die Zell-Zell-Kommunikation, die ECM („*cell-extracellular-matrix*“)- Kommunikation, die Zellmotilität und die Zelldifferenzierung handeln (siehe Abbildung 10).

Es gibt u.a. mehrere Hinweise, dass Merlin und ERM-Proteine am Signalweg und / oder dem Transport von Wachstumsfaktor-Rezeptoren involviert sind. So binden die ERM-Proteine direkt oder indirekt über EBP50/NHERF an den EGF-(„*epidermal growth factor*“), den HGF-(„*hepatocyte growth factor*“) oder den PDGF-(„*platelet derived growth factor*“) Rezeptor (Crepaldi *et al.*, 1997; Bretscher, 1989; Berryman *et al.*, 1993; Krieg and Hunter, 1992). Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob durch diese Interaktionen ERM Proteine die Signalwege oder den Transport der Rezeptoren regulieren. Die Kontrolle des Rezeptorsignalweges wäre jedoch eine naheliegende Erklärung, wie eine defekte oder überaktive Funktion von Merlin oder ERM-Proteinen mit der Tumorentwicklung korrelieren könnte.

Ein weiteres Kennzeichen von Tumorzellen und deren Metastasierung ist die verringerte Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (siehe Abbildung 10). Viele Studien zeigten, dass auch Merlin und die ERM-Proteine bei der Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix beteiligt sind. Merlin und ERM-Proteine können z.B. mit der zytoplasmatischen Domäne von CD44 interagieren welcher seinerseits oftmals in Zusammenhang mit der Tumorentwicklung verschiedener humaner Krebsarten gebracht wird (Tsukita *et al.*, 1994; Sainio *et al.*, 1997). So wurde gezeigt, dass Merlin durch die Interaktion mit CD44 die kontaktabhängige Inhibierung der Zellproliferation kontrolliert und ein Verlust von Merlin zu einer erhöhten Proliferation

konfluenter Zellen führt (Morrison *et al.*, 2001). Demnach könnte Merlin das Tumorwachstum und die Invasion regulieren, indem es Proteinkomplexe stabilisiert, welche die Adhäsion zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix sowie die Signalumsetzung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren koordinieren.

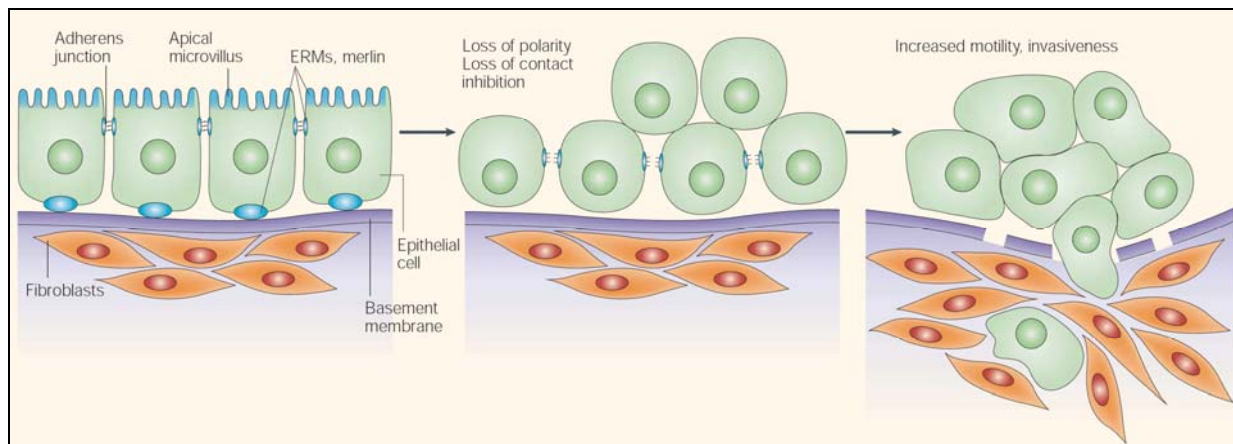


Abbildung 10: Funktionen von ERM-Proteinen und deren Auswirkungen auf Krebs

Sowohl Merlin als auch die ERM-Proteine sind in Prozessen wie der Zellpolarität, der Zell-Zell- und der ECM-Kommunikation involviert. Merlin und ERM-Proteine (blau) können in apikalen Mikrovilli-Strukturen und apikalen „*adherence junctions*“ lokalisieren. Der Verlust dieser apikalen Strukturen könnte indirekt über Zelldepolarisation, dem Verlust der Zellkontakt-abhängigen Proliferationsinhibition oder einer erhöhten Zellbewegung zur Steigerung der Tumorentwicklung und Metastasierung beitragen. Zudem können ERM-Proteine und Merlin auch in Kontakten zwischen der Extrazellulären Matrix und den Zellen lokalisiert sein. Eine veränderte Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix könnte ebenso die Metastasierung fördern.

(Abbildung aus McClatchey, Nature Reviews 2003)

Merlin und die ERM-Proteine sind darüberhinaus auch in Zell-Zell-Kontakten lokalisiert und scheinen eine Funktion in der interzellulären Kommunikation zu besitzen (Lallemand *et al.*, 2003; Pujuguet *et al.*, 2003). Ein wichtiger Bestandteil der interzellulären Kommunikation sind u.a. die „*Adherens Junctions*“, deren Verlust *in vivo* zur Entwicklung von Tumoren und zur Metastasierung führt (Nollet *et al.*, 1999). Merlin interagiert mit „*Adherens Junctions*“ und kontrolliert vermutlich über die Wechselwirkung mit dem Aktin-Zytoskelett deren Assemblierung und Stabilisierung. Auch für Ezrin wurde gezeigt, dass es über RAC1 die Bildung von „*Adherens Junctions*“ reguliert (Pujuguet *et al.*, 2003). Zudem führte in Säugerzellen die Überexpression einer dominant negativen Ezrin Mutante zu einer gestörten Zell-Zell-Kommunikation (Crepaldi *et al.*, 1997).

Neben der Zell-Zell-Kommunikation ist auch ein Verlust der Zellpolarität ausschlaggebend für die Entstehung von Tumorzellen (Thiery, 2002). Da in vielen Epithelien ERM-Proteine an der Stabilisierung apikaler Mikrovilli-Strukturen beteiligt sind (siehe Abbildung 10, Crepaldi *et al.*, 1997), besteht auch in diesem Zusammenhang eine Möglichkeit wie die ERM-Proteine die Tumorentstehung beeinflussen könnten (Übersicht in McClatchey *et al.*, 2003). So wurde

z.B. in Studien mit der Karzinosarkomzelllinie Walker 256 gezeigt, dass die Reduktion des endogenen Ezrins zu einer Verringerung der spontanen Zellmigration führt. Zwar führt dies nicht unmittelbar zu einem Verlust der Zellpolarität, jedoch wird vermutet, dass es aufgrunddessen zu einer mangelhaften Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett kommt und auf diese Weise die Zellmigration stark beeinträchtigt wird (Rossy *et al.*, 2007).

Andererseits könnte nicht nur der Verlust, sondern auch die Erzeugung von Zellpolarität die Tumormetastasierung beeinflussen. So wurde z.B. für Lymphozyten gezeigt, dass die Überexpression des permanent aktiven Ezrins zu einer Ausbildung polarer Strukturen und einer gesteigerten Migration dieser Zellen führt (Lee *et al.*, 2004).

1.3 Zielsetzung

Vorhergehende Studien zeigten, dass S100P Ca^{2+} -abhängig an die N-terminale Domäne von Ezrin bindet und diese Bindung zu einer Aktivierung der F-Aktin bindenden Funktion des Ezrins führt (Koltzsch *et al.*, 2003). Ausgehend von dieser Beobachtung sollte in der vorliegenden Arbeit die S100P-Ezrin Interaktion eingehender untersucht werden. Hierzu sollte zunächst ein Zellmodellsystem etabliert werden, welches die *in vivo* Charakterisierung dieser Interaktion ermöglicht. Im Mittelpunkt standen dabei die Analyse der endogenen Expression dieser beiden Proteine sowie deren Relokalisation nach einer Stimulation durch Wachstumsfaktoren. Zur weiteren Charakterisierung dieser Interaktion sollte zum einen das jeweilige Bindungsmotiv innerhalb der beiden Proteine identifiziert werden. Zum anderen sollte mittels Liposomen-Co-Sedimentationen eine möglicherweise existierende Konkurrenz zwischen der PtdIns(4,5)P₂- und der S100P-vermittelten Aktivierung untersucht werden. Neben dem Aktivierungsmechanismus sollte auch die physiologische Relevanz der S100P-Ezrin Interaktion analysiert werden. Da sowohl Ezrin als auch S100P in die Tumormetastasierung involviert sind, sollte hierzu über ein Zellkulturmodell die Relevanz dieser Interaktion für die Tumorzellmigration charakterisiert werden.

2. Material

2.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kultivierungsbedingungen
A431 (ATCC, CRL-1555)	Humane, epitheliale in Monolayern wachsende Zelllinie die aus einem humanen Plattenepithel gewonnen wurde.	<ul style="list-style-type: none"> • RPMI 1640 Medium • Kultivierung bei 37 °C und 7 %iger CO₂- Atmosphäre
HeLa (DSMZ, ACC 57)	In Monolayern wachsende Zelllinie mit epithelartiger Morphologie die aus einem humanen Cervix-Karzinom stammt.	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM Medium • Kultivierung bei 37 °C und 5 %iger CO₂- Atmosphäre
HMEC-1 (Ades <i>et al.</i> , J. Invest. Dermatol.99, 1992)	Humane mikrovaskuläre Zelllinie mit endothelialer Morphologie.	<ul style="list-style-type: none"> • MCDB Medium Kultivierung bei 37 °C und 3 %iger CO₂- Atmosphäre
HTB58 (SK-MES-1, (DSMZ, ACC 353)	In Monolayern wachsende humane Lungenkarzinom-Zelllinie mit epithel-ähnlicher Morphologie.	<ul style="list-style-type: none"> • MEM Medium • Kultivierung bei 37 °C und 7 %iger CO₂- Atmosphäre
SKBR3 (G. Bode, Experimentelle Pathologie, Münster)	Humane, adhärent wachsende Brustkrebszelllinie mit epithelialer Morphologie.	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM Medium • Kultivierung bei 37 °C und 7 %iger CO₂- Atmosphäre

2.2 Bakterienstämme

Stamm	Herkunft	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> TOP10 F [']	Invitrogen, Groningen, Niederlande	F ['] {lacI ^q , TN10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7679 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pLysS	Promega, Madison, USA	F ['] <i>ompT hsdS_B(r_Bm_B) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Verdünnung	Referenz
Ezrin monoklonal	Maus	Ezrin	WB: 1:1000 IF: 1:100	A. Bretscher (New York, USA)
Ezrin polyklonal	Kaninchen	Ezrin	WB: 1:500 IF: 10 µg/ml	Upstate (Lake Placid, USA)
GFP (10164B2)	Maus	GFP	WB: 1:10 IF: -	M. Konradt (Braunschweig, Deutschland)
GST (B-14)	Maus	GST	WB: 1:2000 IF: -	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Penta-His	Maus	His ₆ -tag	WB: 1:20000 IF: -	Quiagen (Hilden, Deutschland)
S100P <i>ascitis</i>	Maus ascitis	S100P	WB: 1:10000 IF: 1:100	Prof. Dr. V. Gerke (Münster, Deutschland)
S100P BD	Maus	S100P	WB: 1:250 IF: -	BD Transduction Laboratories (Erembodegen, Belgien)
S100P R&D	Maus	S100P	WB: 1,5 µg/ml IF: -	R&D Systems (Mineapolis, USA)
Vimentin	Maus	Vimentin	WB: 1:2000 IF: -	Dianova (Hamburg, Deutschland)

2.3.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Referenz
POX α Maus	Ziege	WB: 1:5000	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Cy2 α Maus	Ziege	IF: 1:200	Jackson IR, USA
Cy3 α Maus	Ziege	IF: 1:300	Jackson IR, USA
FITC α Maus	Ziege	IF: 1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
RED-X α Maus	Affe	IF: 1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
POX α Kaninchen	Schwein	WB: 1:5000	DAKO (Glostrup, Dänemark)
CY2 α Kaninchen	Ziege	IF: 1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Cy3 α Kaninchen	Ziege	IF: 1:300	Dianova (Hamburg, Deutschland)
FITC α Kaninchen	Ziege	IF: 1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Texas Red α Kaninchen	Ziege	IF: 1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)

2.4 Enzyme

Enzym	Herkunft
<i>EcoRI</i>	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, USA)
Ribonuclease H (RnaseH)	Roche (Mannheim, Deutschland)
RT <i>Superscript</i>	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
<i>Sall</i>	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
<i>Taq</i> -Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
T4-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2.5 Vektoren und DNA-Konstrukte

2.5.1 Vektoren

Bezeichnung	Bezugsquelle	Zielorganismus
pGEX-4T-1	Amersham Biosciences (Schweden)	<i>E. coli</i>
pET28a (+)	Novagen (Darmstadt, Deutschland)	<i>E. coli</i>
pET23a (+) mod	A. Markov (ZMBE Münster, Deutschland)	<i>E. coli</i>
pKK223-3	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)	<i>E. coli</i>
pEGFP-C2	Clontech (Palo Alto, USA)	Säugerzellen

2.5.2 DNA-Konstrukte

Bezeichnung	c-DNA	Vektor	Klonierungs-enzyme
GST-Ezrin	gesamte humane Ezrin WT cDNA	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-Ezrin	gesamte humane Ezrin WT cDNA	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GFP-Ezrin 567A	gesamte humane Ezrin WT cDNA, Substitution von T567A	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GST-Ezrin T567A	gesamte humane Ezrin WT cDNA, Substitution von T567A	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-Ezrin T567A	gesamte humane Ezrin WT cDNA, Substitution von T567A	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GFP-Ezrin T567D	gesamte humane Ezrin WT cDNA, Substitution von T567D	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GST-Ezrin T567D	gesamte humane Ezrin WT cDNA, Substitution von T567D	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-Ezrin T567D	gesamte humane Ezrin WT cDNA, Substitution von T567D	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GST-Ezrin 310aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-310	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-Ezrin 310aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-310	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GST-Ezrin 233aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-233	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-Ezrin 233aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-233	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>

Bezeichnung	c-DNA	Vektor	Klonierungs-enzyme
GST-Ezrin 173aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-173	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-Ezrin 173aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-173	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GST-Ezrin 197aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-197	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GST-Ezrin 82aa	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-82	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GST-N-ERMAD	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-296	pGEX 4T1	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-N-ERMAD	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-296	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
N-ERMAD	humane Ezrin cDNA kodierend für die As 1-296	pET23a (+) mod.	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GFP-S100P WT	gesamte humane S100P WT cDNA	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-S100P WT	gesamte humane S100P WT cDNA	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
S100P WT	gesamte humane S100P WT cDNA	pKK223-3	<i>EcoRI</i> ; <i>HindIII</i>
GFP-S100P F15A	gesamte humane S100P WT cDNA, Substitution von F15A	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-S100P F15A	gesamte humane S100P WT cDNA, Substitution von F15A	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GFP-S100P 91aa	humane S100P WT cDNA kodierend für die As 1-91	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-S100P 91aa	humane S100P WT cDNA kodierend für die As 1-91	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GFP-S100P 87aa	humane S100P WT cDNA kodierend für die As 1-87	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-S100P 87aa	humane S100P WT cDNA kodierend für die As 1-87	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
GFP-S100P pa	gesamte humane S100P WT cDNA, Substitution von N68C, Q72K, E77S und Deletion von As 21-23	pEGFP-C2	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
His-S100P pa	gesamte humane S100P WT cDNA, Substitution von N68C, Q72K, E77S und Deletion von As 21-23	pET28a (+)	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>
S100P pa	gesamte humane S100P WT cDNA, Substitution von N68C, Q72K, E77S und Deletion von As 21-23	pET23a (+) mod.	<i>EcoRI</i> ; <i>Sall</i>

2.6 Oligonucleotide

Oligonucleotid	Sequenz (5'→3')
5' Ezrin WT	GATCGAATTCATGCCGAAACCAATCAATGTCCG
3' Ezrin WT	GATCGTCGACTTACAGGGCCTCGAACTCGTCGATGC
5' Ezrin T567A	GCCGGGACAAGTACAAGGCGCTGCGGCAGA
3' Ezrin T567A	TGCCGGATCTGCCGCAGCGCCTTGTACTTG
5' Ezrin T567D	GCCGGGACAAGTACAAGGACCTGCGGCAGA
3' Ezrin T567D	TGCCGGACTCTGCCGCAGGTCCTTGTACTTG
3' Ezrin 310aa	GATCGTCGACTTACTGGATCCGGTCTCCCACTG
3' Ezrin 233aa	GATCGTCGACTTACTTATCATCTTTCTCATAAATATTC
3' Ezrin 197aa	GATCGTCGACTTAGTCCTGAGCAATCTTCAG
3' Ezrin 173aa	GATCGTCGACTTACTGGATCCGGTCTCCCACTG
3' Ezrin 82aa	GATCGTCGACTTAGGCCCGGAACTTGAAGT
5' S100P WT	GATCGAATTCATGACGGAAGTAGAGACAGCCATG
3' S100P WT	GATCCTCGACTCATTGAGTCCTGCCTTCTCAAAG
3' S100P 91aa	GATCGTCGACTTACTTCTCAAAGTACTTGTGACAGG
3' S100P 87aa	GATCGTCGACTTACTTGTGACAGGCAGACGTGAT
5' S100P Subst.	TCAAGGACCTGGACGCCTGCGGAGATGCCAAGGTGGACTTCAGTAGCTTCATCGTG
3' S100P Subst.	GCCACGAACACGATGAAGCTACTGAAGTCCACCTTGGCATCTCCGCAGGCGTCCAG
5' S100P Δ21-23aa	TCGGGCAGCACGCAGACCCTGACC
3' S100P Δ21-23aa	GCGTGCTGCCCGAATATCGGGAAAAGACG

Die verwendeten Oligonucleotidprimer wurden entweder von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder Prologo (Paris) synthetisiert. Die Restriktionsschnittstellen sind in blau, die Startcodons in grün, die Stopcodons in rot dargestellt.

2.7 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
RPMI 1640 Medium	RPMI 1640 Medium 1 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 % (v/v) FCS (fötales Kälberserum)
DMEM Medium	Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) 2 mM L-Glutamin 1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % (v/v) FCS (fötales Kälberserum)
MEM Grundmedium	Eagle's minimal essential Medium (MEM) 2 mM L-Glutamin 1 mM Sodium-Pyruvat 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 % (v/v) FCS (fötales Kälberserum)
MCDB Medium	MCDB 131 Medium 10 mM L-Glutamin 0,5 % (v/v) Gentamycin [10 mg/ml] 10 % (v/v) FCS GOLD (fötales Kälberserum) 10 ng/ml EGF 1 µg/ml Hydrocortison

2.8 Chemikalien und sonstige Hilfsmittel

2.8.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid Stammlösung (30% Acrylamid (w/v) + 0,8% Methylenbisacrylamid)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH (Oldendorf, Deutschland)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bacto-Agar	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Bradford-Reagenz	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
BSA Fraktion V	Roche (Mannheim, Deutschland)
BS3 (Sulfo-DSS „crosslinker“)	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
Complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	Roche (Basel, Schweiz)
DEAE-Sephacel	Amersham (Schweden)
Desoxycholinsäure	Sigma (Steinheim, Deutschland)
DNA-Molekulargewichtsstandard: λ DNA/ <i>Eco911</i> (<i>BstEII</i>) Marker 15	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
DNA-Molekulargewichtsstandard: 1 kbp DNA-Leiter	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
Dulbecco's MEM	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Eagle's MEM	Invitrogen (Groeningen, Niederlande)
EDTA	Aplichem (Darmstadt, Deutschland)
EGF (Epidermal Growth Factor)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
EGTA	Aplichem (Darmstadt, Deutschland)
Fibronectin (human)	Becton Dickinson Labware (Bedford, USA)
FCS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences (Schweden)
Glutathion-Sepharose 4B Fast Flow	Amersham Biosciences (Schweden)
G418 Sulphate	PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
Hydroxyapatit	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Ionophor A23187	Calbiochem (La Jolla, USA)
IPTG	Aplichem (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	Aplichem (Darmstadt, Deutschland)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Loading Dye	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

Chemikalien	Hersteller
Mowiol® 4-88	Calbiochem (La-Jolla, USA)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PBS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Phalloidin-TRITC	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Phenyl-Sepharose	Amersham Biosciences (Schweden)
PMSF	Boehringer Mannheim (Deutschland)
POPC (Produktnr.850547)	Avanti polar lipids (Alabaster, USA)
Protein-Molekulargewichtsstandard Prestained Protein Marker (Broad Range)	NEB (Schwalbach/Taunus, Deutschland)
PtdIns(4,5)P ₂	Avanti polar lipids (Alabaster, USA)
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
SDS Ultra Pure	ICN Biomedical Inc. (Ohio, USA)
Triton-X100	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypan-blue Färbelösung	Perbio Science (Bonn, Deutschland)
Trypton	Applichem (Darmstadt, Deutschland)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien hatten p.A.-Qualität und wurden entweder von Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

2.8.2 Allgemeine Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Dialyseschläuche	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Diff Quick Färbeset	Dade Behring (Düdingen, Schweiz)
Effectene Transfection Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
ECL	Aplichem (Darmstadt, Deutschland)
ECL ⁺	Pharmacia Biotech (Stockholm, Schweden)
Gewebekulturschalen, Plastik, versch. Größen	Greiner Labortechnik (Frickenhäusen, Deutschland)
LipoFectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen (Groeningen, Niederlande)
Nucleofector Kit T	Amaxa (Köln, Deutschland)
Plasmid Purification Kit	Genomed (Bad Oeyenhausen, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Polypropylen-Säulen (5 ml)	Pierce, (Rockford, IL)
Protran® Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell (Kassel)
Röntgenfilm 13 x 18 cm, X-OMAT AR bzw. UV Film	Eastman Kodak Company (USA)
Transwell-Filter Ø 8 µm	Costar (Bodenheim, Deutschland)

2.8.3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Bronson Sonifier 250	Heinemann Ultraschall- u. Labortechnik (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
CCD-Kamera (Cybertech CX1)	Cybertech (Berlin, Deutschland)
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad (München, Deutschland)
FACSscan	Becton & Dickinson (USA)
French Pressure Cell Press	Sim-Aminco (New York, USA)
Hoefler Drygel Sr.	Pharmacia Biotech (Stockholm, Schweden)
Innova 4000 Incubator shaker	New Brunswick Scientific (Nürtingen, Deutschland)
Mastercycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mini-Trans-Blot Kammer	BioRad (München, Deutschland)
Multiphor™ II Elektrophorese-Einheit	Amersham (Schweden)
Nucleofector	Amaxa (Köln, Deutschland)
RoboCycler Gradient 96	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
Rocking-Plattform	Biometra (Deutschland)
Sterilwerkbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland) Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
UV-Transluminator	Biometra (Deutschland)
Vakuumtrockner speed vac	Savant Instruments (New York, USA)

2.8.4 Mikroskopie

Bezeichnung	Hersteller
Axiovert 200M	Zeiss (Deutschland)
Leica DM RXA Mikroskop	Leica (Wetzlar)
CCD-Kamera, Micro Max	Princeton Instruments (Trenton, USA)
MetaMorph-Software	Universal Imaging (West Chester, USA)

2.8.5 Zentrifugen

Bezeichnung	Hersteller
Avanti™ J-25 Zentrifuge Rotoren: JLA-16.250; JA-25.500	Beckman (Fullerton, USA)
Biofuge fresco	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Biofuge pico	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Optima™ L-70K Ultrazentrifuge Rotoren: 70 Ti, 45 Ti	Beckman (Fullerton, USA)
Optima™ TL Ultrazentrifuge Rotoren: TLA 100.4, TLA 120	Beckman (Fullerton, USA)
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
Sigma Laborzentrifuge 2K15	Sigma (Steinheim, Deutschland)

3. Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme TOP10F' und BL21(DE3) pLysS verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in sterilem LB-Medium und zur Selektion von Plasmid tragenden *E. coli*-Stämmen wurden dem Medium gegebenenfalls entsprechende Antibiotika zugesetzt.

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml

Für die Anzucht einer Bakterienkultur wurde eine Einzelkolonie über Nacht in 3 ml LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Kulturen eines größeren Volumens wurden 1:50 mit einer stationären Vorkultur inokuliert und für 3-18 h im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert. Die Inkubation von Bakterienausstrichen erfolgte über Nacht bei 37 °C auf Selektionsnährböden. Zur dauerhaften Aufbewahrung der Bakterien wurden Glycerin-Kulturen mit 15 % Glycerin erzeugt und bei -80 °C gelagert.

LB-Flüssigmedium : 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl

LB-Festmedium : 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl;
1,5 % Bacto-Agar

3.1.1 Bestimmung des Bakteriumwachstums (Trübungsmessung)

Zur Bestimmung des Bakterienwachstums wurde mit einem Spektralphotometer die optische Dichte der Bakterien suspension bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Eine gemessene OD₆₀₀ von 1 entspricht dabei einem ungefähren Titer von 1×10^9 *E. coli*-Bakterien/ml.

3.1.2 Erzeugung kompetenter *E. coli*

3.1.2.1 Erzeugung elektrokompeter *E. coli* TOP10F'

Zur Herstellung elektrokompeter Bakterien wurde eine 1 l LB-Kultur 1:50 mit einer *E. coli* Top10F' Vorkultur inokuliert. Bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,4 - 0,7 wurden die Bakterien 10 min auf Eis gestellt, um ein weiteres Wachstum zu verhindern. Anschließend wurden die Bakterien durch eine 20minütige Zentrifugation bei 2800 g und 4 °C sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde auf Eis gestellt und in 400 ml kaltem *Auqua bidest.* aufgenommen. Nach erneuter Sedimentierung bei 2800 g und 4 °C für 20 min wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Die Glycerinkultur wurde als 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.2.2 Erzeugung Calcium-kompeter *E. coli* BL21(DE3) pLysS

Zur Herstellung temperaturkompeter *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Bakterien wurde eine 50 ml Hauptkultur 1:50 mit einer Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,3 - 0,4 auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien wurden 10 min bei 2500 rpm (Heraeus Megafuge) und 4 °C sedimentiert und in 40 ml eiskalter 100 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut sedimentiert und das Bakterienpellet in 2 ml 100 mM $CaCl_2$ mit 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert. 200 µl Aliquots der Glycerinkultur wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.3 Transformation elektrokompeter *E. coli*

Zur Elektroporation wurden 50 µl der elektrokomperten *E. coli* TOP10F' mit 20 ng eines Ligationsansatzes oder 0,1 µg Plasmid-DNA vermischt. Anschließend wurden die Bakterien in eine gekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,1 cm) überführt und kurz einem Elektroschock (Spannung 1800 V, Kapazität 50 µF, Widerstand 100 Ω) ausgesetzt. Die Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Regeneration für 30 min bei 37 °C aufgeschüttelt. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension zur Auswahl transformierter Bakterien auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

3.1.4 Transformation Calcium-kompetenter *E. coli*

Zur Transformation des Calcium-kompetenten *E. coli* Stammes BI21(DE3) pLysS wurden 200 µl der kompetenten Bakterien mit 80 ng Plasmid-DNA vermenget und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 90 sec bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration wurde den Bakterien 1 ml LB-Medium zugegeben und diese 45 min im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Nach dieser Regenerationszeit konnte die Bakteriensuspension zur Selektion ausplattiert werden.

3.2 DNA-Techniken

3.2.1 Plasmidisolierung aus Bakterien

Die Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse der Bakterienzellen. Plasmid-DNA kann aufgrund ihrer überspiralisierten Form renaturieren und bleibt nach der alkalischen Lyse erhalten. Genomische DNA hingegen wird dauerhaft in Einzelstränge zerlegt und denaturiert.

3.2.1.1 Plasmidisolierung im Mini-Format

Die Plasmidisolierung im Mini-Format wurde zur Analyse der selektierten Klone durchgeführt.

Zur Plasmidisolierung wurden die Plasmid tragenden Klone unter Selektionsdruck in 1 ml LB-Kulturen für mindestens 4 h aufgeschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien durch eine 5minütige Zentrifugation bei 500 rpm und 4 °C (Biofuge pico) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde zunächst in 300 µl Puffer E1 resuspendiert, anschließend wurden 300 µl Lysispuffer E2 hinzugefügt und gemischt. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde der Puffer 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer E3 wurde der Ansatz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällten Proteine und die chromosomale DNA wurden durch eine 15minütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Biofuge fresco) sedimentiert, der resultierende Überstand mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt und erneut 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 13000 rpm (Biofuge fresco) zentrifugiert. Das Pellet wurde im Vakuum getrocknet und in 30 µl 10 mM Tris; pH 8,0 resuspendiert.

Puffer E1:	50 mM Tris/HCL pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Lysispuffer E2:	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Neutralisationspuffer E3:	3,0 M KAc pH 5,5

3.2.1.2 Plasmidisolierung im Maxi-Format (Plasmid-purification Kit; Genomed)

Zur Isolierung großer Plasmid-DNA Mengen mit hoher Reinheit wurde das Plasmid Purifikation Kit von Genomed nach Herstellerangaben verwendet. Das DNA-Pellet wurde in 400 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 oder zur Sequenzierung in 400 µl sterilem *A. dest.* resuspendiert.

3.2.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus verschiedenen Zelllinien erfolgte nach Anleitung des „RNA easy Protokolls“ der Firma Qiagen. Zur Isolierung wurden maximal 10^7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit 0,05 % Trypsin, 0,2 % EDTA abgelöst und durch eine 4minütige Zentrifugation bei 800 rpm und 4 °C (Megafuge 1.0R, Rotor 7550) sedimentiert. Das resultierende Sediment wurde in 2 ml PBS resuspendiert und konnte für die Isolierung der gesamten RNA verwendet werden.

3.2.3 Bestimmung von DNA-/RNA-Konzentrationen

Nucleinsäuren besitzen aufgrund ihrer aromatischen Basen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Absorption ist direkt proportional zur Konzentration der Probe (50 µg/ml doppelsträngige DNA: Optische Dichte = 1), und kann daher zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Die Reinheit der DNA/RNA kann über den Quotienten OD_{260}/OD_{280} ermittelt werden. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} Quotienten von 1,8, eine reine RNA-Lösung einen Quotienten von 2,0.

Die Konzentration der DNA/RNA wurde mit dem Eppendorf BioPhotometer bestimmt.

3.2.4 Reverse-Transkriptase (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde nach dem RT-PCR Protokoll „Using Superscript Reverse Transcriptase“ der Firma Life Technologies durchgeführt. Als Matrize für die RT-PCR wurde die Gesamt-RNA verschiedenster Zelllinien verwendet und zunächst der in Tabelle 2 beschriebene Ansatz pipettiert.

Tabelle 2: Ansatz zur Bindung der Primer an das RNA-Template

Substanz	Menge
Template	5 µg
Rd(N) ₆ [200 ng/µl]	1 µl
GSP [5 pmol/µl]	4 µl
H ₂ O	2,8 µl

Rd(N)₆ = random hexamers; GSP = Gen-spezifischer Primer

Zur Bindung der Primer an die RNA-Matrize wurden die Ansätze 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Reagenzien zu den Ansätzen gegeben.

Tabelle 3: RT-PCR Ansatz

Substanz	Menge
5x Polymerase-Puffer	4 µl
DTT [0,1 M]	2 µl
dNTPs [10 mM]	3 µl
RT-Superscript-Polymerase [200 U/µl]	1 µl

Die Ansätze wurden zur cDNA-Synthese im Eppendorf-Cycler nach folgendem Schema inkubiert:

10 min 30 °C → 60 min 42 °C → 30 min 50 °C → 10 min 70 °C

3.2.4.1 Ribonuclease H-Verdau

Die Ribonuclease H ist eine Endoribonuclease, welche den RNA-Strang von RNA-DNA-Hybriden abbaut. Sie wird daher oftmals nach einer RT-PCR zur Entfernung des mRNA-Templates eingesetzt.

Zum Abbau der mRNA wurden 2 Einheiten der *E. coli* RNase H verwendet. Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 37 °C.

3.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird zur gezielten Vermehrung (Amplifikation) eines bestimmten, definierten und begrenzten Nucleinsäurebereiches eingesetzt. Über synthetische Oligonucleotidprimer können zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingeführt werden, welche die weitere Klonierung des amplifizierten Fragmentes erleichtern.

3.2.5.1 PCR Bedingungen zum Nachweis der Expression des endogenen S100P in verschiedenen Zelllinien

Zur Untersuchung der Expression des endogenen S100P in verschiedenen Zelllinien wurde die mittels RT-PCR erzeugte cDNA aus verschiedenen Zelllinien als Matrize eingesetzt. Für die PCR wurde der in Tabelle 4 beschriebene Ansatz erstellt und die S100P WT Primer verwendet.

Tabelle 4: Reaktionsansatz zum Nachweis der Expression des endogenen S100P in verschiedenen Zelllinien

	50 µl Ansatz
cDNA	5 µl
10 x <i>Tag</i> -Puffer	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	3 µl
5'-Primer [20 pmol/µl]	4 µl
3'-Primer [20 pmol/µl]	4 µl
Betain [5 M]	2,5 µl
DMSO (sss)	1,25 µl
<i>Tag</i> -Polymerase [50 U/µl]	0,5 µl

Die Inkubation der PCR-Ansätze erfolgte nach dem in Tabelle 5 beschriebenen Programm. Für die Bindung der Primer wurde hierbei eine Temperatur von 69 °C gewählt. Die Produkte wurden abschließend in einer analytischen Gelelektrophorese (3.2.7) überprüft.

Tabelle 5: Programme zur Inkubation der PCR-Ansätze zum Nachweis der Expression des endogenen S100P in verschiedenen Zelllinien

	Fenster		69 °C	72 °C	6 °C	Zyklen
Programm	1	5 min 95 °C	/	/	/	1
	2	45 sec 94 °C	1 min	4 min	/	30
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0

3.2.5.2 PCR Bedingungen zur Erzeugung C-terminal verkürzter Ezrin- und S100P-Konstrukte

Für die Erzeugung der C-terminal verkürzten Ezrin und S100P Konstrukte wurden die Konstrukte His-Ezrin und His-S100P WT als Template verwendet. Die Reaktionsansätze für die Erzeugung der Ezrin 310aa-, 233aa- und 173aa- sowie der S100P 91aa- und 87aa-Konstrukte wurden nach dem Schema für Ansatz A erstellt. Für die PCR zur Erzeugung der Ezrin 197aa- oder 82aa-Konstrukte wurde der Ansatz B (Tabelle 6) verwendet.

Tabelle 6: Reaktionsansätze zur Erzeugung von C-terminal verkürzten Ezrin- und S100P-Konstrukten

50 µl Ansätze:	Ansatz A	Ansatz B
Template [10 ng/µl]	5 µl	5 µl
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl	2,5 µl
5'-Primer [20 pmol/µl]	1 µl	1 µl
3'-Primer [20 pmol/µl]	1 µl	1 µl
Betain [5 M]	5 µl	-
DMSO (sss)	2,5 µl	-
<i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase [2,5 U/µl]	1,8 µl	0,5 µl

Die Inkubation der PCR-Ansätze erfolgte für die Konstrukte Ezrin 310aa und 173aa sowie S100P 91aa und 87aa im RoboCycler nach dem Programm I. Für das Ezrin 233aa-Konstrukt wurde das Programm II und für die Ezrin 197aa- und 82aa-Konstrukte das Programm III (Tabelle 7) verwendet. Die Primerbindung an die Zielsequenz erfolgte im Falle der Ezrin 310aa-, 233aa- und 173aa-Konstrukte bei 60 °C und bei den Ezrin 197aa- und 82aa-Konstrukten bei 62 °C. Im Falle der S100P 91aa- und 87aa-Konstrukte wurde eine Temperatur von 69 °C verwendet.

Tabelle 7: Programme zur Inkubation der PCR-Ansätze für die Erzeugung der Ezrin und S100P Konstrukte

	Fenster		60 °C- 69 °C	72 °C	6 °C	Zyklen
Programm I	1	90 sec 95 °C	/	/	/	1
	2	45 sec 94 °C	45 sec	4 min	/	30
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0
Programm II	1	90 sec 95 °C	/	/	/	1
	2	45 sec 94 °C	60 sec	4 min	/	35
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0
Programm III	1	2 min 95 °C	/	/	/	1
	2	30 sec 95 °C	30 sec	45 sec	/	36
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0

Die Produkte wurden zunächst mittels analytischer Gelelektrophorese (3.2.7) überprüft und im Anschluss aufgereinigt (3.2.7.1).

3.2.5.3 PCR Bedingungen zur Erzeugung der Ezrin T567D und T567A

Konstrukte

Die Ezrin T567D und T567A Konstrukte wurden über eine zweistufige PCR (siehe Abbildung 11) generiert. In der ersten Stufe wurden zunächst zwei parallele PCR Ansätze mit jeweils einem 5' bzw. 3'- Ezrin WT Primer und einem Ezrin Substitutionsprimer (nach Ansatz A) sowie dem His-Ezrin Konstrukt als Template erstellt. In der zweiten Stufe wurden die resultierenden PCR-Fragmente (PCR 1.1: 1600 bp Fragment, PCR 1.2: 100 bp Fragment) gemeinsam als Template für die PCR (nach Ansatz B, Tabelle 8) mit den Ezrin WT -Primern verwendet.

Tabelle 8: Reaktionsansätze zur Erzeugung der Ezrin T567D und T567A Konstrukte

50 µl Ansätze:	Ansatz A	Ansatz B
Template [10 ng/µl]	2 µl	1 ng PCR 1.1 16 ng PCR 1.2
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl	5 µl
dNTPs [10 mM]	5 µl	5 µl
5'-Primer [20 pmol/µl]	1 µl	1 µl
3'-Primer [20 pmol/µl]	1 µl	1 µl
Betain [5 M]	5 µl	5 µl
<i>Pfu</i> -Turbo-Polymerase [2,5 U/µl]	1 µl	1 µl

Die Inkubation der gesamten PCR-Ansätze erfolgte nach dem in Tabelle 9 abgebildeten Programm I, die Primerbindung an die Zielsequenz erfolgte jeweils bei 62 °C.

Tabelle 9: Programme zur Inkubation der PCR-Ansätze für die Erzeugung der Ezrin T567D und T567A Konstrukte

	Fenster		62 °C	72 °C	6 °C	Zyklen
Programm I	1	60 sec 95 °C	/	/	/	1
	2	45 sec 95°C	60 sec	4 min	/	16
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0

Die Produkte wurden mittels analytischer Gelelektrophorese (3.2.7) überprüft und im Anschluss aufgereinigt (3.2.7.2).

3.2.5.4 PCR Bedingungen zur Erzeugung des S100P pa Konstruktes

Das S100P pa Konstrukt wurde in zwei Schritten erzeugt. Im ersten Schritt wurden die N-terminalen Aminosäuren 21-23 (S100P Δ 21-23) deletiert. Hierzu wurden im Rahmen einer zweistufigen PCR (siehe Abbildung 11) zunächst zwei parallele PCR Ansätze mit jeweils einem S100P WT 5'- bzw. 3'-Primer und einem Deletionsprimer Δ 21-23 (nach Ansatz A, Tabelle 10) erstellt. Die resultierenden PCR-Fragmente (PCR 1.1: 100 bp; PCR 1.2: 200 bp) wurden anschließend als Template für die folgende PCR (nach Ansatz B; Tabelle 10) mit den S100P WT-Primern verwendet.

Im zweiten Schritt wurden ausgehend von dem S100P Δ 21-23 Konstrukt die Substitutionen N68C, Q72K und E77S eingefügt. Hierzu wurde ebenfalls die zweistufige PCR mit zwei parallelen PCR Ansätzen mit jeweils einem 5'- bzw. 3'-S100P WT-Primer und einem

Substitutionsprimer (nach Ansatz C; Tabelle 10) durchgeführt, und die resultierenden PCR-Fragmente (PCR 1.1: 100 bp; PCR 1.2: 200 bp) als Template für die folgende PCR mit den S100P WT Primern (nach Ansatz D; Tabelle 10) verwendet.

Tabelle 10: Reaktionsansätze zur Erzeugung des S100P pa Konstruktes

50µl Ansätze:	Ansatz A	Ansatz B	Ansatz C	Ansatz D
Template	10 ng	10 µg PCR 1.1 5 µg PCR 1.2	20 ng	10 µg PCR 1.1 5 µg PCR 1.2
10 x Puffer	5 µl <i>Tag</i> -Puffer	5 µl <i>Tag</i> -Puffer	5 µl <i>Pfu</i> -Puffer	5 µl <i>Pfu</i> -Puffer
dNTPs [10 mM]	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
5'-Primer [10 ng/µl]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
3'-Primer [10 ng/µl]	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Betain [5 M]	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Polymerase [2,5 U/µl]	1 µl <i>Tag</i> -Polymerase	1 µl <i>Taq</i> -Polymerase	1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase

Die Inkubation der ersten PCR-Ansätze zur Erzeugung des S100P Δ 21-23 Konstruktes erfolgte nach dem in Tabelle 9 abgebildeten Programm I und die Primerbindung an die Zielsequenz bei 62°C. Für die zweite PCR zur Erzeugung des S100P Δ 21-23 Konstruktes wurde das Programm II verwendet, wobei die Primerbindung bei 58 °C erfolgte.

Die ersten beiden PCR Ansätze zur Erzeugung der Substitutionen wurden nach dem Programm III (Tabelle 11) inkubiert und die Primerbindung erfolgte bei 68 °C. Die abschließende PCR mit den S100P WT-Primern erfolgte nach Programm II, bei einer Primerbindungstemperatur von 60 °C.

Tabelle 11: Programme zur Inkubation der PCR-Ansätze für die Erzeugung des S100P pa Konstruktes

	Fenster		58 °C- 71 °C	72 °C	6 °C	Zyklen
Programm I	1	2 min 95 °C	/	/	/	1
	2	45 sec 94 °C	45 sec	2 min	/	36
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0
Programm II	1	2 min 95 °C	/	/	/	1
	2	30 sec 95 °C	30 sec	30 sec	/	36
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0
Programm III	1	2 min 95 °C	/	/	/	1
	2	90 sec 95 °C	30 sec	2 min	/	25
	3	/	/	10 min	/	1
	4	/	/	/	/	0

Zur Überprüfung der DNA-Amplifikation erfolgte eine analytische Gelelektrophorese (3.2.7), die PCR-Produkte wurden für die weitere Verwendung aufgereinigt (3.2.7.1).

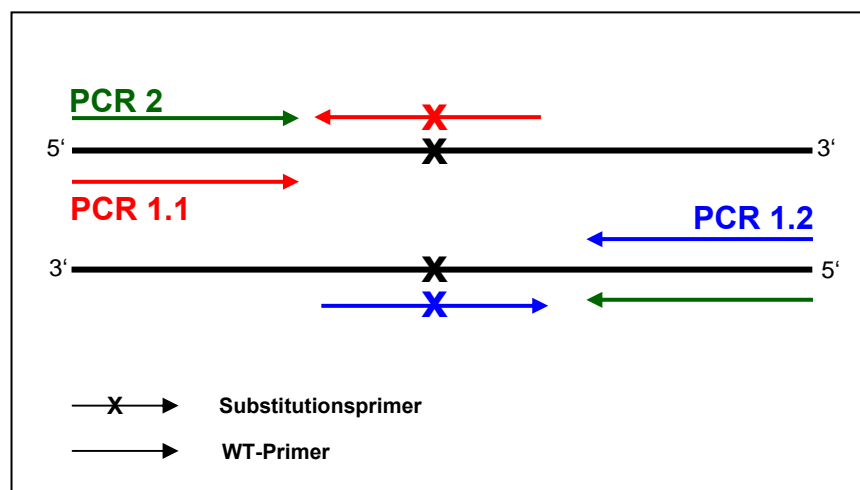


Abbildung 11: Schematische Darstellung der zweistufigen PCR Die PCR 1.1 und 1.2 erfolgten jeweils unter der Verwendung eines Substitutionsprimers und des zugehörigen WT-Primers. Die Produkte dieser beiden PCRs dienten als Template für die PCR 2, die mit den beiden WT-Primern durchgeführt wurde.

3.2.6 Reinigung von PCR-Produkten

PCR Produkte mit einer Größe von 100 bp bis 10 kb wurden mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN gereinigt. Bei diesem Kit wurden einzel- oder doppelsträngige PCR-Produkte an eine Silikagel-Säule gebunden, wodurch überschüssige Primer, Nucleotide, Polymerasen, sowie Salze entfernt wurden. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von DNA- und RNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,1 bis 25 kb. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl für analytische, als auch für präparative Zwecke durchgeführt. Es wurden 0,3 - 2 %ige Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer verwendet, wobei zur Detektion der DNA dem Agarose-Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beigefügt wurde. Vor dem Gellauf wurden die Proben mit 6fach-Probenpuffer versetzt, dessen Glycerin-Gehalt ein Absinken der aufgetragenen Proben gewährleistet. Die angelegte Spannung bzw. Stromstärke sowie die Laufzeiten waren von den gewünschten Trenneffekten abhängig. Die Detektion der mit Ethidiumbromid interkalierenden DNA-Banden erfolgte auf einem UV-Transluminator bei 302 nm. Die Gele wurden mittels einer CCD-Kamera dokumentiert.

1 x TAE-Puffer :	40 mM Tris
(Tris-Acetat-EDTA) pH 8,0	40 mM Eisessig
	1 mM EDTA
	(1 mM Guanosinhydrat)
Probenpuffer (6x):	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % (w/v) Xylencyanol
	30 % (w/v) Glycerin
	50 mM EDTA

3.2.7.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (QIAquick Gel Extraction Kit)

Zur Aufreinigung und Extraktion von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70 bp bis 10 kb aus Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ verwendet. Die Fragmente wurden gemäß Herstellerangaben der Firma QIAGEN nach dem Protokoll „using a microcentrifuge“ eluiert und gereinigt.

3.2.8 Restriktion

Die zur Restriktion eingesetzte Enzymmenge wurde unter Berücksichtigung der Herstellerangaben für den Verdau von λ Referenz-DNA ermittelt. Für die Restriktionen wurden die jeweiligen vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer verwendet. Die Größe des Reaktionsvolumens wurde so gewählt, dass die Glycerinkonzentration unterhalb 5 % (w/v) lag. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsansätze wurden zwei Stunden bei 37 °C, die analytischen Restriktionen eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert und die restringierten Vektoren wurden mittels des „QIAquick Gel Extraction Kits“ gereinigt (3.2.7.1). Zur Analyse von Vektoren wurde der Erfolg der Restriktion anhand einer Gelelektrophorese (3.2.7) überprüft.

3.2.9 Ligation

Für die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden wurde die T4-DNA-Ligase aus *E. coli* verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurden hierzu 600 ng des restringierten Vektors und die dem molaren Verhältnis von 1:3 oder 1:6 (Vektor:Insert) entsprechende Menge des Inserts verwendet. Die Ligation wurde mit dem vom Hersteller empfohlenen 10 x Ligationspuffer angesetzt. Die Ligationsansätze wurden jeweils mit 1 μ l T4 DNA-Ligase versehen und über Nacht bei 22 °C inkubiert.

3.2.10 Klonierung der DNA-Konstrukte

3.2.10.1 Generierung der C-terminal verkürzten S100P und Ezrin

Konstrukte

Für die Generierung der C-terminal verkürzten S100P und Ezrin Konstrukte wurden mittels PCR (3.2.5.1) zum einen Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* am 5' Ende bzw. *SalI* am 3' Ende, zum anderen ein Stopcodon in der entsprechenden C-terminalen Sequenz des humanen S100Ps oder Ezrins eingefügt.

Die PCR Produkte und die Vektoren (pET28a (+), pEGFP-C2 und pGEX-4T-1) wurden mit *EcoRI*- und *SalI* geschnitten (3.2.8) und in einer präparativen Gelelektrophorese isoliert und gereinigt (3.2.7.1). Im Anschluss wurden die gereinigten PCR-Fragmente über diese Schnittstellen in die MCS des jeweiligen Vektors ligiert (3.2.9). Der Erfolg der Klonierungen wurde durch Sequenzierung (3.2.11) überprüft.

3.2.10.2 Generierung der Ezrin T567A und T567D Konstrukte

In der humanen Ezrin Sequenz wurden über eine zweistufige PCR (3.2.5.2) die C-terminale Aminosäure Threonin 567 durch Alanin (T567A) oder Asparaginsäure (T567D) ersetzt und Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* am 5' Ende und *SalI* am 3' Ende eingefügt.

Die PCR-Produkte wurden über eine präparative Gelelektrophorese (3.2.7.1) gereinigt und zusammen mit den Vektoren (pET28a (+), pEGFP-C2 und pGEX-4T-1) mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten (3.2.8). Anschließend erfolgte eine erneute Reinigung der geschnittenen Fragmente und die Ligation der Ezrin-Fragmente mit den geschnittenen Vektoren (3.2.9). Die Klonierungen wurden durch Sequenzierung (3.2.11) überprüft.

3.2.10.3 Generierung des S100P pa Konstruktes

Die Generierung des S100P pa Konstruktes erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden über eine zweistufige PCR die N-terminalen Aminosäuren 21-23 deletiert (3.2.5.3). Das resultierende PCR Fragment wurde über eine präparative Gelelektrophorese (3.2.7.1) gereinigt, mit *EcoRI* und *SalI* geschnitten (3.2.8) und mit dem ebenfalls *EcoRI* und *SalI* geschnittenen pET28a (+) Vektor ligiert. Ausgehend von diesem S100P Δ 21-23-Konstrukt erfolgte im zweiten Schritt die Substitution der Aminosäuren Asparagin 68 durch Cystein (N68C), Glutamin 72 durch Lysin (Q72K) und Glutaminsäure 77 durch Serin (E77S). Hierzu wurde ebenfalls eine zweistufige PCR (3.2.5.3) durchgeführt und das resultierende PCR Fragment nach einer Reinigung (3.2.7.1) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI*

geschnitten (3.2.8). Abschließend wurden das restringierte PCR-Fragment mit den ebenfalls *EcoRI* und *Sall* geschnittenen und gereinigten Vektoren (pET28a (+) und pEGFP-C2) ligiert. Die erzeugten S100P pa Konstrukte wurden durch Sequenzierung (3.2.11) auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.2.11 DNA-Sequenzierung

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Konstrukte wurden auf ihre Korrektheit geprüft. Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Passagieren von adhärent wachsenden Zellen

Adhären wachsende Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin und 0,2 % EDTA abgelöst, durch Zentrifugation sedimentiert (4 min bei 800 rpm, Megafuge 1.0R, Rotor 7550) und neu ausgesät. Zur Fortführung der Kultur wurden, mit Ausnahme der HeLa-Zellen (Verdünnung 1:10), die Zellen 1:5 verdünnt ausgesät.

PBS pH 7,4 :	137 mM NaCl
	2,2 mM KCl
	4,3 mM Na ₂ HPO ₄
	1,4 mM KH ₂ PO ₄

3.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde ein Aliquot dieser Suspension 1:10 mit Trypan-blue Färbelösung versetzt. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt und die Zellzahl wurde anhand der nachstehenden Gleichung berechnet:

$$\text{Zellen/Großquadrat} \times 10^4 \times VF = \text{Zellen/ml}$$

VF = Verdünnungsfaktor

Großquadrat = 24 Kleinquadrate

1×10^4 = Kammerfaktor

3.3.3 Einfrieren von Zellen

Für die längerfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden die Zellen einer zu 90 % konfluenten 58 cm²- Schale abgelöst, in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Zur Gewährleistung eines möglichst schonenden Gefrierens wurden die Zellen zunächst 1 h bei -20 °C und anschließend 24 h bei -80 °C gelagert, bevor sie zur dauerhaften Aufbewahrung in Stickstofftanks (-196 °C) überführt wurden.

3.3.4 Auftauen von Stickstoffkulturen

Die stickstoffgefrorenen Zellen wurden zunächst vorsichtig angetaut und in kaltem Medium aufgenommen, bevor sie durch Zentrifugation (4 min; 800 rpm, Megafuge 1.0R, Rotor 7550) sedimentiert wurden. Das resultierende Zellpellet wurde in einem geeigneten Volumen an Medium resuspendiert und die Zellsuspension in eine 58 cm² Gewebekulturschale überführt.

3.3.5 Erzeugung stabiler HTB58-Mischklonpopulationen

Zur Herstellung stabil transfizierter Zellen wurden HTB58-Zellen mit den Konstrukten GFP-S100P WT, GFP-S100P F15A, GFP-S100P 91aa, GFP-S100P 87aa, GFP-Ezrin T567D und dem EGFP-Leervektor mittels Elektroporation transfiziert. 24 h nach der Elektroporation wurde zur Selektion transfizierter Zellen dem Medium G418-Sulphat [750 µg/ml] zugegeben. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, bis auf den Kulturschalen deutlich einzelne Zellkolonien erkennbar waren. Diese Zellen wurden abgelöst (3.3.1), im Durchflusszytometer hinsichtlich der Expression der GFP-fusionierten Konstrukte selektiert, und als Mischklonpopulation unter ständigem Selektionsdruck weiterkultiviert.

3.3.6 Stimulierung von Zellen

Zur Stimulierung wurden zu 60 % konfluente Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend je nach Verwendungszweck 3 h bis 24 h in serum-depletiertem Medium weiterkultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen entweder durch die 30minütige Zugabe von 100 ng/ml EGF, Serum-haltigem Medium oder der 1minütigen Inkubation mit 1 µM Ionophor A23187 in serum-depletiertem Medium stimuliert.

3.3.7 Transfektion von Säugerzellen

3.3.7.1 Liposomen vermittelte Transfektion

Bei dieser Transfektionsmethode wird die Plasmid-DNA mit kationische sowie neutrale Lipide enthaltenden Liposomen vermischt, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Plasmide interagieren. Es entstehen sogenannte Lipoplexe, die über Endozytoseereignisse in die Zellen aufgenommen werden können.

3.3.7.1.A Transfektion mit Effectene

Zur Transfektion von HeLa-Zellen wurde das auf dem Prinzip der Liposomen vermittelten Transfektion basierende Effectene[®] Kit verwendet. Die Transfektion erfolgte gemäß Herstellerangaben mit einem Verhältnis DNA zu Effectene[®]-Reagenz von 1:10. Es wurden für die HeLa-Zellen Transfektionsraten von ungefähr 40 % erzielt.

3.3.7.2 Transfektion mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation werden suspendierte Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen in hoher Feldstärke ausgesetzt. Dieser elektrische Puls bewirkt die Erzeugung von Poren in der Plasmamembran der Zellen, über die Makromoleküle wie DNA aufgenommen werden können.

3.3.7.2.A Elektroporation

Für die Elektroporation wurden die Zellen einer konfluenten 58 cm² Schale verwendet. Diese wurden abgelöst, sedimentiert, und das resultierende Zellsediment wurde in 1 ml Medium aufgenommen. Jeweils 500 µl der Zellsuspension wurden in eine Elektroporationsküvette überführt und zu jedem Ansatz wurde zunächst 15 µg DNA hinzugefügt, bevor die Zellen einer gepulsten Spannung von 200 V bei einer Kapazität von 950 µF ausgesetzt wurden. Nach dem Elektroporieren wurden die Zellen auf eine vorbereitete Schale ausgebracht und nach einem Tag erfolgte zur Erhaltung der Zellvitalität ein Mediumwechsel. Mit dieser Methode wurden Transfektionsraten für HTB58-Zellen von 10 % und für A431-Zellen von ca. 2 % erlangt.

3.3.7.2.B Nukleofektion von A431-Zellen (Amaxa)

Die Nukleofektion ist eine auf der allgemeinen Elektroporation basierende effiziente Transfektionsmethode, bei der die DNA mit Hilfe spezieller Lösungen direkt vom Zytoplasma der Zelle in den Zellkern gelangt. Dieses Verfahren wird vornehmlich bei schwer zu transfizierenden Zellen verwendet, da sowohl die elektrischen Parameter, als auch die Nukleofektionslösung für die jeweilige Zelllinie optimiert sind. Die A431-Zellen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem Nukleofektor-Kit T und der zugehörigen Nukleofektor-einheit elektroporiert. Mittels der Nukleofektion wurde für die A431-Zellen je nach DNA-Konstrukt eine Transfektionsrate von 5-10 % erzielt.

3.3.8 Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der endogenen Verteilung spezifischer Proteine in Zellen und zur Analyse der ektopischen Expression von Genprodukten wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen (Ø 12 mm) bis zu einer Konfluenz von max. 70 % kultiviert und gegebenenfalls mit Serum, EGF oder Ionophor stimuliert (3.3.6). Die Immunfluoreszenz wurde nach Abschluss der Zellkultur bei Raumtemperatur prozessiert. Vor der Antikörperfärbung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Für die Fixierung wurden die Zellen zunächst mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend 15 min mit einer Fixierlösung inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und es folgte zur Reduktion der freien Aldehydgruppen des Formaldehyds eine 7minütige Inkubation mit 50 mM NH₄Cl. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und 2 min mit einer Triton-X-100-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und vorbereitend für die folgende Antikörperfärbung unspezifische Bindungsstellen durch eine 30minütige Inkubation mit Blockierlösung abgedeckt. Im Anschluss erfolgte die 30minütige Inkubation mit dem Primärantikörper. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 1 h mit dem Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach der Antikörperfärbung wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und in Mowiol[®] eingebettet. Nach Trocknung des Mowiole[®] konnten die Zellen zur Mikroskopie verwendet werden. Die Präparate wurden zur Aufbewahrung bei 4 °C gelagert.

Fixierlösung :	3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS ⁺⁺
Triton-X-100-Lösung :	0,2 % (v/v) Triton-X-100 in PBS ⁺⁺

Blockierlösung:	2 % (w/v) BSA in PBS
Mowiol® 4-88-Lösung:	2,4 g Mowiol 4-88
	6 g Glycerol
	6 ml H ₂ O
	12 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,0

3.3.9 Transendothelialer Migrationstest (Transwellsystem)

3.3.9.1 Vorbereitung der Transwell-Filter

Für den transendothelialen Migrationstest wurden Transwell-Filter mit 8 µm Porendurchmesser verwendet. Diese wurden zunächst 30 min mit 5 µg/cm² Fibronectin beschichtet bevor pro Transwell-Einsatz $2,2 \times 10^5$ HMEC-1 Endothelzellen in 200 µl Medium (MCDB ohne EGF und Hydrocortison) ausgesät wurden. Nach zweitägiger Kultivierung im Brutschrank konnten die Transwell-Filter für den Migrationstest verwendet werden.

3.3.9.2 Durchführung des transendothelialen Migrationstests

Zunächst wurde in die untere Kammer der Transwells jeweils 600 µl des für die HTB58-Kultivierung benötigten Mediums vorgelegt, bevor die zuvor mit PBS⁺⁺ gewaschenen Transwell-Filter vorsichtig überführt wurden. Anschließend wurden pro Transwell-Einsatz 5×10^5 Zellen (in 100 µl Medium) der stabilen HTB58-Zelllinien in die obere Kammer gegeben und diese 16 h bei 37 °C und 7 % CO₂ zur Transmigration inkubiert. Für die Messung am FACS (3.3.9.4) wurden die transmigrierten Zellen 30 min auf Eis gestellt, vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst, und in PBS aufgenommen.

3.3.9.3 Kontrollfärbung der Endothel-Monolayer

Zur Überprüfung des Endothel-Monolayers wurden die Zellen mit dem Diff-Quick-Färbeset angefärbt. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, bevor sie nach Herstellerangaben gefärbt wurden. Die Filter wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

3.3.9.4 Messung der Transmigrationsrate mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Für die spezifische Zählung der die GFP-fusionierten Konstrukte exprimierenden und transmigrierten Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die FACS-Analyse verwendet.

Die Messungen wurden mittels eines Durchflußzytometers durchgeführt, welches die gleichzeitige Messung dreier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe sowie morphologischer Parameter wie Zellgröße, Granularität und Oberflächenbeschaffenheit erlaubt.

In einem Punktediagramm wurde die Verteilung der Zellen unter der Betrachtung der Größe und Granularität dargestellt. In einem weiteren Diagramm wurde die Anzahl an Zellen gegen die Fluoreszenz aufgetragen. Für die transendothelialen Migrationstests wurde die Gesamtzellzahl gemessen, die benötigt wird um 1000 GFP-exprimierende Zellen zu erhalten. Aus dem Verhältnis gemessener Zellen zu GFP-exprimierenden Zellen wurde zunächst die Expressionsrate der GFP-fusionierten Konstrukte in den Zellen bestimmt, die im Folgenden zur Berechnung der Transmigrationsrate herangezogen wurde (siehe Abbildung 12). Die Berechnung der Transmigrationsrate erfolgte über den Vergleich der GFP-Expressionsrate der transmigrierten Zellen und der Zellen vor der Migration. Für jeden experimentellen Ansatz wurden drei Transwelleinsätze gemessen aus denen die Mittelwerte gebildet wurden.

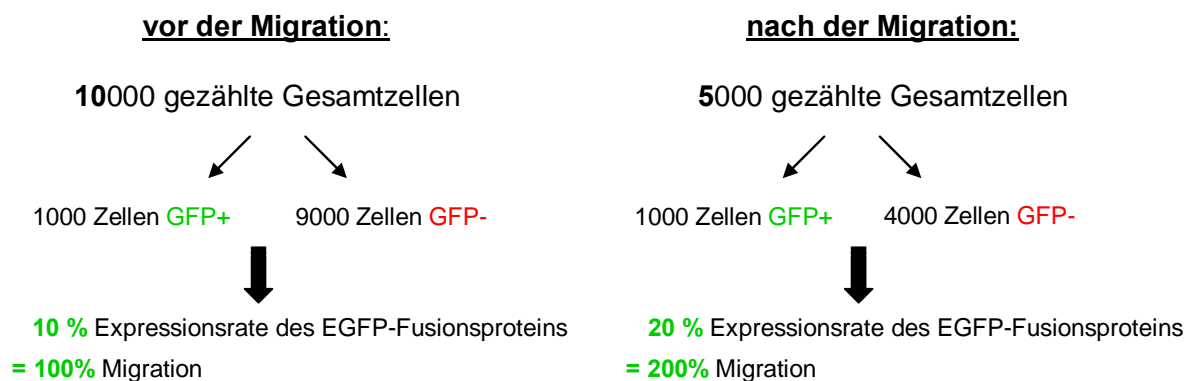


Abbildung 12: Schema zur Auswertung der transendothelialen Migration

3.3.10 Herstellung von Zelllysaten

3.3.10.1 Zellyse mittels heißem 4fach SDS-Probenpuffer

Die Zellen einer konfluenten 58 cm² Schale wurden mit PBS⁺⁺ gewaschen, und zu diesen 500 µl 95 °C heißer 4fach SDS-Probenpuffer gegeben. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und zum Scheren von DNA wurde das Zelllysate mehrmals mit einer 23 g-Kanüle aufgezogen. Das Zelllysate wurde 5 min bei 95 °C erhitzt, bevor es zur SDS-PAGE (3.4.3) verwendet wurde.

4fach SDS-Probenpuffer: 12,5 ml 1M Tris pH6,8
10 ml β-Mercaptoethanol
20 ml Glycerin
3 g SDS
10 mg Bromphenolblau
ad 50 ml *Aqua. bidest.*

3.3.10.2 Erzeugung von Zelllysaten mit Lysispuffer

Die Zellen wurden zunächst mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend durch 30minütige Inkubation mit Lysispuffer (1 ml pro 58 cm²-Schale) lysiert. Um den Proteinabbau möglichst gering zu halten, wurden dem Lysispuffer Proteaseinhibitoren (Protease-Inhibitor-Cocktail) beigefügt und die Inkubation im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation mit dem Lysispuffer wurden die Zellen mit einem Schaber abgelöst und das Zelllysate mehrmals durch eine 23 g-Kanüle aufgezogen. Zur Klärung der Lysate wurden diese abschließend 20 min bei 4 °C und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der resultierende Überstand konnte zur Proteinbestimmung (3.4.1) oder für die SDS-PAGE (3.4.3) verwendet werden.

Lysispuffer: 50 mM HEPES pH 7,4
150 mM NaCl
1 % (v/v) Triton X-100
1 mM EDTA
1,5 mM PMSF
Protease-Inhibitor-Cocktail

3.3.11 Anreicherung von endogenem S100P aus Zelllysaten

Das in Zellen nur schwach exprimierte endogene S100P Protein wurde für Expressionsstudien und Western Blot Analysen (3.4.4) über Hydrophobe-Wechselwirkungs-Chromatographie (HIC) an Phenylsepharose angereichert. Hierzu wurden aus 4 konfluenten 58 cm² Schalen Zelllysate (3.3.10.2) hergestellt und auf 5 mM CaCl₂ eingestellt. Durch eine anschließende 20minütige 100000 g Zentrifugation wurden zunächst präzipitierte Proteine entfernt, bevor im Anschluss die Lysate mehrmals über eine Phenyl-Sepharose Säule (250 µl Bettvolumen, äquilibriert in Waschpuffer A) gegeben wurden. Die Säulen wurden mit 5 ml Waschpuffer A gewaschen und die Matrix mit 250 µl SDS-Probenpuffer erhitzt.

Waschpuffer A: 40 mM Hepes pH 7,4
 300 mM NaCl
 0,5 mM CaCl₂
 1,5 mM PMSF

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Die Proteinproben wurden in einem 500 µl Ansatz 1:250 verdünnt und mit 500 µl Coomassie[®] Plus Protein Assay Reagent versetzt. Nach einer 5 -15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardgerade aus BSA-Ansätzen mit Proteinkonzentrationen im Bereich von 1-10 µg/ml Protein erstellt.

3.4.2 TCA-Fällung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinen vor einer SDS-PAGE (3.4.3) wurden die zu fällenden Proben mit TCA in einer Endkonzentration von 15 % versetzt und mind. 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die gefällten Proteine 30 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm und 4 °C sedimentiert. Zur Neutralisierung der TCA wurde das resultierende Proteinpellet mit 2 % (v/v) Natriumacetat/Ethanol gewaschen und erneut sedimentiert. Abschließend wurde das Proteinpellet getrocknet und in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

3.4.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Entsprechend des Molekulargewichts der zu trennenden Proteine wurden SDS-Gele mit einer Acrylamidkonzentration (Acrylamid:Bisacrylamid 30:0,8) von 8-15 % (v/v) im Trenngel verwendet.

Die zur SDS-PAGE verwendeten Proben wurden mit 4fachem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Als Molekulargewichtsstandard diente der Prestained Protein Marker von NEB. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel bei 20 mA und im Trenngel bei 30 mA. Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Gele entweder mit einer Coomassie Färbelösung (3.4.3.1) behandelt, einer Silberfärbung (3.4.3.2) unterzogen oder zur Western-Blot-Analyse (3.4.4) verwendet.

Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8,8
 0,1 % (w/v) SDS
 192 mM Glycin

3.4.3.1 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue

Die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 ist eine geeignete Methode zur Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen und besitzt eine Nachweisgrenze von 0,3 – 1 µg Protein pro Bande. Für die Färbung wurde das Gel zunächst kurz in Entfärbelösung und hinterher 20 min mit der Färbelösung inkubiert. Nach erfolgter Färbung wurde das Gel für mindestens 1 h mit Entfärbelösung behandelt. Abschließend wurden die Gele mit *Aqua bidest.* gewaschen und getrocknet (3.4.3.3).

Coomassie-Färbelösung: 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
 40 % (v/v) Methanol
 20 % (v/v) Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung: 40 % (v/v) Methanol
 20 % (v/v) Essigsäure

3.4.3.2 Proteinfärbung mit Silber

Die Detektion von Proteinen in SDS-Gelen mittels Silberfärbung stellt mit einer Detektionsgrenze von 2-5 ng Protein pro Bande eine sehr sensitive Färbemethode für Proteine dar.

Für die Silberfärbung wurde das SDS-Gel zunächst für 30 min in Fixierlösung unter leichter Agitation bewegt und anschließend dreimal je 30 min mit 50 % (v/v) Ethanol (absolut, unvergällt) gewaschen. Nach der exakt 1minütigen Sensibilisierung des Gels in Inkubationslösung wurde es dreimal je 20 sec mit *Aqua bidest.* gewaschen. Es folgte die Imprägnierung des Gels mit der Silberlösung für 20 min. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit *Aqua bidest.* für jeweils 20 sec folgte die Entwicklung mit Entwicklerlösung bis die gewünschte Färbung des Gels erreicht wurde. Nach zweimaligem Waschen mit *Aqua bidest.* für jeweils 2 min wurde das Gel 10 min mit Fixierlösung fixiert und abschließend bis zur Trocknung in *Aqua bidest.* mit 2 % Glycerin verwahrt.

Fixierlösung:	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Inkubationslösung:	75 µl 344 mM Thiosulfat ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>
Silberlösung:	0,1 g AgNO ₃ ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>
Entwicklerlösung:	3 g Na ₂ CO ₃ 25 µl Formaldehyd 2,5 µl Thiosulfat-Stammlösung ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>

3.4.3.3 Trocknung von Polyacrylamidgelen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die „Coomassie-Blue“ oder „Silber“ gefärbten Acrylamidgele für 2 h bei 55 °C und unter Vakuum im Geltrockner (Hoefer Drygel Sr.) behandelt.

3.4.4 Westernblot

Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE können Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und immobilisiert werden, um sie anschließend mit spezifischen Antikörpern nachweisen zu können.

3.4.4.1 Transfer

Vor dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm), die Whatman-Papiere und das SDS-Gel in Borat-Puffer äquilibriert und anschließend in eine Tankblot-Apparatur, gefüllt mit Boratpuffer, eingesetzt. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte für 1 h unter Eiskühlung bei einer Stromstärke von 300 mA. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran aus der Apparatur entnommen und mit TBS-T gewaschen.

Blotpuffer:	50 mM Tris 50 mM Borsäure
TBS-T:	20 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20

3.4.4.2 Proteinfärbung

Zur Überprüfung des Proteintransfers diente zum einen ein gefärbter Marker, zum anderen konnten die Proteine reversibel mit Ponceau-S gefärbt werden. Dies erfolgte durch eine 5minütige Inkubation der Membran in Ponceau S-Lösung. Zur Entfärbung der Membran wurde diese mehrmals kurz mit *Aqua bidest.* gewaschen.

Ponceau S-Färbelösung:	2,5 g Ponceau-S 400 ml Methanol 150 ml Eisessig ad 1 l H ₂ O
-------------------------------	--

3.4.4.3 Immunodetektion von Proteinen auf Membranen

Die nach dem Westernblot auf der Membran immobilisierten Proteine können indirekt über die Bindung von Antikörpern nachgewiesen werden. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran blockiert. Hierzu wurde die Membran für 1 h mit Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1stündige Inkubation mit dem Primärantikörper der spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Vor der Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die Membran mehrmals mit TBS-T gewaschen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Diese Sekundärantikörper wurden ebenfalls mit der Membran 1 h in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit TBS-T wurde zur Sichtbarmachung der gebundenen Peroxidase ein Gemisch aus Chemilumineszenzsubstraten (ECL oder ECL⁺) auf die Membran gegeben. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert die Oxidation von Luminol, bei der eine Chemilumineszenz ausgelöst wird. Durch Exposition des Blots (1 min bis 1 h) auf einem Röntgenfilm konnten die Proteinbanden detektiert werden.

Blockierungspuffer: 20 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20
5 % (w/v) Magermilchpulver

3.4.4.4 Strippen von Membranen

Die Membranen wurden für 30 min bei 50 °C mit Strip-Puffer inkubiert, gründlich mit TBS-T gewaschen und mit Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend konnte sie zur erneuten Immunodetektion verwendet werden.

Strip-Puffer: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7
2 % (w/v) SDS
100 mM 2-Mercaptoethanol

3.4.5 Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen

3.4.5.1 Rekombinante Expression der Proteine in *E. coli*

Lösliche eukaryontische Proteine können durch spezielle, induzierbare Expressionssysteme ektopisch in *E. coli* exprimiert werden. Die Expression der Proteine erfolgte im Rahmen dieser Arbeit in dem *E. coli* BL21(DE3) pLysS Stamm.

Die transformierten *E. coli* Bakterien wurden zunächst in einer Hauptkultur (Kulturvolumen: 250 ml (N-ERMAD: 1 l); 1:50 mit Vorkultur inokuliert) unter Selektionsdruck bei 37° C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert, bevor im Anschluss die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert wurde. Die induzierten Kulturen wurden bei 37 °C und 250 rpm bei entsprechenden Temperaturen für mindestens 3 h inkubiert (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Kultivierungsbedingungen zur Expression der rekombinanten Proteine

Protein	IPTG-Konzentration	Dauer der IPTG-Induktion	Induktions-Temperatur	Lysispuffer
GST-Ezrin	1 mM	3 h	37 °C	25 ml Lysispuffer 1
His-Ezrin	1 mM	3 h	37 °C	25 ml Lysispuffer 2
GST-Ezrin 310aa	0,25 mM	3 h	25 °C	25 ml Lysispuffer 1
GST-Ezrin 233aa	0,25 mM	3 h	25 °C	25 ml Lysispuffer 1
GST-Ezrin 173aa	0,25 mM	3 h	25 °C	25 ml Lysispuffer 1
GST-Ezrin 197aa	0,25 mM	3 h	25 °C	25 ml Lysispuffer 1
GST-Ezrin 82aa	0,25 mM	3 h	25 °C	25 ml Lysispuffer 1
GST-N-ERMAD	1 mM	3 h	37 °C	25 ml Lysispuffer 1
His-N-ERMAD	1 mM	3 h	37 °C	25 ml Lysispuffer 2
N-ERMAD	0,1 mM	16 h	25 °C	25 ml Lysispuffer 3
His-S100P WT	1 mM	3 h	37 °C	12,5 ml Lysispuffer 2
S100P WT	1 mM	16 h	37 °C	12,5ml Lysispuffer 4
His-S100P F15A	1 mM	3 h	37 °C	12,5 ml Lysispuffer 2
His-S100P 91aa	1 mM	3 h	37 °C	12,5 ml Lysispuffer 2
His-S100P 87aa	1 mM	3 h	37 °C	12,5 ml Lysispuffer 2
His-S100P pa	1 mM	3 h	37 °C	12,5 ml Lysispuffer 2
S100P pa	1 mM	3 h	37 °C	12,5 ml Lysispuffer 1

Nach Beendigung der IPTG-Induktion wurden die Bakterien für 10 min auf Eis inkubiert und im Folgenden 10 min bei 4000 rpm (Hereaus Megafuge, Rotor JLA 16.25) sedimentiert. Das resultierende Bakterienpellet wurde in geeigneter Menge Lysispuffer (siehe Tabelle 1) aufgenommen und resuspendiert. Die Bakterien wurden zur Lyse dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Zusätzlich wurden sie 4 x 30 sec sonifiziert (Branson Sonifier 250, Richtzyklus 50, Abgabekontrolle 5). Im Falle des unfusionierten N-ERMAD Proteins wurden die Bakterien durch dreimaligen Hochdruckzellaufschluss mittels einer French-Press-Apparatur aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde das Lysat mit 0,4 mg ml⁻¹ Desoxycholinsäure versetzt. Zur Trennung der löslichen Proteine von Zelltrümmern wurden die aufgeschlossenen Zelllysate für 1 h bei 100000 g und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Proteinüberstand konnte zur Aufreinigung (3.4.5.2) eingesetzt werden.

Lysispuffer 1: 40 mM Hepes pH 7,2
 300 mM NaCl
 1,5 mM PMSF
 1 mM EDTA
 10 mM 2-Mercaptoethanol

Lysispuffer 2: 40 mM Hepes pH 7,2
 20 mM Imidazol
 300 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1,5 mM PMSF
 10 mM 2-Mercaptoethanol

Lysispuffer 3: 180 mM KH₂PO₄ pH 7,2
 1 mM PMSF
 Protease-Inhibitor-Cocktail

Lysispuffer 4: 40 mM Hepes pH 7,2
 20 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 Protease-Inhibitor-Cocktail

3.4.5.2 Reinigung rekombinant exprimierter Proteine

3.4.5.2.A Reinigung von His₆-Fusionsproteinen

Die Reinigung His₆-fusionierter Proteine erfolgte über Ni-NTA-Agarose (Affinitätschromatographie). Die Aufreinigung der His₆-S100P WT, His₆-S100P 91aa, His₆-S100P 87aa und His₆-S100P F15A Proteine erfolgte über zwei Stufen. In der ersten Stufe wurden die Proteine zunächst an einer Phenyl-Sepharose-Matrix (HIC-Chromatographie) angereichert. Hierzu wurde der Überstand der 100000 g Zentrifugation (3.4.5) auf 5 mM CaCl₂ eingestellt und auf eine in Lysispuffer 2 mit 0,5 mM CaCl₂ äquilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule (Bettvolumen 4 ml) gegeben. Nach einem Waschschrift mit 20 ml Waschpuffer P wurden die Proteine mit 10 ml Elutionspuffer P eluiert und über Nacht gegen Dialysepuffer N dialysiert. Die dialysierten Proteine wurden im Anschluss über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Hierzu wurden die Dialysate auf eine mit Dialysepuffer N äquilibrierte Ni-NTA-Matrix (Bettvolumen von 2,5 ml) überführt und für 2 h im „Batch“-Verfahren an die Matrix gebunden. Die Matrices wurden anschließend zunächst mit 40 ml Dialysepuffer N gewaschen, bevor die gebundenen Proteine mit 10 ml Elutionspuffer N in 1 ml Elutionsfraktionen eluiert wurden.

Die Reinigung sämtlicher anderer His₆-fusionierter Proteine erfolgte direkt über Ni-NTA-Agarose. Der 100000 g Proteinüberstand (4.8.1) der aufgeschlossenen Bakterienzellen wurde auf eine in Lysispuffer 2 (3.4.5) äquilibrierte Ni-NTA-Matrix (Bettvolumen 2,5 ml) gegeben und 2 h lang im „Batch“-Verfahren inkubiert. Anschließend wurde die Matrix zunächst mit 140 ml Waschpuffer N I und folgend mit 30 ml Waschpuffer N II gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde die Matrix mit 10 ml 250 mM Imidazol inkubiert und das Eluat in 1 ml-Fractionen gesammelt.

Waschpuffer P:	40 mM Hepes pH 7,2	Elutionspuffer P:	40 mM Hepes pH 7,2
	20 mM Imidazol		20 mM Imidazol
	300 mM NaCl		300 mM NaCl
	1 mM EDTA		1 mM EDTA
	1,5 mM PMSF		1 mM EGTA
	10 mM 2-Mercaptoethanol		1,5 mM PMSF
	0,5 mM CaCl ₂		10 mM 2-Mercaptoethanol

Dialysepuffer N	20 mM Imidazol pH7,4	Waschpuffer N II:	40 mM Hepes pH 7,2
	150 mM NaCl		35 mM Imidazol
	1,5 mM PMSF		150 mM NaCl
	10 mM 2-Mercaptoethanol		1 mM MgCl ₂
Waschpuffer N I:	40 mM Hepes pH 7,2		10 mM 2-Mercaptoethanol
	25 mM Imidazol	Elutionspuffer N:	250 mM Imidazol pH7,4
	150 mM NaCl		150 mM NaCl
	1 mM MgCl ₂		1,5 mM PMSF
	10 mM 2-Mercaptoethanol		10 mM 2-Mercaptoethanol

3.4.5.2.B Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Reinigung GST-fusionierter Proteine erfolgte über eine Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose 4B. Der das GST-Protein enthaltende Überstand (3.4.5) der aufgeschlossenen Bakterien wurde auf eine mit Lysispuffer 1 (3.4.5) äquilibrierte Matrix (Bettvolumen 500 µl) gegeben und 30 min im „Batch“-Verfahren bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix in eine Säule überführt und mit 40 ml PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden abschließend mit 10 x 1 ml GST-Elutionspuffer eluiert.

GST-Elutionspuffer (pH 8,0): 100 mM Glutathion
50 mM Tris/HCl pH 8,0

3.4.5.2.C Reinigung von unfusionierten Proteinen

Das unfusionierte N-ERMAD Protein wurde nach Smith *et al.* 2002 über eine Hydroxyapatit-Säule aufgereinigt. Bei dieser Hydroxyapatit-Chromatographie werden Proteine von der kristallinen Hydroxyapatit-Matrix adsorbiert. Hierzu wurde zunächst der N-ERMAD-Proteinüberstand (3.4.5) im „Batch“-Verfahren 30 min lang mit Hydroxyapatit (10 ml, äquilibriert in 180 mM KH₂PO₄) inkubiert und in eine Säule überführt. Diese wurde im Anschluss mit 100 ml 180 mM KH₂PO₄ gewaschen und das gebundene Protein mit 10 ml 800 mM KH₂PO₄ eluiert. Die weitere Reinigung des Proteins über FPLC erfolgt durch die Arbeitsgruppe von G. Fritz, Konstanz.

Die Reinigung des unfusionierten S100P WT Proteins erfolgte über zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte. Im ersten Schritt wurde das S100P WT Protein über eine Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Hierzu wurde der Proteinüberstand (3.4.5) zunächst gegen Dialysepuffer I dialysiert und anschließend mit 10 ml einer in Dialysepuffer I

äquilierten DEAE-Sephacel-Matrix inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurde die Matrix zuerst mit 100 ml Dialysepuffer I und anschließend mit 100 ml Waschpuffer I gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 10 ml Elutionspuffer I eluiert. Im zweiten Schritt wurde das S100P WT Protein über eine Phenyl-Sepharose-Matrix (HIC-Chromatographie) gereinigt. Hierzu wurde die Lösung mit dem S100P WT Protein nach der Dialyse gegen Dialysepuffer II auf eine CaCl_2 -Konzentration von 5 mM eingestellt und auf eine Phenyl-Sepharose 4B-Säule (Bettvolumen 2,5 ml, äquiliert in Dialysepuffer II) gegeben. Nach einem Waschschrift mit 30 ml Dialysepuffer II wurde das gebundene Protein mit 10 ml Elutionspuffer II in 1 ml Fraktionen eluiert.

Das unfusionierte S100P pa Protein wurde über eine Anionenaustausch-Chromatographie mittels DEAE-Sephacel aufgereinigt. Zunächst wurde der Proteinüberstand (3.4.5) über Nacht bei 4 °C gegen Dialysepuffer III dialysiert und hinterher über 2 h mit der DEAE-Sephacel Matrix (Bettvolumen 2 ml, äquiliert in Dialysepuffer III) inkubiert. Anschließend wurde die Matrix mit 80 ml Dialysepuffer III gewaschen und die gebundenen Proteine durch eine 30minütige Inkubation mit 10 ml Elutionspuffer III eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml-Fraktionen gesammelt, die weitere Reinigung erfolgte in der Arbeitsgruppe von G. Fritz, Konstanz.

Dialysepuffer I:	20 mM Imidazol pH 7,5 20 mM NaCl 1 mM EGTA 1 mM DTT	Elutionspuffer II:	40 mM Hepes pH 7,2 300 mM NaCl 2 mM CaCl_2 1 mM DTT
Waschpuffer I:	20 mM Imidazol pH 7,5 30 mM NaCl 1 mM EGTA 1 mM DTT	Dialysepuffer II:	40 mM Hepes pH 7,2 80 mM NaCl 2 mM CaCl_2 1 mM DTT
Elutionspuffer I:	20 mM Imidazol pH 7,5 200 mM NaCl 1 mM EGTA 1 mM DTT	Elutionspuffer III:	10 mM Hepes pH 7,4 500 mM NaCl 10 mM 2-Mercaptoethanol 1 mM PMSF

Dialysepuffer III: 10 mM Hepes pH 7,4
 20 mM NaCl
 10 mM 2-Mercaptoethanol
 1 mM PMSF

3.4.6 Abspaltung des His₆- oder GST-Tag durch Thrombinverdau

Der pET28a (+) sowie der pEGX-4T-1 Vektor codieren für Thrombin-Spaltungsstellen, die eine Abspaltung des jeweiligen *Tags* ermöglichen (siehe Abbildung 13).

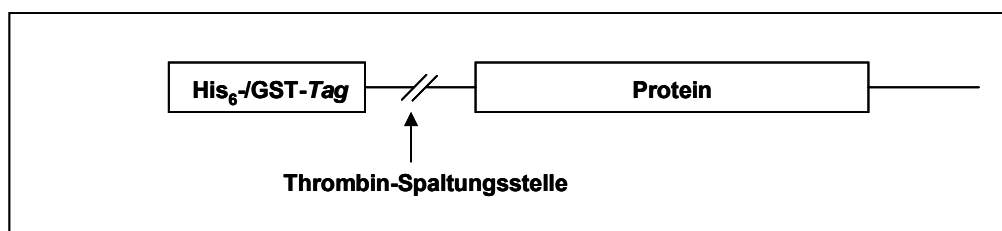


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Thrombin-Spaltungsstelle.

Zur Abspaltung des *Tags* wurden die Proteine zunächst über Nacht bei 4 °C gegen Dialysepuffer T dialysiert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration in jedem Ansatz mit Dialysepuffer T auf 3 µg/µl eingestellt und die Proteine bei 37 °C im Wasserbad mit Thrombin (0,6 U/mg Protein) inkubiert. Die Inkubation wurde nach 3 h durch die Zugabe von 1,5 mM PMSF gestoppt. Um Proteine mit nicht abgespaltetem *Tag* zu entfernen wurde jeweils 1 mg der Proteine über Nacht mit Ni-NTA Agarose (500 µl Bettvolumen, äquilibriert mit Dialysepuffer T) bzw. Glutathion-Sepharose 4B (100 µl Bettvolumen, äquilibriert mit Dialysepuffer T) inkubiert. Der resultierende Proteinüberstand konnte anschließend für *in vitro* Bindungsstudien verwendet werden.

Dialysepuffer T: 40 mM Hepes pH 7,4
 300 mM NaCl
 10 mM 2-Mercaptoethanol
 1 mM MgCl₂

3.4.7 *In vitro*-Bindungsstudien

3.4.7.1 Charakterisierung der S100P-Ezrin Bindungsstellen

Für die Charakterisierung der S100P-Ezrin Bindungsstellen wurden Affinitätschromatographien mit verschiedenen C-terminal verkürzten S100P und Ezrin Proteinen durchgeführt. Für diese wurden Affinitätssäulen mit jeweils einem immobilisierten Bindungspartner verwendet. Im Falle der GST-Fusionsproteine (GST-Ezrin, GST-Ezrin 233aa, GST-Ezrin 197aa, GST-Ezrin 173aa und GST-Ezrin 82aa), wurden direkt die die Ezrin-Derivate enthaltenden Glutathion-Sepharose 4B Matrices nach dem letzten Waschschrift der Aufreinigung (3.4.5.2) verwendet. Hierzu wurde zunächst die Menge an gebundenem Protein in einer SDS-PAGE (3.4.3) abgeschätzt um anschließend jeweils äquivalente Proteinmengen für die *in vitro* Bindungsstudien einsetzen zu können. Für die Affinitätssäulen mit immobilisierten His₆-Fusionsproteinen (His₆-N-ERMAD, His₆-S100PWT, His₆-S100P F15A, His₆-S100P 91aa, His₆-S100P 87aa) wurden jeweils 500 µg der Proteine gegen Dialysepuffer B dialysiert und im „Batch“-Verfahren an eine Ni-NTA-Agarose Matrix (250 µl Bettvolumen, äquilibriert mit Dialysepuffer B) gebunden. Die Matrices wurden in 5 ml Polypropylen-Säulen überführt und ungebundene Proteine wurden durch mehrmaliges Waschen mit PBS (Glutathion-Sepharose 4B Matrices) oder Dialysepuffer B (Ni-NTA-Agarose Matrices) entfernt. Anschließend wurden die entsprechenden Bindungspartner (thrombin-gespaltene S100P WT, S100P F15A, His₆-fusioniertes S100P WT, S100P F15A, S100P 91aa, S100 P87aa oder GST-Ezrin 233aa, -197aa, -173aa, -82aa und N-ERMAD) auf 0,5 mM CaCl₂ oder 1 mM EGTA eingestellt, 20 min bei 15300 rpm (Laborzentrifuge Sigma) zentrifugiert und jeweils 500 µg der resultierenden Proteinüberstände mehrfach über die vorbereiteten Affinitätssäulen passiert. Durch mehrmaliges Waschen mit 1 mM EGTA bzw. 0,5 mM CaCl₂ enthaltendem Dialysepuffer B wurden die überschüssigen bzw. nicht gebundenen Proteine entfernt, bevor die Ca²⁺-abhängig gebundenen Bindungspartner mit 1,5 ml 2 mM EGTA enthaltendem Dialysepuffer B (siehe Abbildung 14) eluiert und in 300 µl Fraktionen gesammelt wurden. Abschließend wurden die an den Matrices immobilisierten Proteine entweder mit 250 mM Imidazol oder mit GST-Elutionspuffer (3.4.5.2) eluiert. Die Bindung der mobilen Proteine an die jeweilige Matrix wurde mittels SDS-PAGE (3.4.3) analysiert.

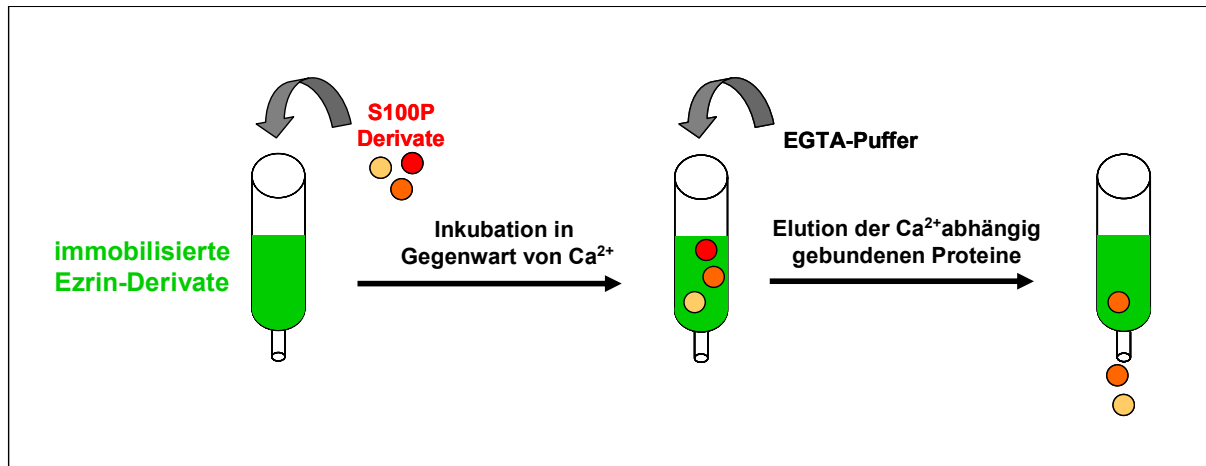


Abbildung 14: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Kartierung des S100P-Ezrin Interaktionsmotivs

Dialysepuffer B:	30 mM Hepes pH 7,4
	25 mM Imidazol pH 7,2
	150 mM NaCl
	10 mM 2-Mercaptoethanol
	1 mM MgCl ₂
	1,5 mM PMSF

3.4.7.2 Charakterisierung der Ca²⁺-Abhängigkeit der S100P pa-Ezrin

Interaktion

Für die Analyse der Ca²⁺-Abhängigkeit der S100P pa-Ezrin Interaktion wurden ebenfalls *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Für die Affinitätssäulen mit immobilisiertem GST-N-ERMAD wurden die Glutathion-Sepharose 4B Matrices nach dem letzten Waschschrift der Aufreinigung (3.4.5.2.) verwendet.

Parallel wurden jeweils 300 µg His₆-S100P pa oder His₆-S100P WT Protein (Negativkontrolle) auf 0,5 mM CaCl₂ oder 1 mM EGTA eingestellt und 20 min bei 15300 rpm (Laborzentrifuge Sigma) zentrifugiert. Anschließend wurden die resultierenden Proteinüberstände mehrfach über die vorbereiteten Affinitätssäulen gegeben und die Säulen mit 5 ml 1 mM EGTA bzw. 0,5 mM CaCl₂ enthaltendem Dialysepuffer B gewaschen. Die Ca²⁺-abhängig gebundenen Bindungspartner wurden im Anschluss mit 1,5 ml 2 mM EGTA enthaltendem Dialysepuffer B eluiert und in 300 µl Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden TCA gefällt (3.4.2) und mittels SDS-PAGE (3.4.3) analysiert.

3.4.8 Charakterisierung der hydrophoben Eigenschaften des S100P pa Proteins

Die Hydrophobizität des S100P pa Proteins wurde über die Bindungseigenschaften des Proteins an eine Phenyl-Sepharose-Matrix (HIC-Chromatographie) untersucht. Für diesen chromatographischen Ansatz wurden das S100P pa und das S100P WT Protein (Kontrolle) über Nacht gegen Dialysepuffer H dialysiert. Zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen des S100P WT Proteins mit der Phenyl-Sepharose-Matrix wurde das Protein vorab mit der Matrix (50 µl Bettvolumen, äquilibriert mit 5 mM EGTA enthaltendem Dialysepuffer H) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand und das S100P pa Protein wurden auf 5 mM CaCl₂ oder 5 mM EGTA eingestellt und möglicherweise präzipitierte Proteine über eine 30minütige Zentrifugation bei 100000 g entfernt. Jeweils 100 µg der Proteine wurden dann an die Phenyl-Sepharose-Matrix (50 µl Bettvolumen, äquilibriert mit 5 mM CaCl₂/EGTA enthaltendem Dialysepuffer H) gebunden. Die Matrices wurden mit 3,5 ml Dialysepuffer H gewaschen und abschließend wurden sowohl diese als auch die Überstände mit SDS Probenpuffer erhitzt und in einer SDS-PAGE (3.4.3) analysiert.

Dialysepuffer H (pH 7,4): 10 mM Hepes pH 7,4
 150 mM NaCl
 10 mM 2-Mercaptoethanol

3.4.9 Chemisches Vernetzen von S100P Proteinen

Das chemische Vernetzen mit dem homobifunktionalen „*crosslinker*“ BS3 (Sulfo-DSS) wurde für eine vergleichende Analyse der Dimerisierung von S100P WT und der C-terminal verkürzten S100P 91aa und S100P 87aa Derivate verwendet.

Hierzu wurden jeweils 4 µg der zuvor gegen Puffer C dialysierten Proteine in Puffer C mit 0,5 mM CaCl₂ bzw. 1 mM EGTA präinkubiert. Anschließend wurde der „*crosslinker*“ BS3 in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben und die Ansätze 45 min bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 2 % SDS (w/v) und 2 % 2-Mercaptoethanol abgestoppt und die Ansätze in einer SDS-PAGE (3.4.3) analysiert.

Puffer C (pH 7,2): 0,2 M Hepes pH 7,2
 10 mM 2-Mercaptoethanol

3.4.10 Liposomen-Co-Sedimentation

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der N-ERMAD Domäne an PtdIns(4,5)P₂ in Gegenwart verschiedener S100P Derivate wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Liposomen-Co-Sedimentation durchgeführt.

Für die Liposomen-Co-Sedimentation wurden zunächst unilamellare POPC-Vesikel mit einem PtdIns(4,5)P₂-Gehalt von 3 % hergestellt. Hierzu wurden pro Ansatz 100 µg der POPC-Stammlösung ([25 mg/ml], in Chloroform gelöst) sowie 3 µg der PtdIns(4,5)P₂-Stammlösung ([1 mg/ml], in Chloroform gelöst) mit 60 µl Chloroform auf Eis gemischt und anschließend unter einer Stickstoffhülle getrocknet. Nach Zugabe von 150 µl Puffer L wurde die Lipidsuspension zunächst 30 min auf Eis quellen gelassen, bevor durch drei Zyklen von jeweils 30 sec vortexen und 5 min Ruhen multilamellare Vesikel erzeugt wurden. Diese wurden im Anschluss zur Bildung unilamellarer Vesikel unter Eiskühlung dreimal 30 sec sonifiziert (Branson Sonifier 250; Richtzyklus 50; Abgabekontrolle 6).

Parallel dazu wurden in verschiedenen Ansätzen jeweils 20 µg N-ERMAD Protein mit 20 µg der jeweiligen S100P Derivate (S100P WT, S100P F15A, S100P 87aa) in Puffer L gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden diese Proteine mit 150 µl der unilamellaren Vesikel versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor sie durch Zentrifugation (20 min, 100000 g, 4 °C) sedimentiert wurden. Die Sedimente wurden in 200 µl Puffer L aufgenommen und erneut sedimentiert (20 min, 100000 g, 4 °C). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die jeweiligen Überstände wurden TCA gefällt (3.4.2), die resultierenden Pellets in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt.

Puffer L: 20 mM Tris pH 7,4
50 mM KCl,
50 µM CaCl₂
1 mM DTT
1 mM NaN₃

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen S100P und Ezrin untersucht. Neben der Kartierung des Interaktionsmotivs stand vor allem die Analyse der S100P-vermittelten Aktivierung des Ezrins im Vordergrund. Hierbei wurde zum einen der Zusammenhang zwischen der Aktivierung über Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) und der Bindung von S100P, zum anderen die Bedeutsamkeit von Ca²⁺ für die Interaktion untersucht. Sowohl S100 Proteine als auch Ezrin sind in einer Vielzahl von migratorischen Prozessen involviert, weshalb zudem die Bedeutung der S100P-Ezrin Interaktion für die Tumorzellmigration analysiert wurde.

4.1 Kartierung des S100P-Ezrin Interaktionsmotivs

Ezrin ist ein Mitglied der ERM- (Ezrin-Radixin-Moesin-) Proteinfamilie und ist an der Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett beteiligt. Es besitzt eine N-terminale Membranbindungsdomäne (N-ERMAD Domäne), die unter anderem mit PtdIns(4,5)P₂ interagieren kann, sowie eine C-terminale Domäne (C-ERMAD Domäne) die eine F-Aktin Bindungsstelle aufweist (Bretscher *et al.*, 2002). Ein weiterer Bindungspartner des Ezrins ist das Ca²⁺-bindende S100 Protein S100P, dessen Bindungsstelle in der N-terminalen Domäne lokalisiert ist (Koltzsch *et al.*, 2003). Die genaue Interaktionsstelle zwischen S100P und Ezrin ist allerdings bisher nicht kartiert worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die S100P-Bindungsstelle in der N-ERMAD Domäne eingegrenzt und die Ezrin-Bindungsstelle im S100P Molekül identifiziert werden. Für viele S100 Proteine wurde bereits gezeigt, dass für die Bindung von Effektorproteinen die Anordnung verschiedener hydrophober Reste im C-Terminus eine wichtige Rolle spielt (Osterloh *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurden N-ERMAD und S100P Deletionsmutanten zur Eingrenzung des jeweiligen Bindungsmotivs erzeugt und charakterisiert.

4.1.1 Generierung und Reinigung rekombinanter Ezrin und S100P Proteine

Die Charakterisierung des S100P-Ezrin Interaktionsmotivs erfolgte über *in vitro* Bindungsstudien. Hierzu wurden verschiedene C-terminal verkürzte S100P sowie Ezrin Proteine rekombinant exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt.

4.1.1.1 Rekombinante Expression C-terminal verkürzter Ezrin Proteine

Für die strikere Determinierung der S100P-Bindungsstelle innerhalb der N-ERMAD Domäne des Ezrins wurden C-terminal verkürzte Ezrin-Konstrukte (siehe Abbildung 15) erzeugt und rekombinant als GST- oder His₆-Fusionsproteine exprimiert. Hierbei dienten die zur Identifizierung des PtdIns(4,5)P₂-Bindungsmotivs verwendeten Ezrin-Derivate als Orientierungshilfe, da für diese Derivate eine erfolgreiche Expression und Reinigung beschrieben wurde (Barret *et al.*, 2000).

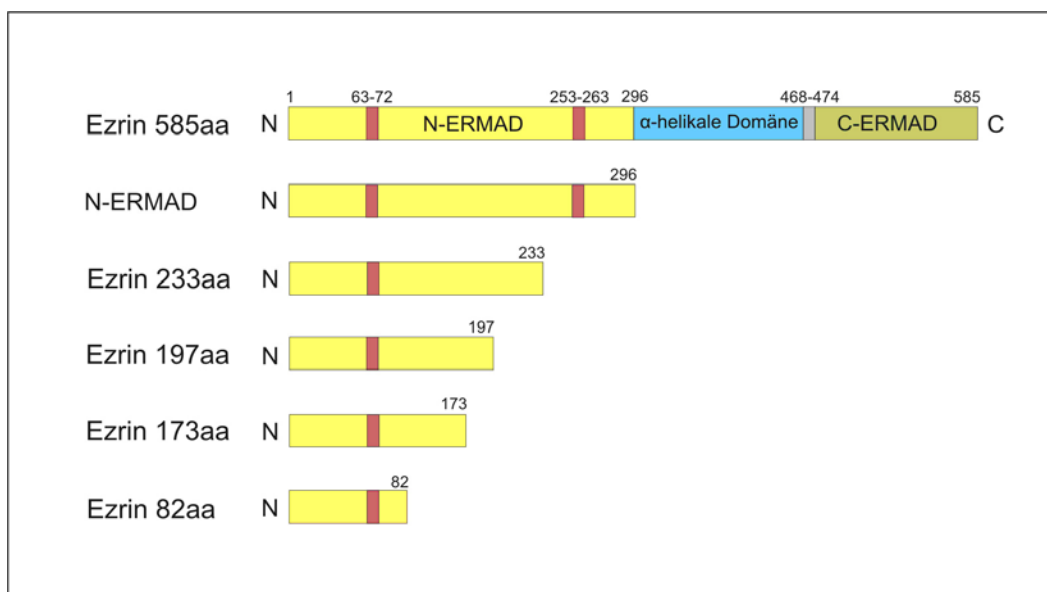


Abbildung 15: Schematische Darstellung der C-terminal verkürzten Ezrin Derivate.

Die einzelnen Domänen des Ezrin Moleküls sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet und die als PtdIns(4,5)P₂- Bindungsstelle identifizierte Aminosäurereste sind in rot dargestellt. Das Ezrin WT Protein besteht aus 585, die N-ERMAD Domäne aus 296 und das kürzeste der C-terminal verkürzten Ezrin Proteine aus den ersten 82 N-terminalen Aminosäuren. Die Ezrin Derivate wurden als N-terminal fusionierte GST- oder His₆-Fusionsproteine exprimiert.

Für die rekombinante Proteinexpression der C-terminal verkürzten Ezrin Fusionsproteine wurden *E. coli* BL21(DE3) pLysS Kulturen verwendet und die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe induziert (3.4.5.1). Nach dem Zellaufschluss wurden die Bakterienlysate durch Zentrifugation geklärt und die Ezrin-Derivate affinitätschromatographisch gereinigt. Hierzu wurde im Falle der GST-fusionierten Ezrin Proteine eine Glutathion-Sepharose 4B Matrix

und für His₆-fusioniertes N-ERMAD Protein eine Ni-NTA Matrix verwendet. Von allen Fraktionen der Expression und der Aufreinigung wurden Proben entnommen und in einer SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 16).

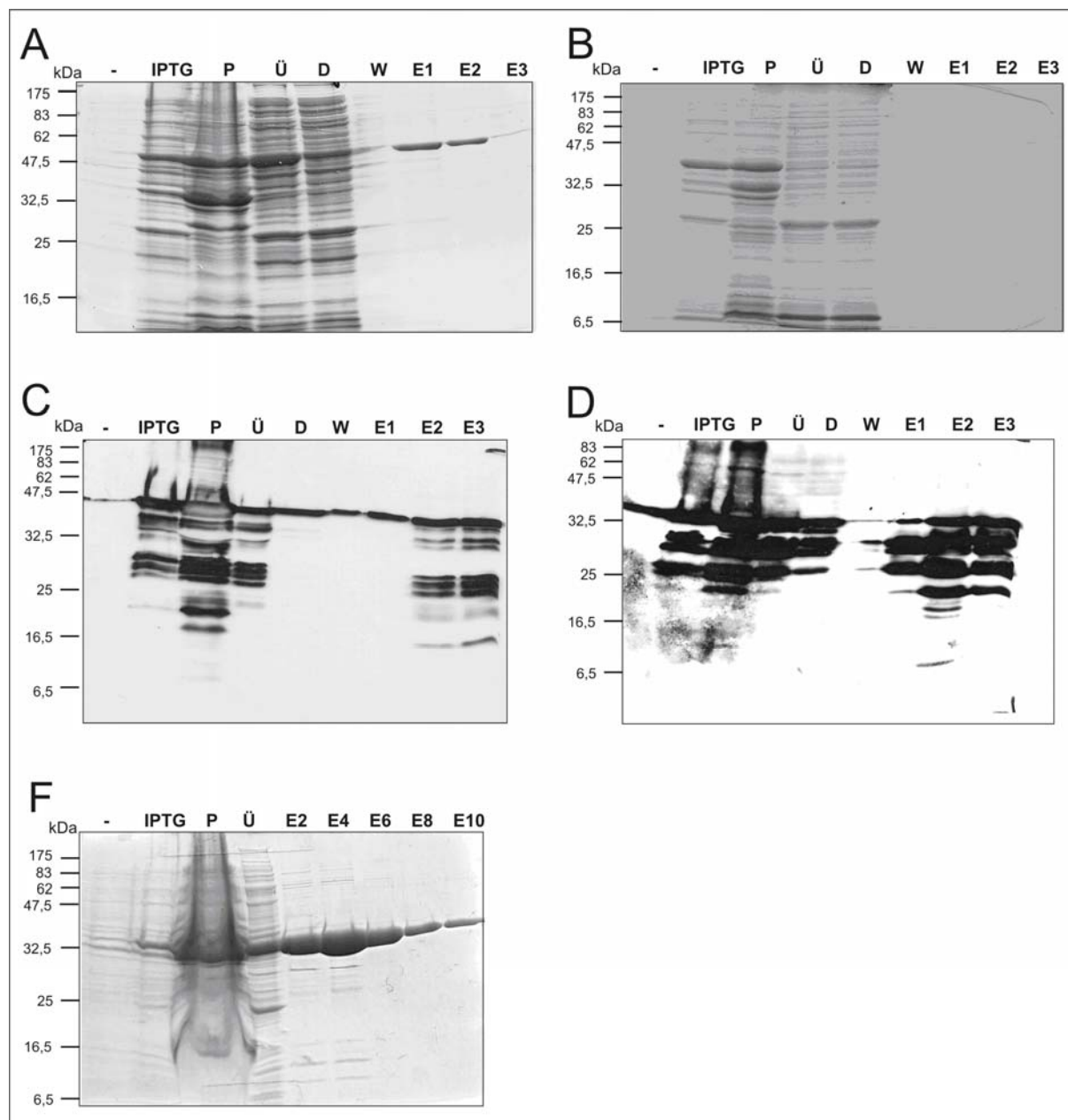


Abbildung 16: Rekombinante Expression und Reinigung verschiedener Ezrin-Fusionsproteine

Zur Untersuchung der Expression und Anreicherung der verschiedenen Ezrin-Fusionsproteine wurden jeweils 20 µl der entsprechenden Proben des Reinigungsprotokolls (3.4.5.1 und 3.4.5.2) sowie eine Matrix-Probe auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mittels einer Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung (A, B, F) oder im Westernblot mittels eines GST-Antikörpers (C, D) detektiert.

A: GST-Ezrin 233aa, **B:** GST-Ezrin 173aa, **C:** GST-Ezrin 197aa, **D:** GST-Ezrin 82aa, **F:** His₆-N-ERMAD
 -: vor der IPTG Induktion, **IPTG:** nach der IPTG Induktion; **P:** Pellet des ultrazentrifugierten Bakterienlysats, **Ü:** Überstand des ultrazentrifugierten Bakterienlysats, **D:** Durchfluss der Bindung an die Matrix, **W:** Waschfraktion der Protein-gebundenen Matrix, **E1-10:** Elutionsfraktionen

Das ca. 58 kDa große Ezrin 233aa GST-Fusionsprotein (Abbildung 16A) wird nach der Induktion mit IPTG größtenteils als lösliches Protein exprimiert (Ü) und konnte über eine Glutathion-Sepharose Säule gereinigt werden. Die Elutionsfraktionen (E) zeigen eine Proteinbande von ca. 58 kDa die dem Molekulargewicht des Ezrin 233aa Fusionsproteins entspricht. Zudem sind nur sehr geringfügige niedermolekulare Banden erkennbar, die auf einen Abbau des Fusionsproteins hinweisen. Auch das ca. 50 kDa große Ezrin 173aa GST-Fusionsprotein (Abbildung 16B) wird nach der Induktion mit IPTG exprimiert, allerdings befindet sich der größte Teil des Proteins nach der Zentrifugation in der nicht löslichen Proteinfraction (P). Die geringe Menge an löslichem Protein konnte über eine Glutathion-Sepharose Säule gereinigt werden. Die Elutionsfraktion E3 zeigt eine schwache Proteinbande die der Größe des Ezrin 173aa Fusionsproteins entspricht.

Die GST-Fusionsproteine Ezrin 197aa (ca. 53 kDa) und Ezrin 82aa (ca. 38 kDa) werden ebenfalls nach der Induktion mit IPTG exprimiert (Abbildung 16C und D) und ein wesentlicher Anteil der Proteine befindet sich in der löslichen Proteinfraction (Ü). Diese Fraktionen konnten in beiden Fällen erfolgreich über eine Glutathion-Sepharose Säule gereinigt werden. In den Elutionsfraktionen (E) werden neben den erwarteten Proteinbanden von 53 kDa und 38 kDa niedermolekulare Proteinbanden detektiert, die auf einen Abbau der Proteine hindeuten.

Allgemein zeigte sich, dass alle rekombinanten Proteine zumindest in geringem Umfang als lösliche Proteine exprimiert wurden und ein gewisses Maß an Proteinabbau aufwiesen. Daneben zeigte sich bei der Reinigung der Ezrin GST-Fusionsproteine, dass nach der Elution der Proteine mit einem Glutathion-Puffer ein erheblicher Teil der Proteinmenge an der Matrix gebunden blieb (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für die *in vitro* Bindungsstudien meist die Matrices nach der Reinigung mit den noch nicht eluierten Proteinen verwendet.

Auch die His₆-fusionierte N-ERMAD-Domäne des Ezrins (ca. 41 kDa) wird nach der Induktion mit IPTG zum größten Teil als lösliches Protein (Ü) exprimiert (siehe Abbildung 16 F). Dieses N-ERMAD Fusionsprotein wurde über eine Ni-NTA Säule gereinigt und konnte erfolgreich mit Imidazol-Puffer von der Matrix eluiert werden. In den Elutionsfraktionen (E) sind allerdings auch in diesem Fall geringfügige niedermolekulare Proteinbanden, d.h. wahrscheinlich Degradationsprodukte, erkennbar. Das gereinigte N-ERMAD Protein wurde im Folgenden zur Charakterisierung der Ezrin Bindungsstelle im S100P Molekül verwendet.

4.1.1.2 Rekombinante Expression C-terminal verkürzter S100P Proteine

Für viele S100 Proteine wurde bereits gezeigt, dass hydrophobe Reste im C-terminalen Bereich eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielen (Osterloh *et al.*, 1998). Außerdem zeigte der Sequenzvergleich zwischen S100P und anderen S100 Proteinen, dass die hydrophoben Aminosäuren 88 bis 91 stark konserviert sind und daher besonders bedeutsam für die Bindung von Ezrin sein könnten. Demzufolge wurden für die Identifizierung der Ezrin Bindungsstelle C-terminal verkürzte S100P-Konstrukte mit Deletionen dieser Aminosäuren generiert (siehe Abbildung 17) und als His₆-Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* exprimiert.

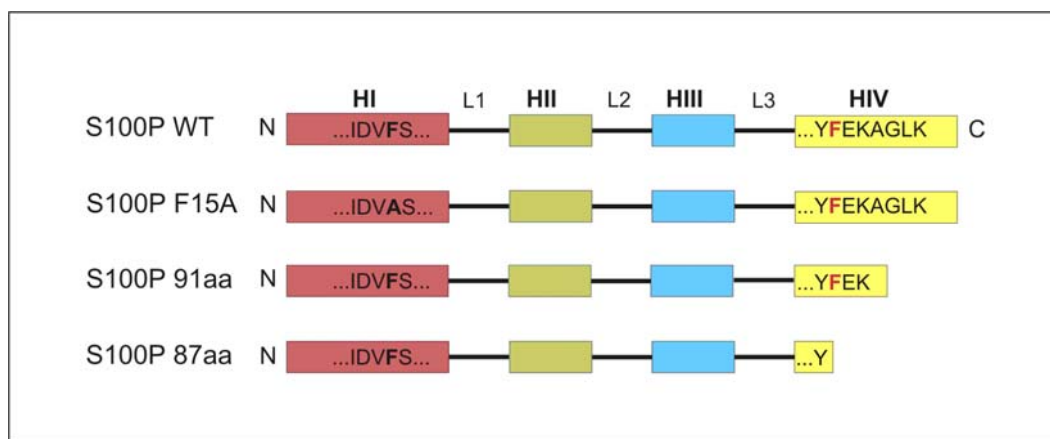


Abbildung 17: Schematische Darstellung der C-terminal verkürzten S100P Derivate

Die vier Helices des S100P-Moleküls sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Die für die Dimerisierung benötigte Aminosäure Phenylalanin 15 ist in dem F15A Protein gegen Alanin ausgetauscht worden. C-terminal sind die zur Interaktion notwendigen Aminosäuren abgebildet. Das S100P WT Protein besteht aus 95, das kürzeste S100P Derivat aus 87 Aminosäuren.

Die Expression der His₆-S100P Proteine in den transformierten *E. coli* BL21(DE3) pLysS Bakterien wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Die Reinigung des S100P WT und des S100P F15A (siehe Abbildung 18C und D) His₆-Fusionsproteins erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde das geklärte Bakterienlysat über HIC –Chromatographie (*Hydrophobic Interaction Chromatography*) an einer Phenyl-Sepharose Matrix gereinigt. Im Anschluss erfolgte die Reinigung über eine Ni-NTA Matrix (3.4.5.2.A). Im Gegensatz dazu wurden die C-terminal verkürzten S100P 91aa und S100P 87aa His₆-Fusionsproteine direkt über eine Ni-NTA Matrix gereinigt (siehe Abbildung 18A und 4B). Proben der Expression sowie aller Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden in einer SDS-PAGE (3.4.3) analysiert. Wie die SDS-PAGE Analyse zeigt, werden die ca. 10 kDa großen His₆-Fusionsproteine S100P WT und S100P F15A nach der IPTG-Induktion in hohem Maße als lösliches Protein (Ü) exprimiert und der größte Anteil an bakterieller Verunreinigung konnte bereits mit Hilfe

des ersten Reinigungsschritts, der Anreicherung an einer Phenyl-Sepharose, entfernt werden (EP). Nach der Dialyse und einer zweiten Reinigung über eine Ni-NTA Säule wurden die beiden rekombinanten Fusionsproteine mit einem Imidazol-Puffer von der Ni-NTA Matrix eluiert (E2-E12). Die Elutionsfraktionen weisen keine bakteriellen Verunreinigungen oder Proteinabbau auf und konnten für die folgenden *in vitro* Bindungsstudien eingesetzt werden. Die beiden ca. 10 kDa großen His₆-Fusionsproteine S100P 91aa (siehe Abbildung 18A) und S100P 87aa (siehe Abbildung 18B) werden nach Induktion mit IPTG ebenso in hohem Grade als lösliche Proteine exprimiert (Ü). Die Reinigung über eine Ni-NTA Säule entfernte sämtliche bakteriellen Verunreinigungen und die mittels Imidazol eluierten Proteine (E2-E10) weisen nur wenig Degradation auf. Die Elutionsfraktionen konnten im Folgenden für die *in vitro* Bindungsstudien eingesetzt werden.

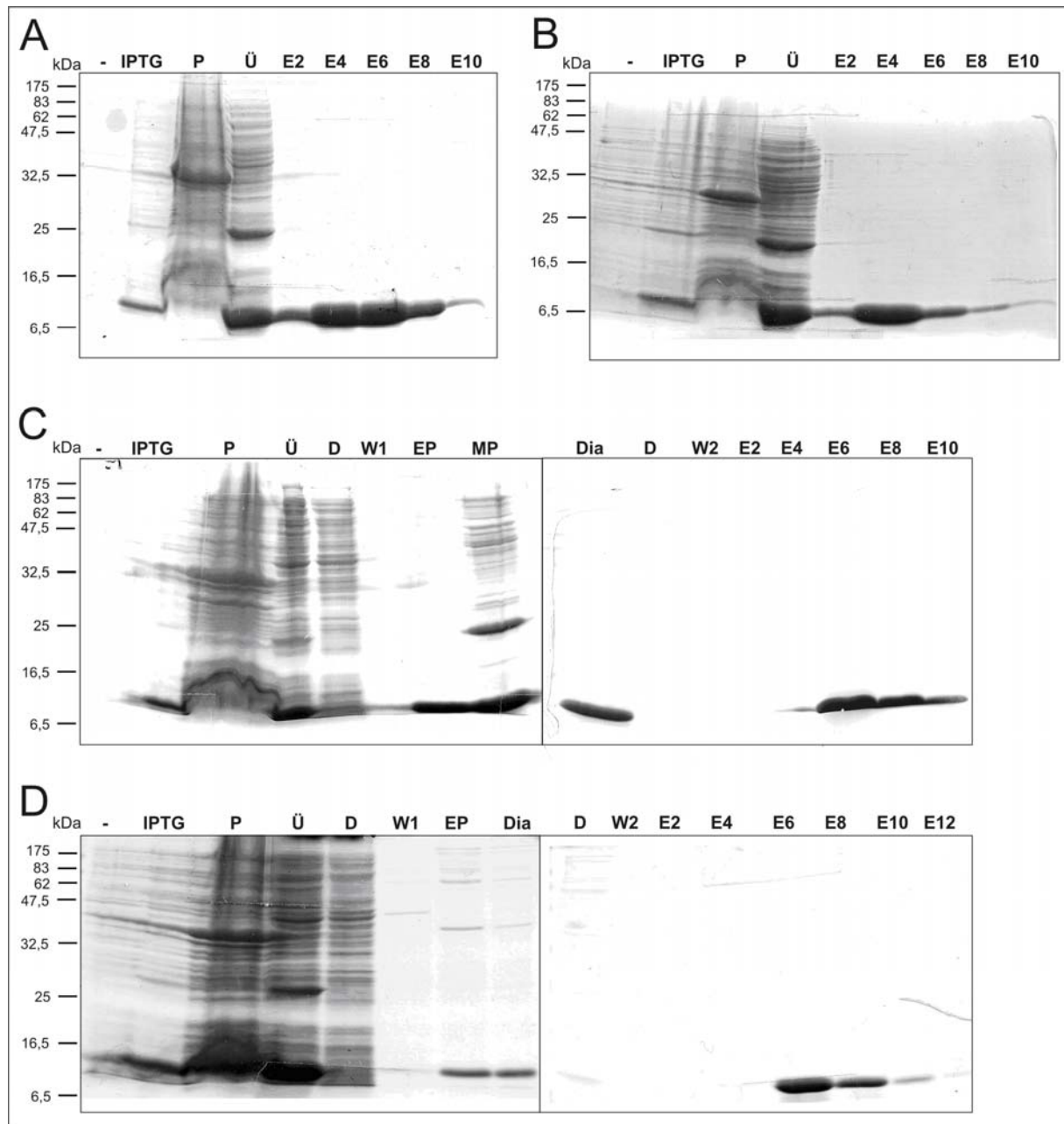


Abbildung 18: Rekombinante Expression der S100P Proteine

Zur Untersuchung der Expression und Anreicherung der verschiedenen C-terminal verkürzten His₆-S100P Fusionsproteine wurden jeweils 20 µl der entsprechenden Proben des Reinigungsprotokolls (3.4.5.1 und 3.4.5.3) sowie eine Matrix-Probe auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mittels einer Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung detektiert.

A: His₆-S100P 91aa, **B:** His₆-S100P 87aa, **C:** His₆-S100P WT, **D:** His₆-S100P F15A

-: vor IPTG Induktion, **IPTG:** nach IPTG Induktion; **P:** Pellet des ultrazentrifugierten Bakterienlysats, **Ü:** Überstand des ultrazentrifugierten Bakterienlysats, **D:** Durchfluss der Bindung an die Matrix, **EP:** Elutionsfraktion der Phenyl-Sepharose-Säule, **MP:** Phenylsepharose-Matrix, **Dia:** nach Dialyse **W1-2:** Waschfraktionen der Protein-gebundenen Matrix, **E1-10:** Elutionsfraktionen

4.1.2 *In vitro* Bindungsstudien

4.1.2.1 Identifizierung der S100P-Bindungsstelle innerhalb des Ezrin

Moleküls

Zur Identifizierung des S100P-Bindungsmotivs in Ezrin wurden *in vitro* Bindungsstudien (3.4.7) durchgeführt. Für diese Studien wurden die Matrices mit den immobilisierten C-terminal verkürzten Ezrin GST-Fusionsproteinen (3.4.5.2) verwendet. Um mögliche unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zwischen S100P WT und den Ezrin Proteinen ausschließen zu können, wurden gleichzeitig Bindungsstudien mit dem monomeren S100P F15A Protein durchgeführt, welches nicht die Fähigkeit besitzt eine funktionale Dimerstruktur zu bilden. Zudem wurden zur weiteren Kontrolle der Bindungsspezifität die Experimente nicht nur in der Anwesenheit von Ca^{2+} sondern auch von EGTA durchgeführt. Ferner wurde für jeden Ansatz das jeweilige reziproke Experiment mit immobilisiertem S100P WT/F15A Protein durchgeführt. Die Ergebnisse der Bindungsstudien in Gegenwart von EGTA als auch der reziproken Experimente werden hier nicht im Einzelnen gezeigt.

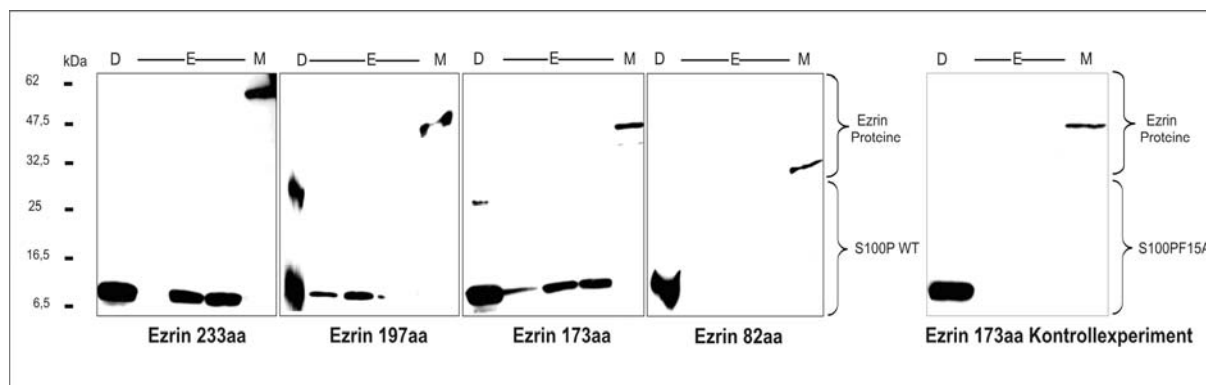


Abbildung 19: Die S100P Bindungsstelle im Ezrin Protein befindet sich zwischen den Aminosäuren 81-172

Für die Kartierung der S100P-Bindungsstelle im Ezrin Molekül wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Hierzu wurden Affinitätsäulen mit immobilisierten C-terminal verkürzten Ezrin GST-Fusionsproteinen verwendet und His₆-fusioniertes S100P WT oder S100P F15A Protein in der Flüssigphase hinzugefügt. Die Bindungsstudien wurden mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,5 mM durchgeführt und der Durchfluss (D) gesammelt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Ca^{2+} -abhängig gebundenen Proteine mit einem EGTA-Puffer eluiert (E) und eine Probe von der Protein-gebundenen Matrix (M) entnommen. Äquivalente Mengen sämtlicher Fraktionen wurden auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot analysiert. Die S100P-Proteine wurden durch einen monoklonalen Penta-His-Antikörper und die Ezrin Proteine über einen monoklonalen GST-Antikörper nachgewiesen.

Mit Ausnahme des Ezrin 82aa Proteins bindet das S100P WT Protein spezifisch an die C-terminal verkürzten Ezrin Proteine. Die S100P F15A-Kontrolle bestätigt die Spezifität dieser Interaktion.

Die Analyse der *in vitro* Bindungsstudien (siehe Abbildung 19) ergab, dass das S100P WT Protein Ca^{2+} -abhängig an die Proteine Ezrin 233aa, Ezrin 197aa und Ezrin 173aa bindet, wohingegen keine Bindung an das Ezrin 82aa Protein feststellbar war und sich in diesem Ansatz das gesamte S100P WT Protein im Durchfluss (D) befand. Demnach scheinen die C-terminalen Aminosäuren 82 bis 173 des Ezrins wesentlich an der Bindung von S100P beteiligt zu sein. Die Kontrollexperimente mit dem monomeren S100P F15A Protein und die Experimente in Abwesenheit von Ca^{2+} zeigen darüber hinaus, dass die Bindung von S100P WT an die Ezrin Proteine zum einen dimerspezifisch und zum anderen Ca^{2+} -abhängig erfolgt. Abbildung 19 zeigt beispielhaft ein Kontrollexperiment, das mit dem monomeren S100P F15A sowie dem Ezrin 173aa Protein durchgeführt wurde. In diesem Experiment ist, im Gegensatz zu dem vergleichbaren Experiment mit dem S100P WT Protein, keine Bindung des S100P F15A Proteins an das Ezrin Protein detektierbar.

4.1.2.2 Identifizierung der Ezrin-Bindungsstelle innerhalb des S100P

Moleküls

Die Ezrin Bindungsstelle im S100P Protein wurde ebenfalls mittels *in vitro* Bindungsstudien charakterisiert (3.4.7.1). Hierzu wurden in der Gegenwart von 0,5 mM Ca^{2+} rekombinant exprimierte C-terminal verkürzte S100P Proteine über Affinitätssäulen mit immobilisiertem N-ERMAD His₆-Fusionsprotein gegeben.

Zur Kontrolle wurden zum einen parallele Ansätze in Abwesenheit von Ca^{2+} und zum anderen reziproke Experimente mit den immobilisierten S100P Proteinen durchgeführt, deren Ergebnisse hier nicht gezeigt werden.

Nachdem die S100P Proteine mehrmals über die N-ERMAD Säulen (siehe Abbildung 20) gegeben und ungebundene Proteine durch wiederholtes Waschen entfernt wurden, erfolgte die Elution (E) der Ca^{2+} -abhängig gebundenen S100P Proteine von den N-ERMAD-Matrices (M).

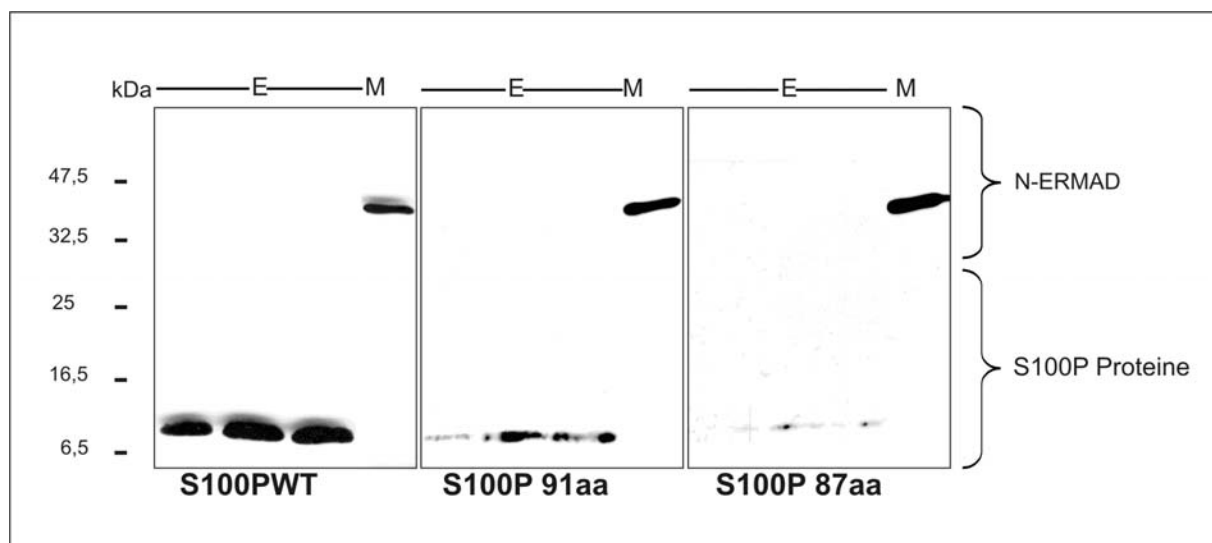


Abbildung 20: Für die Bindung von Ezrin sind die C-terminalen Aminosäuren 88-90 im S100P Protein essentiell

Für die Kartierung der Ezrin-Bindungsstelle im S100P Molekül wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Hierzu wurden Affinitätssäulen mit immobilisiertem His₆-N-ERMAD Protein verwendet und thrombingspaltenes S100P WT, S100P 91aa und S100P 87aa Protein in der Flüssigphase hinzugefügt. Die Bindungsstudien wurden mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 0,5 mM durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Ca^{2+} -abhängig gebundenen Proteine mit einem EGTA enthaltendem Puffer eluiert (E) und eine Probe von der Matrix (M) entnommen. Äquivalente Mengen sämtlicher Fraktionen wurden auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot analysiert. Die S100P-Proteine wurden durch einen monoklonalen S100P Antikörper (S100P *ascitis*) und die Ezrin Proteine über einen monoklonalen Penta-His-Antikörper nachgewiesen.

Die Westernblot Analyse zeigt, dass im Gegensatz zu dem S100P WT und dem S100P 91aa Protein das S100P 87aa Protein nicht an die N-ERMAD Domäne des Ezrin Proteins bindet.

Die *in vitro* Bindungsstudien zeigen, dass nur das S100P WT und das S100P 91aa Protein Ca^{2+} -abhängig an die N-ERMAD Matrices binden und mit einem EGTA-Puffer eluiert (E) werden können. Für das S100P 87aa Protein kann keine Bindung an das N-ERMAD Protein festgestellt werden. Demzufolge sind die Aminosäuren 88 bis 90 essentiell für die Bindung von Ezrin.

Die mit den C-terminal verkürzten Ezrin und S100P Derivaten durchgeführten Bindungsstudien zeigen, dass die Interaktion zwischen S100P und Ezrin über die Aminosäuren 88-90 im S100P und die Aminosäuren 82-173 im Ezrin Molekül erfolgt (siehe Abbildung 21).

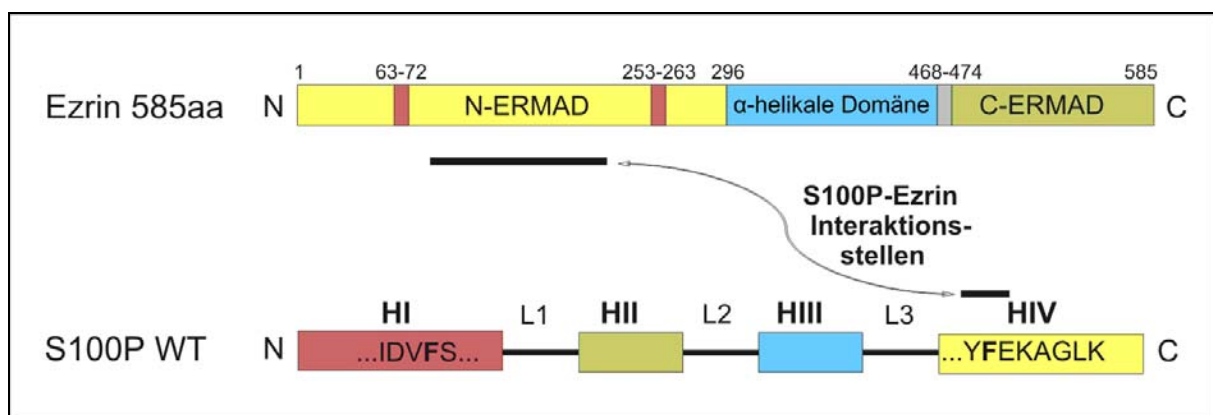


Abbildung 21: Schematische Darstellung der S100P-Ezrin Interaktionsstellen

Die als S100P-Ezrin Interaktionsmotiv identifizierten Bereiche innerhalb des S100P und Ezrin Moleküls sind entsprechend gekennzeichnet. Zusätzlich sind die $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Bindungsstellen im Ezrin Molekül rot dargestellt.

4.1.3 Dimerisierungseigenschaften C-terminal verkürzter S100P

Proteine

S100 Proteine können sowohl Homodimere als auch Heterodimere ausbilden. Bisher ist nur für dimere Strukturen eine Bindung von Liganden gezeigt worden. S100P vermag sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit S100A1 (Wang *et al.*, 2004) und S100Z (Gribenko *et al.*, 2001) zu bilden. Für die Dimerisierung von S100 Proteinen spielt die Anordnung verschiedener hydrophober Aminosäuren an der Kontaktfläche des Dimers eine entscheidende Rolle (siehe Abbildung 22). Im Falle des S100P Moleküls scheint dabei besonders die Aminosäure Phenylalanin 15 notwendig zu sein. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass die Substitution des Phenylalanins durch ein Alanin (S100P F15A) die Dimerisierung des S100P Proteins vollständig eliminiert und das rekombinant exprimierte S100P F15A Protein nur noch im monomeren Zustand vorliegt (Koltzschner and Gerke, 2000).

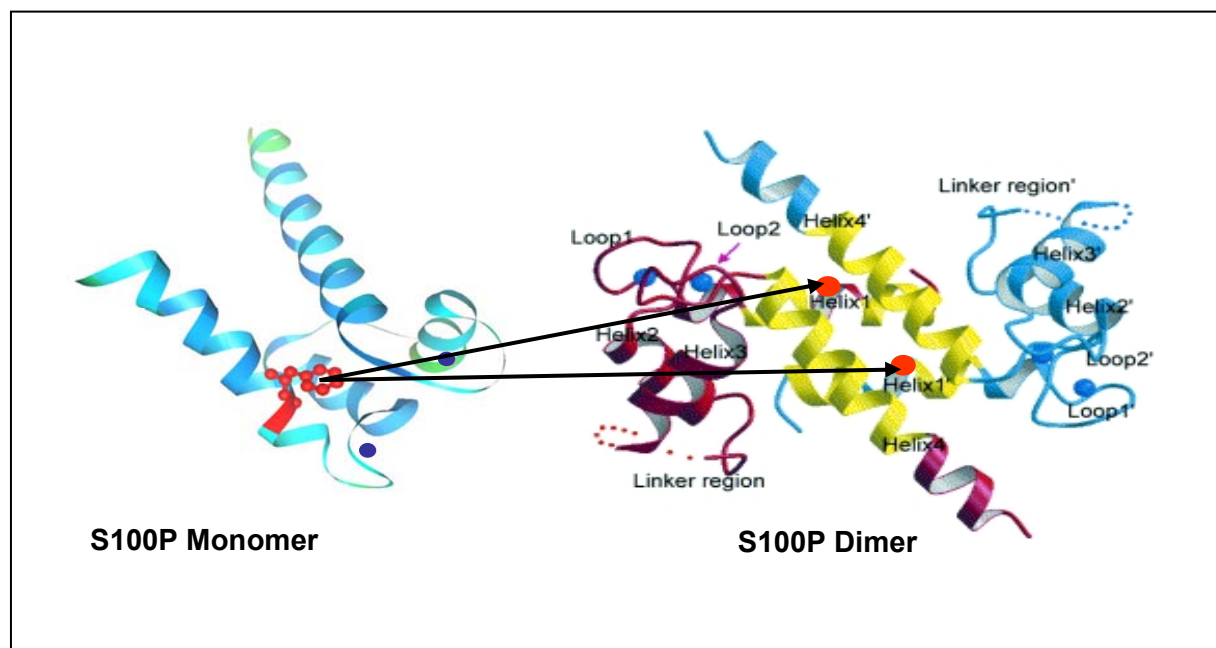


Abbildung 22: Hydrophobe Aminosäuren sind für die Dimerisierung des S100P Moleküls essentiell

Für die Dimerisierung des S100P Proteins ist neben der Anordnung eine Reihe hydrophober Aminosäuren an der Kontaktfläche des Dimers (gelb dargestellt) auch der Phenylalaninrest 15 (rot) essentiell. Die gebundenen Ca^{2+} -Ionen sind in blau dargestellt.

Die C-terminalen Reste der S100 Proteine scheinen hingegen weniger essentiell für die Dimerisierung zu sein. So wurde bereits im Falle des S100A1 Proteins gezeigt, dass die Deletion der C-terminalen Reste keinen Einfluss auf die Dimerisierung hat (Osterloh *et al.*, 1998). Um jedoch vollständig ausschließen zu können, dass die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten C-terminal verkürzten S100P Proteine (siehe Abbildung 17) nicht mehr

dimerisieren können, wurde die Ausbildung von Dimer-Strukturen in einem chemischen „Crosslinking“ Experiment (3.4.9) untersucht. Hierzu wurde neben den verkürzten S100P 91aa und S100P 87aa Proteinen sowie dem S100P WT Protein auch das monomere S100P F15A Protein (Negativkontrolle) mit dem chemischen *crosslinker* BS3 vernetzt. Als weitere Kontrollen wurden parallele Ansätze ohne Zugabe des *crosslinkers* verwendet.

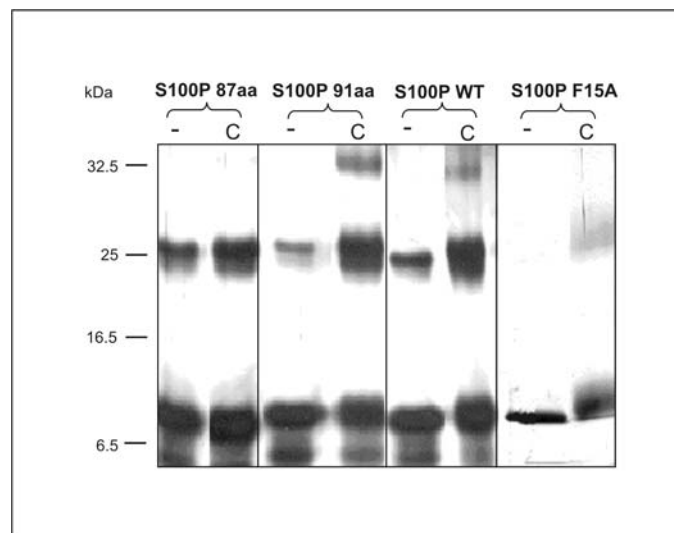


Abbildung 23: Die C-terminalen Aminosäuren des S100P Proteins sind nicht an dessen Dimerisierung beteiligt.

Für das chemische Vernetzungs-Experiment wurden die gegen Puffer C (3.4.9) dialysierten His₆-S100P WT, His₆-S100P F15A und die verkürzten His₆-S100P Proteine S100P 91aa und S100P 87aa auf eine Konzentration von 0,5 mM CaCl₂ eingestellt und mit dem homobifunktionalen *crosslinker* BS3 (C) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden parallele Ansätze ohne Zugabe des *crosslinkers* erstellt (-). Die vernetzten Proteine wurden in einer 15 %igen SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und mittels Silberfärbung detektiert. Mit Ausnahme des monomeren S100P F15A Proteins weisen alle chemisch vernetzten S100P Proteine im Gegensatz zur jeweiligen Negativkontrolle verstärkte Protein-Banden mit einer dem Dimer entsprechenden Größe von 20-25 kDa auf.

In den chemisch vernetzten Ansätzen mit dem S100P WT Protein sowie den verkürzten S100P 91aa und S100P 87aa Proteinen sind nach gelelektrophoretischer Auftrennung Banden mit einem Molekulargewicht von 10 kDa sowie Banden in der Größe von ca. 25 kDa detektierbar (siehe Abbildung 23). Die chemisch vernetzten S100P WT und S100P 91aa Ansätze weisen darüber hinaus zusätzliche Banden in einem höhermolekularen Bereich auf. Für die vernetzten S100P Proteine sind theoretisch Dimere mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa zu erwarten, weshalb anzunehmen ist, dass es sich bei den höhermolekularen Banden in den chemisch vernetzten Ansätzen um Dimere oder aber oligomere Strukturen handelt. In den Kontrollexperimenten ohne *crosslinker* und in dem Ansatz mit dem monomeren S100P F15A Protein sind nur schwache Banden in einem Molekularbereich von ca. 25 kDa zu erkennen. Bei diesen Banden handelt es sich möglicherweise um unspezifische intramolekulare Interaktionen, die durch das SDS im SDS-Probenpuffer verursacht wurden.

Summarisch betrachtet zeigt das chemische Vernetzen der verkürzten S100P Proteine, dass die C-terminalen hydrophoben Aminosäuren nicht an der Dimerisierung des S100P Proteins beteiligt zu sein scheinen und die verkürzten S100P Proteine die Fähigkeit zur Dimerisierung beibehalten haben. Demzufolge kann im Falle des nicht an Ezrin bindenden S100P 87a Proteins ausgeschlossen werden, dass die nicht erfolgende Bindung an Ezrin auf einer fehlerhaften Dimerisierung des Proteins beruht.

4.2 S100P-vermittelte, PtdIns(4,5)P₂-unabhängige Aktivierung des Ezrin Moleküls

Das Ezrin Protein besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen. Neben der C-ERMAD Domäne, die unter anderem an F-Aktin bindet, vermag die N-ERMAD Domäne neben verschiedenen Transmembranproteinen PtdIns(4,5)P₂ zu binden und ist infolgedessen in der Lage, mit PtdIns(4,5)P₂ enthaltenden Liposomen zu interagieren (Niggli *et al.*, 1995). Als PtdIns(4,5)P₂-Bindungsstellen wurden die Aminosäuren 12-115 und 233-310 identifiziert (Barret *et al.*, 2000). Die Kartierung des Ezrin-S100P Interaktionsmotivs (4.1.2.1) ergab, dass die Aminosäuren 82-173 an der Bindung des S100P beteiligt sind (siehe Abbildung 24). Da die PtdIns(4,5)P₂- und S100P-Bindungsstellen aber sehr nah beieinander liegen, wäre es denkbar, dass die Bindung kompetitiv erfolgt. Da sowohl die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ in Kombination mit der Phosphorylierung des T567 Restes (Fievet *et al.*, 2004) als auch die Bindung von S100P eine Aktivierung des Ezrin Moleküls zur Folge hat (Koltzschner *et al.*, 2003), wäre es darüber hinaus möglich, dass die Bindung nicht nur kompetitiv erfolgt, sondern, dass die Ezrin-Aktivierung durch S100P der durch PtdIns(4,5)P₂ vermittelten ähnelt.

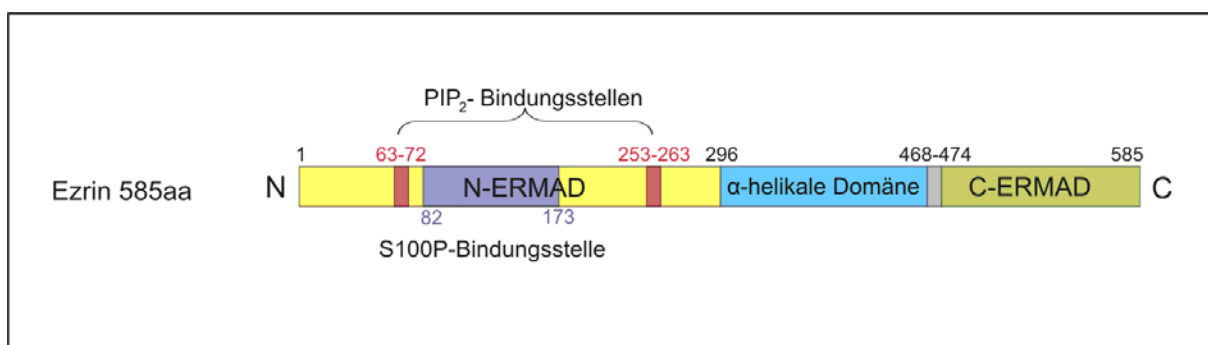


Abbildung 24: Die PtdIns(4,5)P₂- und S100P-Bindungsstellen sind in derselben Region des Ezrin Moleküls lokalisiert

Die innerhalb der N-ERMAD Domäne als PtdIns(4,5)P₂-Bindungsstellen beschriebenen Aminosäurereste 63-72 und 253-263 sind rot hervorgehoben und die als S100P-Bindungsstelle identifizierte Aminosäurereste 82-173 in blau dargestellt.

Zur Untersuchung der Konkurrenz zwischen der S100P- und PtdIns(4,5)P₂-Bindung wurden Liposomen-Co-Sedimentationen (3.4.10) durchgeführt. Für diese Co-Sedimentationen wurden POPC-Vesikel mit einem PtdIns(4,5)P₂-Gehalt von 3 % mit einer Mischung aus N-ERMAD Protein und den S100P Derivaten inkubiert. Zur Kontrolle der Bindung des N-ERMAD Proteins, sowie zur Abschätzung des Einflusses der S100P Derivate auf die Bindung an die PtdIns(4,5)P₂-Vesikel, wurden in einem Ansatz die Vesikel nur mit N-ERMAD Protein gemischt (Positivkontrolle). Nachdem die Vesikel sedimentiert und mehrmals gewaschen wurden, folgte die Analyse sämtlicher Fraktionen in einer SDS-PAGE (3.4.3).

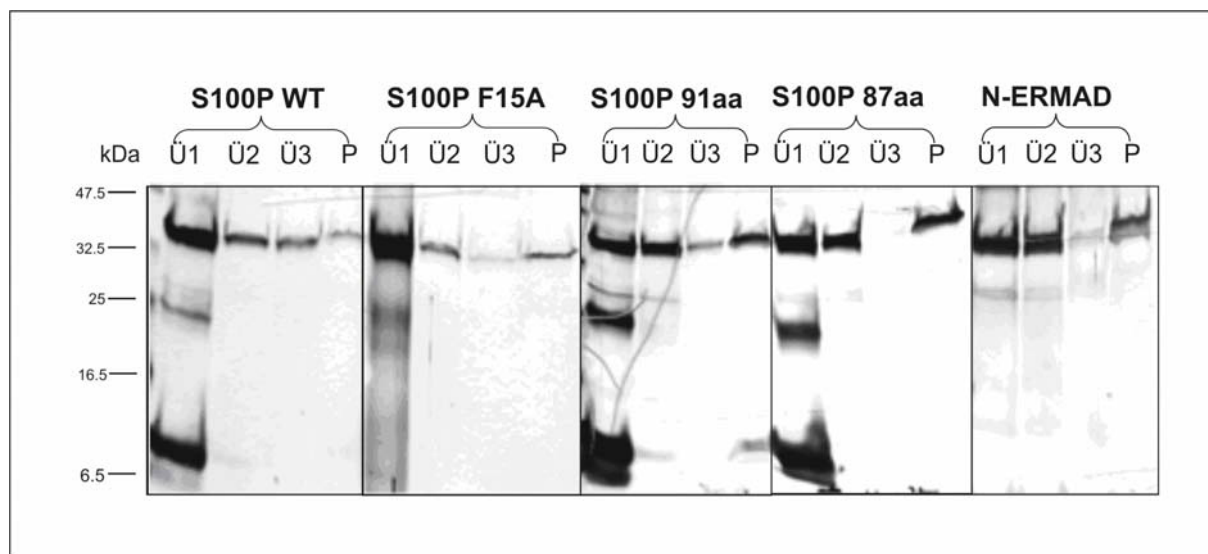


Abbildung 25: S100P kompetiert mit PtdIns(4,5)P₂ um die Bindung an Ezrin

POPC-Vesikel mit einem PtdIns(4,5)P₂-Gehalt von 3 % wurden 30 min mit einer Mixtur von jeweils 20 µg der S100P Proteine und N-ERMAD inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz ohne S100P-Protein erstellt. Nach drei Wasch- und Ultrazentrifugationsschritten wurden die mittels TCA gefällten Proteine der Überstände (Ü1-Ü3) und das jeweilige Pellet (P) in SDS-Probenpuffer aufgenommen, auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen und mittels Silberfärbung analysiert.

Die SDS-PAGE Analyse zeigt, dass die Zugabe von S100P WT die Menge an Liposomen-gebundenem N-ERMAD Protein in der Pellet Fraktion (P) reduziert, während das S100P 87aa Protein keinen Einfluss auf die Bindung des N-ERMADs an PtdIns(4,5)P₂ zeigt.

Der Vergleich zwischen der Positivkontrolle und dem Ansatz mit einer Mischung aus N-ERMAD und S100P WT Protein zeigt, dass die Zugabe des S100P WT Proteins zu einer Abnahme an Vesikel-gebundenem N-ERMAD Protein (P) führt (siehe Abbildung 25). Auch die Zugabe des S100P 91aa Proteins führt zu einer verminderten Bindung des N-ERMAD Proteins an die PtdIns(4,5)P₂-Vesikel. Dagegen ist in den Ansätzen mit dem monomeren S100P F15A Protein als auch mit dem S100P 87aa Protein, die keine Bindung an N-ERMAD zeigen, keine Abnahme von N-ERMAD Protein in der Vesikelfraktion feststellbar. Diese Ergebnisse werden durch die statistische Auswertung dreier unabhängig durchgeführter Liposomen-Co-Sedimentationen belegt (siehe Abbildung 26).

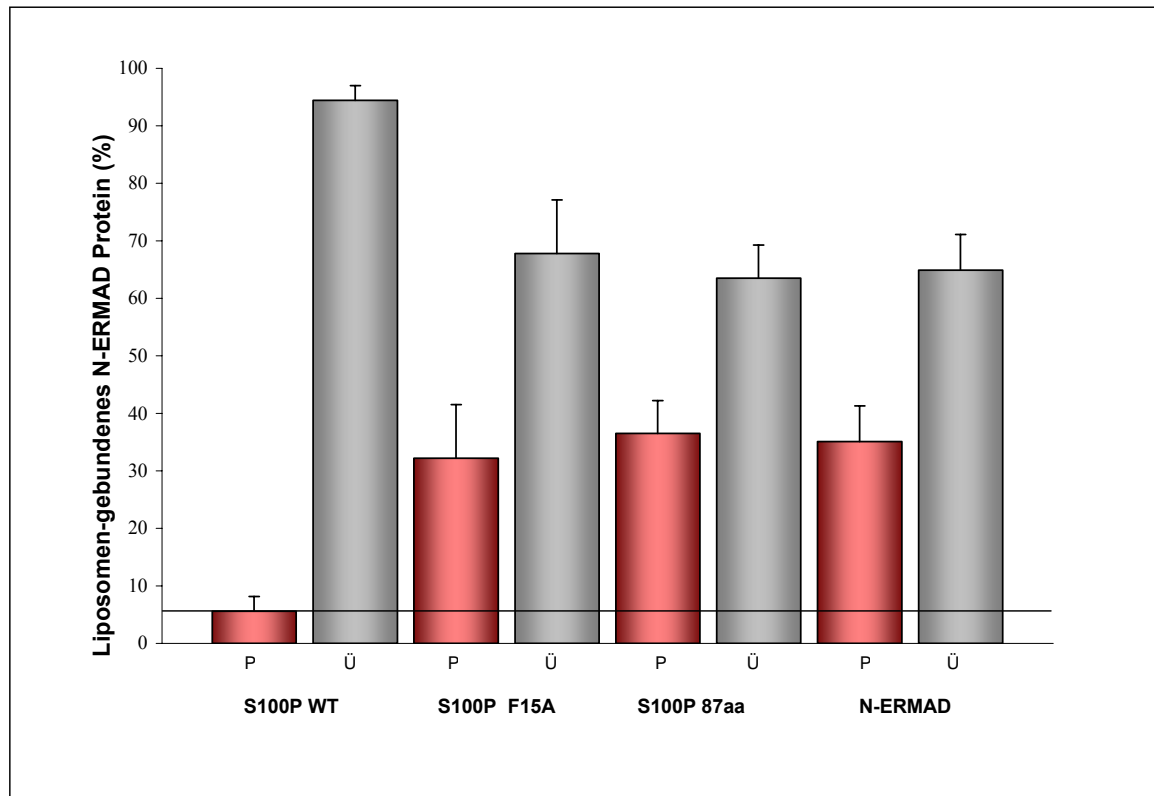


Abbildung 26: Die Bindung von S100P WT führt zu einer Verringerung der PtdIns(4,5)P₂-Bindung von N-ERMAD um ca. 30 %

Die statistische Auswertung der Liposomen Co-Sedimentation mit dem ungepaarten Student t-Test erfolgte anhand dreier unabhängig voneinander durchgeführter Experimente. Dazu wurde die Menge an gebundenem N-ERMAD Protein (P) im Gegensatz zu den ungebundenen Mengen in den Überständen (Ü) analysiert. Der Ansatz mit dem S100P WT Protein zeigt im Vergleich zu den Ansätzen mit N-ERMAD Protein, N-ERMAD plus monomerem S100P F15A Protein und N-ERMAD plus verkürztem S100P 87aa Protein eine signifikante Abnahme von gebundenem N-ERMAD Protein in der Pellet-Fraktion (P= 0,003; P = 0,018; P= 0,002).

Für die statistische Auswertung wurden die Mengen an gebundenem N-ERMAD Protein (P) direkt in Relation zu den nicht gebundenen Mengen in den Überständen (Ü) gesetzt. Im Vergleich zur Positivkontrolle ergab der ungepaarte Student t-Test eine signifikante Abnahme von 29,51 % (P=0,003) an Vesikel-gebundenem N-ERMAD Protein in dem S100P WT-Ansatz. Ebenso zeigte der Vergleich des S100P WT Ansatzes zum S100P F15A- und zum S100P 87aa Ansatz eine Abnahme an Vesikel-gebundenem N-ERMAD Protein (S100P F15A: 26,55 %, P= 0,018; S100P 87aa: 30,92 %, P= 0,002).

Diesen Ergebnissen zufolge scheint die Bindung des S100P WT Proteins an die N-ERMAD Domäne des Ezrins dessen Bindung an PtdIns(4,5)P₂ zu verringern, d.h. kompetitiv zur Bindung von PtdIns(4,5)P₂ zu sein. Demnach wäre es denkbar, dass die Aktivierung des Ezrins durch Bindung von S100P einer durch Bindung von PtdIns(4,5)P₂ vermittelten Aktivierung ähnelt.

4.3 Relevanz der S100P-Ezrin Interaktion in der Tumorzellmigration

S100 Proteine besitzen ein weites Spektrum intrazellulärer als auch extrazellulärer regulatorischer Aktivitäten. Viele S100 Proteine wie z.B. S100A4 werden verstärkt in humanen Tumorzellen exprimiert und sind an der Tumor-Metastasierung beteiligt (Donato, 2001). In NSCLC, einer Form von Lungenkrebs, wurde eine erhöhte Expression von S100P festgestellt und zudem wurde gezeigt, dass die Überexpression von S100P in der Lungenkrebszelllinie HTB58 zu einer erhöhten transendothelialen Migration führt (Diederichs *et al.*, 2004).

Auch Ezrin, das eine Verknüpfung zwischen Plasmamembran und Aktinzytoskelett herstellt, ist neben der Bildung von Zell-Zell-Kontakten und der Aufrechterhaltung der Zellstruktur in Prozessen wie Zellbewegung und -migration involviert (Louvet-Vallee, 2000). Vorhergehende Studien zeigen überdies, dass Ezrin durch die Bindung von S100P aktiviert werden kann (Koltzsch *et al.*, 2003). Zusammen betrachtet führen diese Befunde zu der Annahme, dass die S100P-Ezrin Interaktion für die Tumorzellmigration relevant sein könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der S100P-Ezrin Interaktion auf die spontane transendotheliale Migration von Tumorzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden stabile HTB58-Zelllinien erzeugt, die verschiedene EGFP-S100P und EGFP-Ezrin Fusionsproteine exprimierten (3.3.5). Nach der Transfektion mit den EGFP-Fusionskonstrukten GFP-S100P WT, GFP-S100P F15A, GFP-S100P 91aa, GFP-S100P 87aa, GFP-Ezrin T567D und der EGFP Negativkontrolle, wurden die Zellen selektioniert und zur Vermeidung klonspezifischer Effekte als Mischklonpopulation weiterkultiviert. Die Expression der EGFP-Fusionsproteine in der jeweiligen Zelllinie wurde durch Durchflusszytometrische (FACS)- und Immunfluoreszenz-Analysen sowie im Westernblot untersucht. Alle Zelllinien, mit Ausnahme der S100P F15A-Zelllinie, zeigten ein EGFP-Expressionslevel von ca. 40 %. Für die S100P F15A-Zelllinie konnte hingegen nur ein Expressionslevel von ca. 15 % festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), was unter Umständen auf eine bereits bekannte instabile Expression des S100P F15A Proteins zurückzuführen ist.

Die ektopische Expression der Fusionsproteine wurde darüber hinaus im Westernblot (3.4.4) verifiziert. Hierfür wurden Zelllysate (3.3.10.2) der entsprechenden Zelllinien hergestellt und diese durch Verwendung eines gegen GFP gerichteten Antikörpers auf die Expression der EGFP-Fusionsproteine hin untersucht (siehe Abbildung 27). Die Westernblot-Analyse bestätigt, dass in jeder der verwendeten Zelllinien das entsprechende EGFP-Fusionsprotein

exprimiert wird. Allerdings ist im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinen auch hier im Falle des S100P F15A GFP-Fusionsproteins ein niedrigeres Expressionslevel festzustellen.

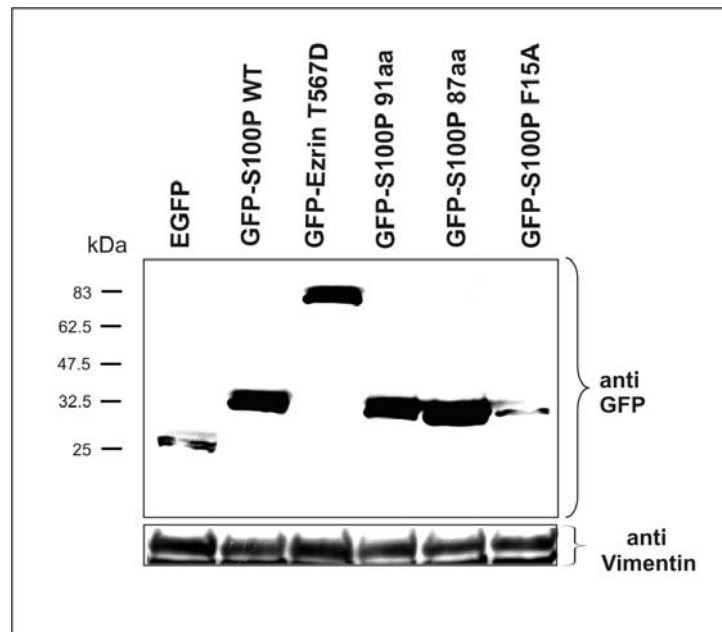


Abbildung 27: Die S100P- und Ezrin-GFP-Fusionsproteine werden in den stabilen HTB58-Zellen exprimiert

Die Expression der S100P WT, Ezrin T567D, S100P 91aa, S100P 87aa und S100P F15A GFP-Fusionsproteine sowie der EGFP-Kontrolle in den stabil exprimierenden HTB58-Zelllinien wurde mittels Westernblot untersucht. Hierzu wurden äquivalente Mengen der jeweiligen Zelllysate auf eine 15%ige SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot die GFP-Fusionsproteine mittels eines monoklonalen GFP-Antikörpers nachgewiesen. Der Nachweis von Vimentin mittels eines monoklonalen Vimentin Antikörpers diente als Ladekontrolle. Die Westernblot Analyse zeigt, dass das entsprechende GFP-Fusionsprotein in allen verwendeten stabilen Zelllinien exprimiert wird.

Die Relevanz der Ezrin-S100P Interaktion für die Tumorzellmigration wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand eines Zellkulturmodells charakterisiert. In diesem Modellsystem wurde die Migration der stabilen Zelllinien durch einen endothelialen Monolayer innerhalb einer Transwell-Kammer untersucht (3.3.9). Hierzu wurde ein Monolayer aus HMEC-1 Endothelzellen auf Transwell-Filter ausgesät und Zellen der stabilen HTB58-Zelllinien in die obere Kammer des Systems gegeben. Nach 16 h wurde die Transmigrationsrate der stabil exprimierenden Linien mittels FACS Analyse ausgewertet.

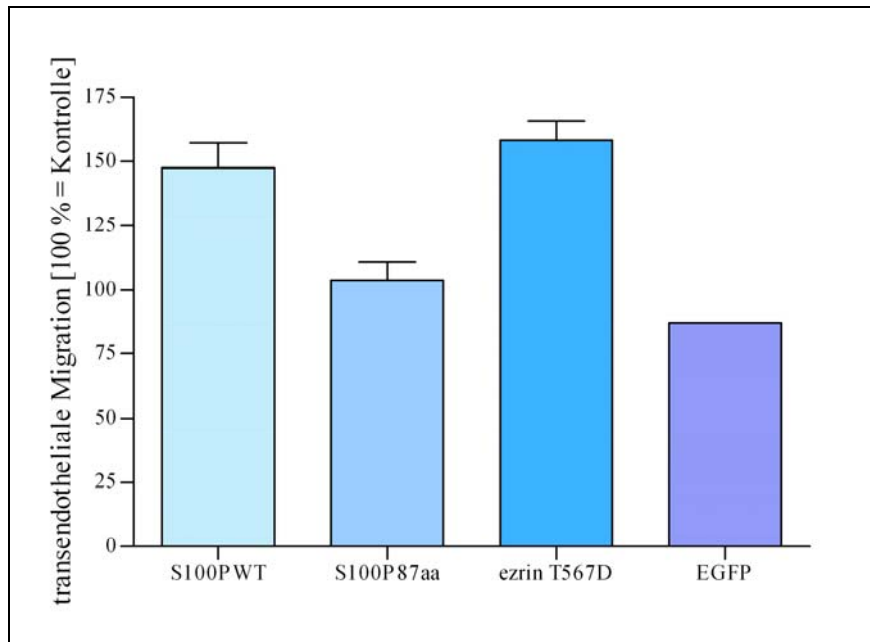


Abbildung 28: Die Überexpression des S100P WT und Ezrin T567D GFP-Fusionsproteins führt zu einer gesteigerten transendothelialen Migration von HTB58-Zellen

Die statistische Auswertung der vier unabhängig durchgeführten transendothelialen Migrationsexperimente erfolgte mit Hilfe des ungepaarten Student t-Tests. Für die Auswertung wurde die Transmigrationsrate der Negativkontrolle (EGFP) gleich 100 % gesetzt. Die Analyse des migratorischen Phänotyps der verschiedenen stabilen Linien ergab im Vergleich zur EGFP-Kontrolle eine signifikante Zunahme der Migration für Zellen, die das S100P WT ($P=0,011$) und Ezrin T567D ($P=0,004$) exprimierten. Die Überexpression des S100P 87aa GFP-Fusionsproteins ergab hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die spontane transendotheliale Migration.

Die Auswertung vier unabhängig durchgeführter Transmigrations-Experimente (siehe Abbildung 28) ergab im Vergleich zur EGFP-Kontrolle eine signifikante ($P=0,011$) Steigerung der transendothelialen Migration der S100P WT überexprimierenden HTB58 Zellen um 50 %. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den bereits veröffentlichten Daten zur Expression von S100P in NSCLC (Diederichs *et al.*, 2004) und bestätigt die Annahme, dass S100P an der Tumorzellmigration beteiligt ist. Des Weiteren führte die Überexpression des Ezrin T567D EGFP-Fusionsproteins, welches den permanent aktiven Zustand des Ezrins nachahmt, ebenfalls zu einer signifikanten 50%igen Zunahme der transendothelialen Migration. Demnach scheint auch das aktivierte Ezrin in der transendothelialen Migration involviert zu sein. Da Ezrin nicht nur durch die Bindung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und Threonin-Phosphorylierung sondern auch durch die Bindung von S100P aktiviert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass die S100P-vermittelte Steigerung der Migrationsrate in der Aktivierung des Ezrin Moleküls begründet liegt. Für diese Vermutung spricht auch, dass die Überexpression des Ezrin-bindungsdefizienten S100P 87aa EGFP-Fusionsproteins zu keiner Steigerung der transendothelialen Migration führte.

Entgegen bisheriger Annahmen führt auch die Überexpression des S100P F15A Fusionsproteins zu einer wenn auch nur geringfügigen Steigerung der transendothelialen

Migration (Ergebnis nicht gezeigt), was möglicherweise im Zusammenhang mit der niedrigeren und instabilen Expression dieses Fusionsproteins steht.

Zusammengefasst bestätigen die Ergebnisse der transendothelialen Migrationsexperimente die Annahme, dass die Interaktion zwischen Ezrin über S100P, sowie die daraus resultierende Aktivierung von Ezrin, für die Tumorzellmigration bedeutsam sind.

4.4 Expression und Lokalisation von endogenem S100P und Ezrin in humanen Zelllinien

S100 Proteine werden ausschließlich in Vertebraten exprimiert und die Expression der einzelnen S100 Proteine weist eine spezifische und nur teilweise überlappende Gewebeverteilung auf. Dementsprechend wird angenommen, dass S100 Proteine im Gegensatz zum ubiquitär vorkommenden Calmodulin, nur sehr wenige spezifische Effektorproteine mit vergleichbarer Gewebeverteilung regulieren (Donato, 2001).

Das S100 Protein S100P wurde erstmals aus humaner Plazenta isoliert (Becker *et al.*, 1992). Das S100P-Gen wird in einer Vielzahl von Geweben unterschiedlich stark exprimiert. So wurde eine verstärkte Expression des humanen S100P-Gens in der Plazenta, dem Herzen, der Lunge, dem Skelettmuskel, der Milz und in Leukozyten festgestellt (Jin *et al.*, 2003). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von S100P und der Karzinogenese (Übersicht in Marenholz *et al.*, 2004). So wurde bei NSCLC und bei Mamakarzinomen eine erhöhte Expression des S100P-Gens festgestellt (Diederichs *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2001).

Das zur ERM-Proteinfamilie gehörende Ezrin wird hingegen ubiquitär und in allen Epithelien der S100P-positiven Gewebe exprimiert (Berryman *et al.*, 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die intrazelluläre Lokalisation des endogenen Ezrin und S100P Proteins charakterisiert und so ein Modellsystem für die Analyse der Interaktion *in vivo* identifiziert werden. Aus diesem Grund sollte zunächst vor allem die endogene Expression des S100P Proteins in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Hierzu wurden unter anderem Krebszelllinien wie die Mamakarzinomzelllinie SKBR3, die Bronchialkarzinomzelllinie HTB58, die aus einem humanen Cervix-Karzinom entstammende HeLa-Zelllinie sowie die aus einem humanen Plattenepithel isolierte A431-Zelllinie verwendet. Dabei wurde besonders die A431-Zelllinie betrachtet, da in dieser durch Stimulierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren eine Ezrin-Umverteilung in die Mikrovilli der Zellen bewirkt werden kann (Bretscher, 1989). Dies ermöglicht die genaue Beobachtung der Ezrin Aktivierung und eignet sich daher besonders, die S100P vermittelte Aktivierung des Ezrins *in vivo* zu untersuchen.

4.4.1 Untersuchung der Expression von endogenem S100P in humanen Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des endogenen S100P Proteins im Westernblot, in der Immunfluoreszenz sowie auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht.

4.4.1.1 Nachweis des endogenen S100P auf Proteinebene

Zunächst wurde die Expression des endogenen S100P Proteins im Westernblot untersucht. Hierzu wurden Totallysate von A431-, HeLa- und SKBR3-Zellen erzeugt und das endogene S100P Protein mit einem spezifischen monoklonalen S100P-Antikörper (S100P *ascitis*) nachgewiesen.

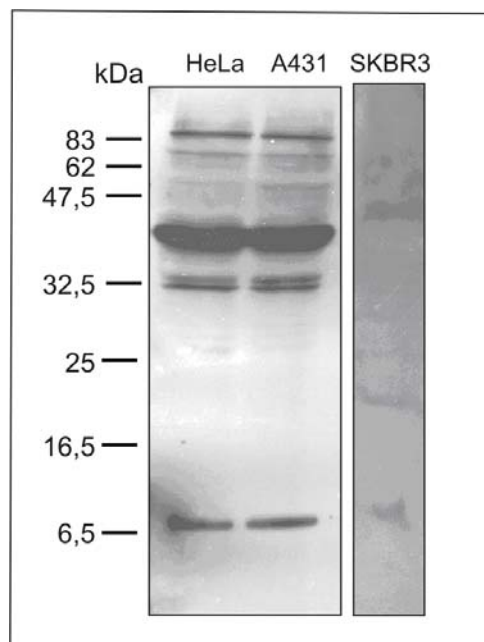


Abbildung 29: Endogenes S100P Protein in A431-, HeLa- und SKBR3-Zellen

Zur Untersuchung der Expression des endogenen S100P Proteins in A431-, HeLa-, und SKBR3-Zellen wurden die Zellen einer konfluenten 58 cm² Schale mit heißem 4fachem SDS-Probenpuffer lysiert (3.3.10.1). Jeweils 30 µl des A431- und des HeLa-Zelllysats, sowie 25 µl des SKBR3-Zelllysats wurden anschließend auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot analysiert. Das endogene ca. 10 kDa große S100P Protein wurde mit einem monoklonalen S100P Antikörper (S100P *ascitis*) nachgewiesen.

Im Westernblot ist das endogene S100P Protein sowohl in A431- und HeLa-Zellen als auch in SKBR3-Zellen nachweisbar.

In allen drei Lysaten wurde eine 10 kDa große Bande, die dem Molekulargewicht des endogenen S100P entspricht, detektiert (siehe Abbildung 29). Allerdings ist sowohl in A431-Zellen als auch in HeLa-Zellen eine Vielzahl weiterer Banden zu erkennen, bei denen es sich möglicherweise um Oligomere des S100P handeln könnte. Es könnte sich aber auch um unspezifische Antikörperreaktionen handeln.

Im Vergleich zu den A431- und HeLa-Zellen sind in dem SKBR3-Lysat, neben dem 10 kDa Signal, nur wenige weitere Proteinbanden zu erkennen. Zudem scheint das endogene S100P Protein in den SKBR3-Zellen nur schwach exprimiert zu werden. Im HTB58-Zelllysate konnte im Westernblot kein endogenes S100P Protein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint das Protein in diesen Zellen nur in sehr geringen Mengen exprimiert zu werden. Aus diesem Grund sollte, wie im Folgenden gezeigt, das endogene S100P aus HTB58 Zellen an einer Phenyl-Sepharose-Matrix angereichert werden. Auf dieselbe Weise wurde auch versucht endogenes S100P in A431-Zellen spezifisch nachzuweisen.

Zur Anreicherung des endogenen S100P Proteins wurden Lysate aus den A431- und HTB58-Zellen mit einer Phenyl-Sepharose-Matrix inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen der Matrix wurden ungebundene Proteine entfernt und Proben des Überstandes und der Matrix wurden im Westernblot untersucht.

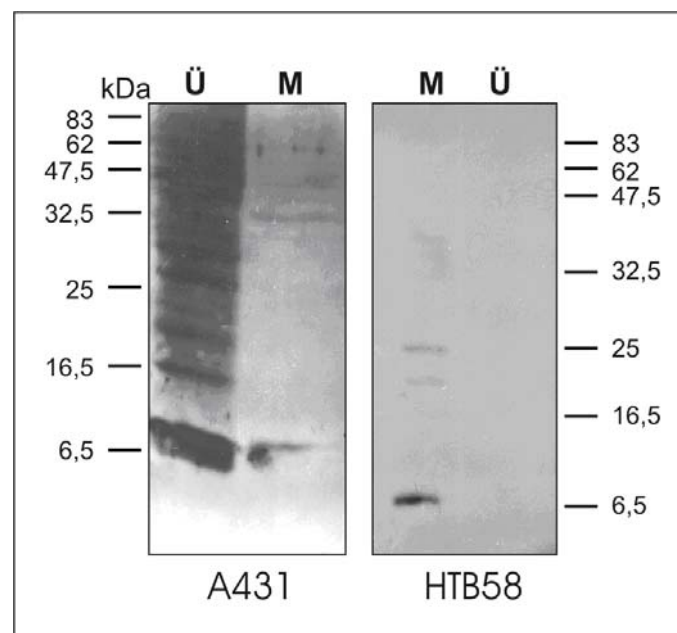


Abbildung 30: Anreicherung von endogenem S100P Protein aus A431- und HTB58-Zellen

Zur Anreicherung des in A431- und HTB58-Zellen nur schwach exprimierten endogenen S100P Proteins wurde eine HIC-Chromatographie mit einer Phenyl-Sepharose-Matrix durchgeführt. Hierzu wurden jeweils Lysate aus vier konfluenten 58 cm² Schalen mit 250 µl Phenyl-Sepharose-Matrix inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden Proben der ungebundenen Proteine im Überstand (Ü) und der Matrix (M) 1:1 mit 4fachem SDS-Probenpuffer versetzt und jeweils 30 µl auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen. Das endogene S100P wurde im Westernblot mittels eines monoklonalen S100P-Antikörpers (S100P *ascitis*) nachgewiesen. Es konnte aus HTB58-Zellen über eine Phenylsepharose Matrix erfolgreich angereichert werden, die Anreicherung aus A431-Zellen hingegen verlief weniger effektiv.

Im A431-Ansatz ist eine 10 kDa Bande in der Matrixfraktion erkennbar. Demnach wurde das endogene S100P Protein an die Phenyl-Sepharose-Matrix gebunden (siehe Abbildung 30). Zudem zeigt der Vergleich des Überstandes und der Matrix-Probe des A431-Ansatzes, dass das S100P über die Phenyl-Sepharose Matrix aus dem Zelllysate aufgereinigt werden konnte. So sind vergleichsweise zum Überstand in der Matrixfraktion neben der 10 kDa Bande nur wenige weitere Proteinbanden detektierbar. Allerdings ist in der Matrixfraktion im Gegensatz zum Überstand nur eine relativ schwache 10 kDa Bande erkennbar. Demnach scheint entweder ein Teil des endogenen S100P nicht gebunden worden zu sein oder es handelt sich bei der 10 kDa großen Bande im Überstand nicht ausschließlich um das endogene S100P Protein.

Im Falle der HTB58-Zellen konnte endogenes S100P erfolgreich über eine Phenyl-Sepharose-Matrix angereichert werden. Vor der Anreicherung war kein endogenes S100P im Westernblot detektierbar. Nach der Anreicherung über Phenyl-Sepharose ist hingegen eine deutliche ca. 10 kDa große Bande im Westernblot erkennbar, bei der es sich vermutlich um das endogene S100P Protein handelt.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Analysen zur Expression des S100P Proteins, eine nur sehr schwache Expression des endogenen S100P in allen untersuchten Zelllinien. Mit Ausnahme der SKBR3-Zellen musste zur zweifelsfreien Detektion im Westernblot erst eine Anreicherung an einer Phenyl-Sepharose-Matrix erfolgen.

4.4.1.1 Nachweis von endogenem S100P auf mRNA-Ebene

Da endogenes S100P in A431-Zellen nach der Anreicherung an einer Phenyl-Sepharose-Matrix im Westernblot nur sehr schlecht nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression des endogenen S100P zusätzlich auf mRNA-Ebene untersucht. Zum Nachweis der S100P mRNA in A431-Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert (3.2.2) und diese als Matrize zur cDNA-Synthese in einer RT-PCR eingesetzt (3.2.4). Nachdem der RNA-Strang mittels RNase H-Verdau (3.2.4.1) entfernt wurde, erfolgte anhand der generierten cDNA die spezifische Amplifikation der S100P DNA. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 30 ng des His-S100P WT-Konstruktes und als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA-Matrize erstellt.

Die Auswertung der RT-PCR zeigt, dass sowohl in der Positivkontrolle als auch im A431-Ansatz mithilfe der S100P WT-Primer ein ca. 300 bp großes DNA-Fragment amplifiziert wurde. Die Länge des amplifizierten DNA-Fragments entspricht der ermittelten Größe des S100P-DNA Fragments. Die Spezifität der Amplifizierung wird durch die Negativkontrolle

ohne DNA-Matrize bestätigt (siehe Abbildung 31). Dementsprechend konnte die Expression des endogenen S100P auch auf mRNA Ebene in den A431-Zellen nachgewiesen werden.

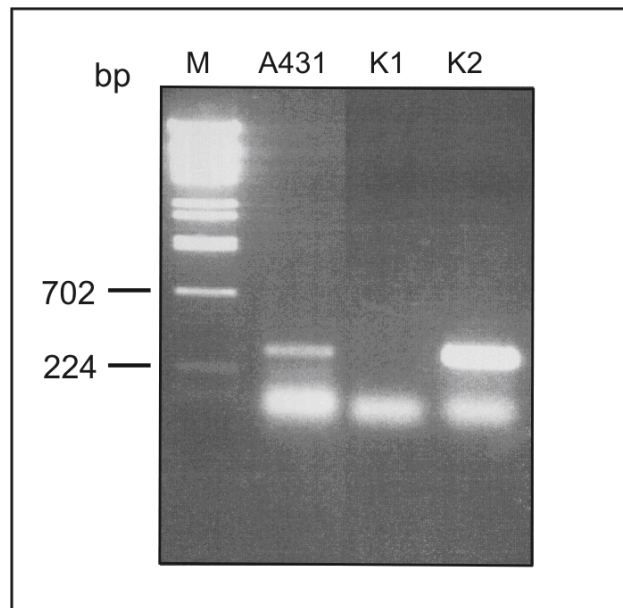


Abbildung 31: Nachweis von endogenem S100P in A431-Zellen auf mRNA-Ebene

Für die Amplifikation des S100P DNA-Fragments wurden 5 μ l cDNA (3.2.4) verwendet. Zur Kontrolle wurden zum einen 30 ng des His-S100P WT-Konstruktes (K2) eingesetzt und zum anderen ein Ansatz ohne cDNA-Matrize mitgeführt (K1). Es wurden jeweils 5 μ l der PCR-Ansätze (3.2.5.1) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Die RT-PCR-Analyse bestätigte die Expression des endogenen S100P in den A431-Zellen auf mRNA-Ebene.

4.4.2 Lokalisation von endogenem S100P und Ezrin in humanen Zelllinien

In den A431-Zellen konnte in vorhergehenden Untersuchungen nach der Induktion eines intrazellulären Ca^{2+} -Transienten mittels Ca^{2+} -Ionophor- oder Serum-Stimulation, eine signifikante Rekrutierung des endogenen Ezrins sowie eines GFP-fusionierten S100P WT Proteins in Mikrovilli-Strukturen nachgewiesen werden (Koltzsch *et al.*, 2003). Allerdings war bisher die Lokalisation von endogenem S100P nicht untersuchbar, da kein geeigneter S100P-Antikörper zum Nachweis des endogenen S100P Proteins in der Immunfluoreszenz zur Verfügung stand. Erst nach der Generierung eines monoklonalen S100P-Antikörpers konnte auch in der Immunfluoreszenz die Detektion des endogenen S100P Proteins erfolgen. Nachdem die Spezifität dieses Antikörpers sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch im Westernblot untersucht und bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt), konnte zum einen die Expression des endogenen S100P Proteins immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht und in Relation zur Ezrin Verteilung dargestellt werden.

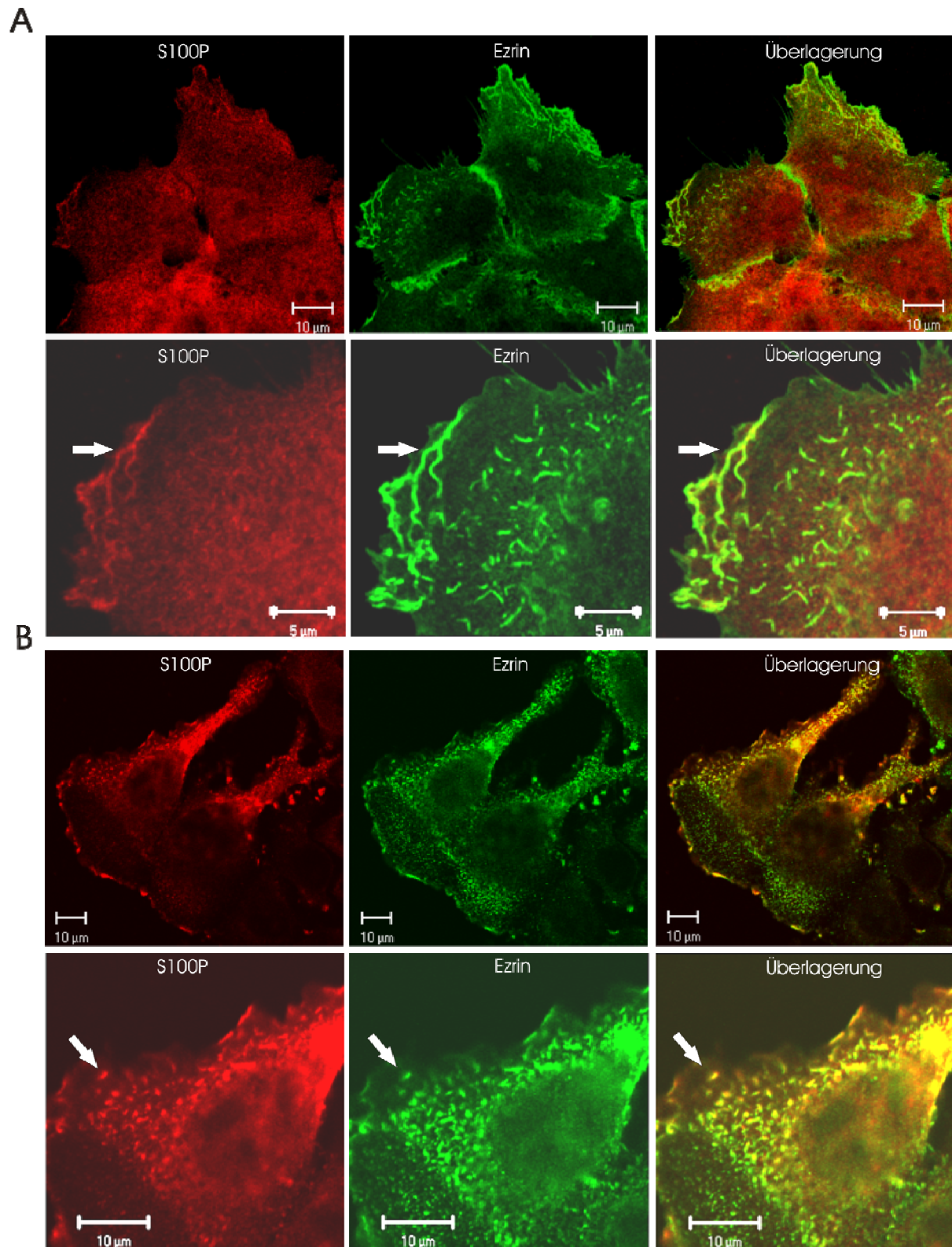


Abbildung 32: Expression und intrazelluläre Lokalisation von endogenem S100P und Ezrin in A431- und SKBR3-Zellen

Die A431- und SKBR3-Zellen wurden nach einer 24stündigen Serum-Depletion 30 min mit Serum-haltigem Medium stimuliert. Zur Detektion des endogenen S100P bzw. Ezrins wurden die Zellen mit einem monoklonalen S100P-Antikörper (S100P *ascitis*) sowie einem polyklonalen Ezrin-Antikörper gefärbt.

Die unteren Abschnitte der Figuren A und B zeigen eine Vergrößerung eines Teilausschnittes der oberen Bilder. Sowohl in A431- (A) und den SKBR3-Zellen (B) ist nicht nur eine Anreicherung des endogenen S100P sondern auch des endogenen Ezrins in Mikrovilli-ähnlichen Strukturen (s. Pfeile) feststellbar.

Neben A431-Zellen wurden auch SKBR3-Zellen zur Charakterisierung der Expression und Lokalisation des endogenen S100P Proteins verwendet, da die vorherigen biochemischen Analysen zur Expression des endogenen S100P Proteins zeigten, dass diese das höchste Expressionslevel aller untersuchter Zelllinien aufwiesen.

Zur Untersuchung der Lokalisation des endogenen S100P bzw. Ezrins wurden die A431- und SKBR3-Zellen nach einer 24stündigen Serum-Depletion für 30 min mit Serum stimuliert. Die Detektion von endogenem S100P erfolgte in beiden Zelllinien mittels des S100P *ascitis*-Antikörpers (rot), und die des endogenen Ezrin über einen spezifischen polyklonalen Ezrin-Antikörper (grün). Wie in Abbildung 32 erkennbar, ist die Expression des endogenen S100P mittels des S100P Antikörpers in beiden Zelllinien nachweisbar. Sowohl endogenes S100P als auch endogenes Ezrin weisen in stimulierten A431-Zellen neben einer zytosolischen Verteilung eine Anreicherung in Membranausstülpungen und Mikrovilli-Strukturen auf (siehe Abbildung 32.A). Darüber hinaus zeigen die Überlagerungen der beiden Färbungen, dass die beiden Proteine in diesen Mikrovilli-Strukturen kolokalisieren. Auch in den SKBR3-Zellen zeigen endogenes S100P und Ezrin neben einer zytosolischen Verteilung eine Akkumulation und Kolokalisation in Membranausstülpungen und Mikrovilli (siehe Abbildung 32.B).

Zusammengefasst bestätigen diese Daten die Expression des endogenen S100P Proteins in beiden Zelllinien. Darüberhinaus konnte eine Kolokalisierung von Ezrin und S100P in Mikrovilli-Strukturen beobachtet werden. Beide Beobachtungen stehen im Einklang mit den zuvor beschriebenen biochemischen Daten sowie den bereits veröffentlichten Ergebnissen mit ektopisch exprimierten S100P GFP-Fusionsproteine (Koltzsch, *et al.*, 2003).

4.5 Relevanz von Ca^{2+} für die S100P-Ezrin Interaktion

S100 Proteine spielen durch die Vermittlung von Ca^{2+} -Signalen sowohl intra- als auch extrazellulär eine wichtige Rolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, wie z.B. der Regulation des kortikalen Zytoskeletts (Donato, 2001; Heizmann *et al.*, 2002). Dies wird durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung spezifischer Effektorproteine erzielt. Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen führt dabei zu einer Konformationsänderung der S100 Proteine, die in der Exposition hydrophober Aminosäurereste an der Proteinoberfläche und der Freilegung einer hydrophoben Spalte resultiert, die wiederum die Interaktionsregion der S100 Proteine mit ihren Zielproteinen darstellt (Marenholz *et al.*, 2004). Eine Ausnahme unter den S100 Proteinen bildet das S100A10 Protein, das aufgrund der Substitution und Deletion mehrerer Aminosäuren inaktive EF-Hände besitzt. Auf diese Weise liegt S100A10 permanent in einer der aktiven Ca^{2+} -gebundenen Form ähnlichen Konformation vor (Rety *et al.*, 1999).

In vorangegangenen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass auch die Interaktion zwischen S100P und Ezrin Ca^{2+} -abhängig erfolgt und, dass eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in A431-Zellen zur Bildung Ezrin- und S100P-positiver Mikrovilli und Membranausstülpungen führt (Koltzschner *et al.*, 2003; siehe auch Abbildung 32). Um die Funktion des Ca^{2+} bei der Interaktion von S100P und Ezrin, sowie deren physiologische Relevanz eingehender untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein permanent aktives S100P Derivat (S100P pa) generiert, in dem die entsprechenden Aminosäuren der EF-Hände in Analogie zum S100A10 deletiert bzw. substituiert wurden (siehe Abbildung 19). Hierzu wurden zunächst die Aminosäuren 21 bis 23 der N-terminalen EF-Hand im S100P deletiert und in einem zweiten Schritt die Substitutionen N68C, Q72K und E77S mittels zielgerichteter Mutagenese eingefügt (3.2.10.3).

S100P	-----MTELETAM GMII DVFS RYSGSEGSTQTLTKGELKVLMEKELPGFLQS--GKDKD
S100P pa	-----MTELETAM GMII DVFS RYSG- - - STQTLTKGELKVLMEKELPGF LQS--GKDKD
S100A10	-----PSQMEHAM ETMMFTFHKFAG- - -DKGYLTKEDLRVLMEKEFPGFLEN—QKDPL
S100P	AVDKLLKDL DANGDAQVDFS EFI VFVAAITSACHKYFEKAGLK-----
S100P pa	AVDKLLKDL DACGDA KVDFS SFI VFVAAITSACHKYFEKAGLK-----
S100A10	AVDKIMKDL DQCRDG KVG FQ SFFSLI AGLTI ACNDYFVVHMKQKGKK

Abbildung 33: Aminosäuresequenzvergleich zwischen dem S100A10, S100P WT und dem S100P pa Protein

Zur Generierung eines permanent aktiven S100P Proteins (S100P pa) wurden in Anlehnung an das S100A10 Protein die Aminosäuren 21-23 der N-terminalen EF-Hand des S100P WT Proteins deletiert sowie die Aminosäuren 68, 72 und 77 der C-terminalen EF-Hand substituiert. Die vorgenommenen Veränderungen in der Aminosäuresequenz sind in grün und die innerhalb der S100-Proteinfamilie stark konservierten Aminosäurereste in rot dargestellt.

Um erste Hinweise auf die Konformation des S100P pa Proteins zu erhalten, wurden in Kooperation mit Yusuf Tutar (Universität Sivas, Türkei) und Günter Fritz (Universität Konstanz, Deutschland) 3D-Strukturmodelle des S100P pa Proteins erzeugt (siehe Abbildung 34). Die Überlagerung der repräsentativen Strukturmodelle der Ca^{2+} -gebundenen Form des S100P Proteins (grün) und des S100P pa Apoproteins (blau) zeigt, dass die Struktur des S100P pa Proteins der des Ca^{2+} -gebundenen S100P Proteins sehr ähnelt. Beide Modelle weisen eine Helix (rot dargestellt) zwischen den Helices F1 und E2 auf, die nur in der Ca^{2+} -gebundenen Konformation auftritt. Zudem zeigt sich eine übereinstimmende Anordnung der Helices E1, E2, F1 und F2.

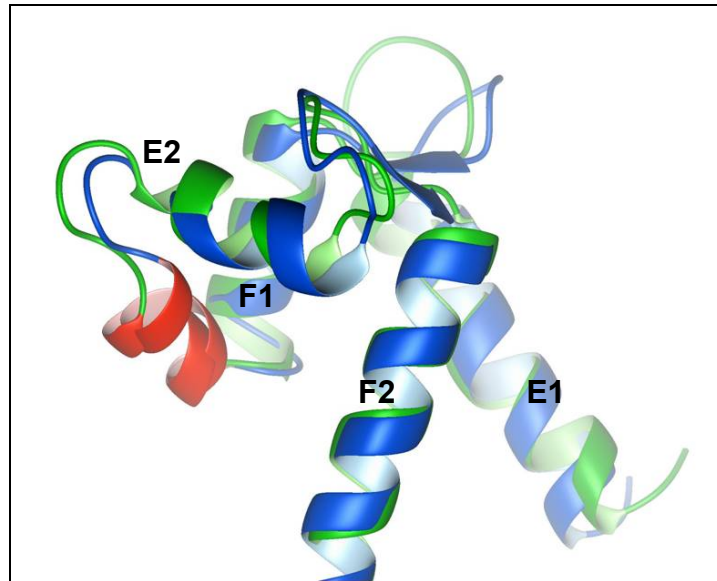


Abbildung 34: Das Ca^{2+} -geladene S100P WT Protein und das S100P pa Apoprotein weisen in Strukturmodellen eine sehr ähnliche 3D-Struktur auf

Die Überlagerung der repräsentativen Strukturmodelle des Ca^{2+} -geladenen S100P Proteins (grün) und des S100P pa Apoproteins (blau) zeigt, dass die Struktur des S100P pa Proteins der des Ca^{2+} -gebundenen S100P Proteins sehr ähnelt.

(Abbildung erstellt von Tutar Y, Universität Sivas, Türkei)

Zudem zeigt die theoretische Darstellung der Solvent-zugänglichen Oberfläche des S100P pa Homodimer-Modells, dass ähnlich wie im Ca^{2+} -gebundenen Zustand des S100P WT Proteins, ein Großteil der hydrophoben Aminosäuren (grün dargestellt) an der Oberfläche exponiert werden und dort auf diese Weise an ähnlichen Protein-Protein Kontakten beteiligt sein könnten (siehe Abbildung 35).

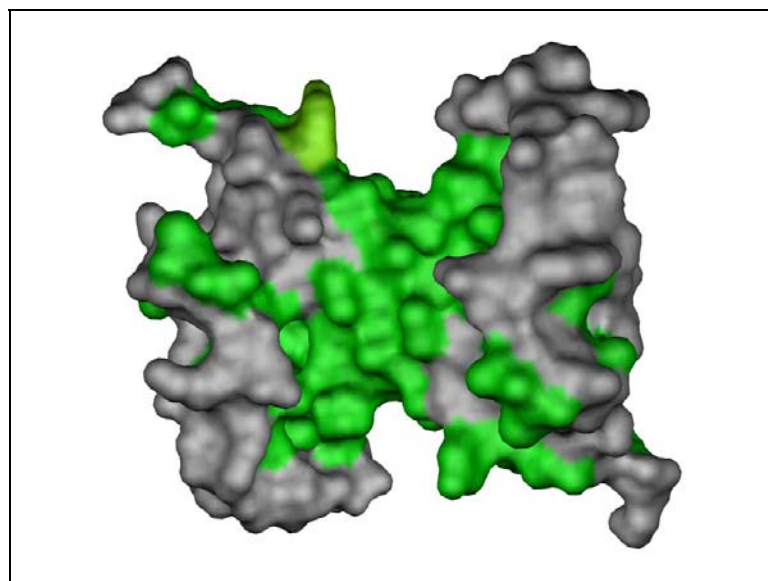


Abbildung 35: An der Oberfläche des S100P pa Homodimers befindet sich eine Vielzahl hydrophober Aminosäurereste

Im S100P pa Homodimer befindet sich ein Großteil der hydrophoben Aminosäuren (grün), ähnlich dem Ca^{2+} -gebundenen S100P WT Protein, an der Dimeroberfläche.

(Abbildung erstellt von Günter Fritz, Universität Konstanz)

Zusammengefasst zeigen die ersten theoretischen Strukturanalysen, dass die Konformation der permanent aktiven S100P pa Mutante der des Ca^{2+} -gebundenen S100P WT Proteins in für die Funktion entscheidenden Merkmalen ähnelt. Demnach ist es wahrscheinlich, dass auch das S100P pa Protein eine permanent aktive Konformation besitzt und somit seine Interaktionspartner Ca^{2+} -unabhängig binden kann. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden im Folgenden die Hydrophobizität, die Bindungseigenschaften an das Ezrin Protein sowie die intrazelluläre Lokalisation des S100P pa Proteins untersucht.

4.5.1 Rekombinante Expression des permanent aktiven S100P pa Proteins

Zur Untersuchung der Hydrophobizität und der Bindungseigenschaften des S100P pa Proteins wurde dieses zunächst rekombinant sowohl mit als auch ohne *Tag* in *E. coli* BL21(DE3) pLysS exprimiert. Die Proteinexpression wurde in beiden Fällen durch die Zugabe von IPTG induziert (3.4.5.1). Nach dem Zellaufschluss wurden die Bakterienlysate durch Zentrifugation geklärt und affinitätschromatographisch gereinigt. Hierzu wurde im Falle des His₆-fusionierten S100P pa Proteins eine Ni-NTA Matrix (3.4.5.2.A) und für das S100P pa Protein ohne *Tag* eine DEAE-Sephacel Matrix (3.4.5.2.C) verwendet. Von allen Fraktionen der Expression und Reinigung wurden Proben in einer SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 36).

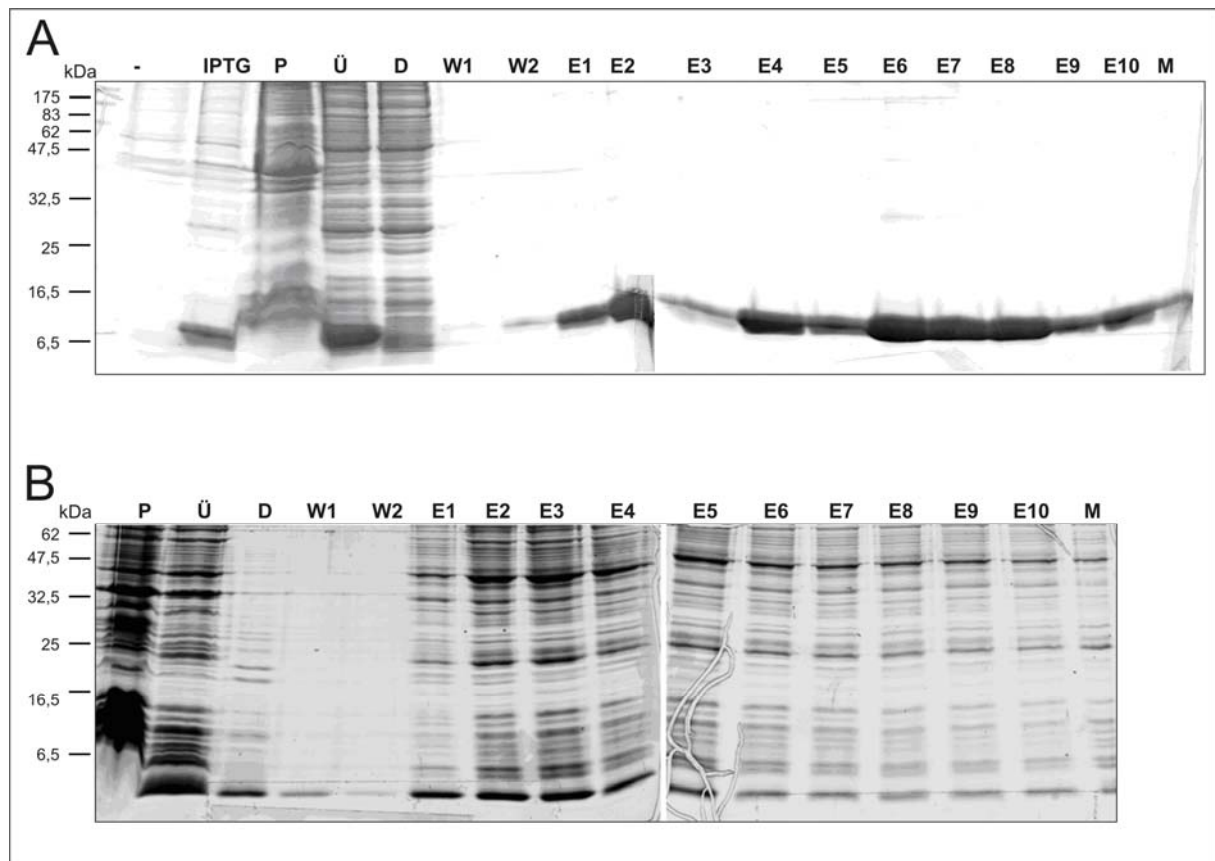


Abbildung 36: Rekombinante Expression des S100P pa His₆-Fusionsproteins und des „tagless“ S100P pa Proteins

Zur Untersuchung der Expression und Anreicherung des S100P pa und des S100P pa His₆-Fusionsproteins wurden jeweils 20 µl der entsprechenden Proben des Reinigungsprotokolls (3.4.5.1 und 3.4.5.2) sowie eine Matrix-Probe auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Anreicherung des S100P pa Proteins erfolgte an einer DEAE-Sephacel-Matrix (3.4.5.2.C) und die des His₆-fusionierten S100P pa Proteins an einer Ni-NTA-Matrix (3.4.5.2.A). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mittels Coomassie Brilliant Blue G250 Färbung detektiert.

A: His₆-S100P pa, **B:** Tag-loses S100P pa

-: vor der IPTG Induktion, **IPTG:** nach der IPTG Induktion; **P:** Pellet des ultrazentrifugierten Bakterienlysats, **Ü:** Überstand des ultrazentrifugierten Bakterienlysats, **D:** Durchfluss der Bindung an die Matrix, **W1-2:** Waschfraktionen der Protein-gebundenen Matrix, **E1-10:** Elutionsfraktionen, **M:** Matrix

Das ca. 10 kDa große His₆-fusionierte S100P pa Protein wird nach der Induktion mit IPTG in großen Mengen als lösliches Protein (Ü) exprimiert (siehe Abbildung 36.A). So ist in der Fraktion des Überstands nach der Zentrifugation bei 100000 g, neben einer Reihe anderer bakterieller Proteine, eine verstärkte 10 kDa Bande erkennbar, die dem Molekulargewicht des His₆-fusionierten S100P pa Proteins entspricht. Das lösliche S100P pa Protein konnte an einer Ni-NTA-Matrix angereichert und bakterielle Verunreinigungen durch zweimaliges Waschen erfolgreich entfernt werden (W1-W2). Im Anschluss erfolgte die Elution des gebundenen S100P pa His₆-Fusionsproteins. In den Elutionsfraktionen (E1-E10) sind neben dem 10 kDa großen S100P pa Protein keine Verunreinigungen oder proteolytischer Proteinabbau detektierbar.

Die Analyse der Expression und Aufreinigung des S100P pa Proteins ohne *Tag* (siehe Abbildung 36.B) zeigt, dass das ca. 10 kDa große S100P pa Protein nach Induktion mit IPTG ebenfalls als lösliches Protein (Ü) exprimiert wird. Dieses Protein wurde im Anschluss an eine DEAE-Sephacel Matrix gebunden, um bakterielle Verunreinigungen zu entfernen. Die Proben des Durchlaufs (D) und der Waschfraktionen (W1-W2) zeigen jedoch, dass das *Tag*-lose S100P pa Protein nicht vollständig an die Matrix gebunden wurde und sich in diesen Fraktionen große Mengen ungebundenen Proteins befanden. In den Elutionsfraktionen (E1-E10) dagegen ist das S100P pa Protein nur in geringerem Maße enthalten. Die Elutionsfraktionen weisen zudem einen höheren Grad an bakteriellen Verunreinigungen auf, als die vorherigen Waschfraktionen und der Durchfluss. Aus diesem Grund erfolgte eine weitere Aufreinigung der Wasch- und Durchflussfraktionen durch die Arbeitsgruppe von G. Fritz.

4.5.2 Hydrophobe Eigenschaften des S100P pa Proteins

Die Bindung von Ca^{2+} ruft in S100 Proteinen eine Konformationsänderung hervor, die zu einer Exposition hydrophober Aminosäurereste führt und somit die Interaktion mit spezifischen Bindungspartnern ermöglicht (Marenholz *et al.*, 2004). Daher weisen S100 Proteine in ihrer Ca^{2+} -gebundenen aktiven Form eine höhere Hydrophobizität auf, als in der entsprechenden Ca^{2+} -freien Konformation. Das Ausmaß der Hydrophobizität erlaubt demnach Rückschlüsse auf den Konformationszustand des Proteins zu ziehen.

Die Hydrophobizität des S100P pa Proteins wurde im Rahmen dieser Arbeit über die Bindungseigenschaften des *Tag*-losen S100P pa Proteins an eine Phenyl-Sepharose-Matrix (HIC-Chromatographie) untersucht (3.4.8). Zur Kontrolle wurden die Versuche sowohl in Gegenwart von Ca^{2+} als auch von EGTA durchgeführt und parallele Ansätze mit dem *Tag*-losen S100P WT Protein erstellt. Die Proteine wurden in der Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} /EGTA an die Phenyl-Sepharose-Matrix gebunden. Nach 30minütiger Inkubation wurden nicht gebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt, die Phenyl-Sepharose-Matrix in SDS-Probenpuffer erhitzt und abschließend alle Fraktionen im Westernblot (3.4.4) analysiert.

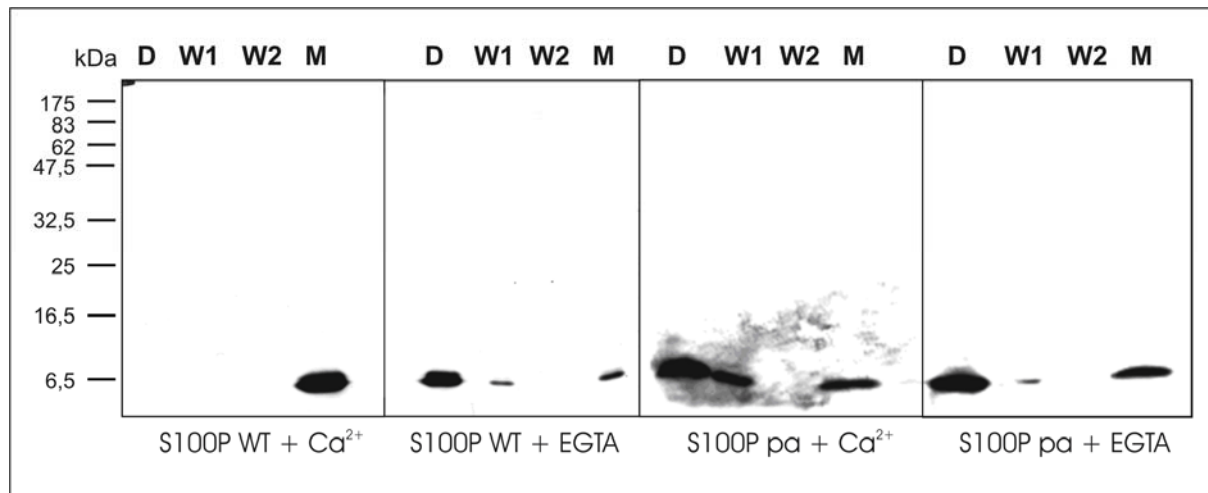


Abbildung 37: Das S100P pa Protein besitzt Ca^{2+} -unabhängige hydrophobe Eigenschaften

Die Hydrophobizität des S100P pa Moleküls wurde über dessen Bindungseigenschaften an eine Phenyl-Sepharose-Matrix untersucht. Hierzu wurde dialysiertes S100P WT und S100P pa Protein auf 5 mM EGTA oder Ca^{2+} eingestellt und mit einer Phenyl-Sepharose-Matrix inkubiert. Der Durchfluss (D) wurde gesammelt und nach mehrmaligem Waschen (W1 und W2) wurden Proben sämtlicher Fraktionen und der Matrices (M) entnommen. Diese wurden auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot analysiert. Die S100P-Proteine wurden durch einen monoklonalen S100P Antikörper (S100P R&D) nachgewiesen.

Die Westernblot Analyse zeigt, dass nur das S100P pa Protein in der Abwesenheit von Ca^{2+} ausreichend hydrophob ist, um signifikant an die Phenyl-Sepharose-Matrix zu binden.

In der Gegenwart von Ca^{2+} bindet, erwartungsgemäß, sowohl S100P WT als auch S100P pa an die Phenyl-Sepharose-Matrix (M, siehe Abbildung 37). Im Falle des S100P WT Proteins ist hierbei eine vollständige Bindung an die Matrix zu beobachten, da sich in den Fraktionen des Durchlaufs (D) sowie in den Waschfraktionen (W1-W2) kein ungebundenes Protein nachweisen lässt. Die unvollständige Bindung des S100P pa Proteins an die Matrix ist vermutlich auf eine Überladung der Phenyl-Sepharose Matrix mit dem S100P pa Protein zurückzuführen. Vorhergehende Experimente zeigten, dass die monoklonalen S100P-Antikörpern (S100P *ascitis* und S100P R&D) eine geringere Affinität zu dem S100P pa als zu dem S100P WT Protein besitzen. Daher ist im Westernblot generell das Signal des S100P pa geringer als das des S100P WT Proteins. In Abbildung 37 sind die Intensitäten der Signale beider Proteine jedoch annähernd gleich und demnach wäre es gut möglich, dass für die *in vitro* Bindungsstudie eine größere Menge S100P pa Protein eingesetzt und die Phenyl-Sepharose-Matrix überladen wurde.

Die Ansätze mit EGTA zeigen, dass das S100P WT Protein im Ca^{2+} -ungebundenen Zustand nicht hydrophob genug ist, um in einem signifikanten Ausmaß an die Phenyl-Sepharose (M) zu binden. Ca. 90 % des eingesetzten Proteins befinden sich in den Durchfluss- (D) und Waschfraktionen (W1-W2). Die geringe Menge S100P WT Protein in der Matrixfraktion ist vermutlich auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen. Im Vergleich dazu zeigt das S100P pa Protein im EGTA enthaltenden Ansatz eine stärkere Bindung an die Phenyl-

Sepharose Matrix (M). Ca. 50 % der eingesetzten Proteinmenge befindet sich in der Matrixfraktion während das restliche Protein im Durchfluss (D) und in der ersten Waschfraktion (W1) zu finden ist. Dies ist vermutlich wie auch im Ca^{2+} -Ansatz, auf eine Überladung der Phenyl-Sepharose-Matrix zurückzuführen. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse des Hydrophobizitätstest, dass das S100P pa Protein im Gegensatz zum S100P WT Protein in der Lage ist, sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit von Ca^{2+} gleichermaßen über hydrophobe Wechselwirkungen an die Phenyl-Sepharose zu binden. Dies unterstützt die Hypothese, dass S100P pa eine, dem S100 A10 ähnliche, permanent aktive Konformation besitzt.

4.5.3 *In vitro* Bindungsstudien

Zur detaillierteren Untersuchung der S100P pa Konformation wurden *in vitro* Bindungsstudien mit der N-ERMAD Domäne von Ezrin durchgeführt (3.4.7.2). In vorherigen Studien wurde bereits die Ca^{2+} -abhängige Interaktion des S100P WT Proteins mit der N-ERMAD Domäne von Ezrin beschrieben. Eine Bindung des S100P pa Proteins an die N-ERMAD Domäne in Abwesenheit von Ca^{2+} würde demnach die Annahme unterstützen, dass das S100P pa in einer Ca^{2+} -unabhängigen permanent aktiven Konformation vorliegt.

Für die *in vitro* Bindungsstudien wurden Affinitätssäulen mit immobilisiertem GST-N-ERMAD verwendet und parallele Ansätze mit 0,5 mM CaCl_2 und 1 mM EGTA erstellt. Das His₆-S100P pa und das als Kontrolle eingesetzte His₆-S100P WT Protein wurden mehrmals über die Affinitätssäulen gegeben und ungebundene Proteine zunächst durch intensives Waschen entfernt, bevor letztendlich die Elution der gebundenen Proteine mit einem EGTA-Puffer erfolgte. Sämtliche Fraktionen der *in vitro* Bindungsstudien wurden im Westernblot (3.4.4) untersucht.

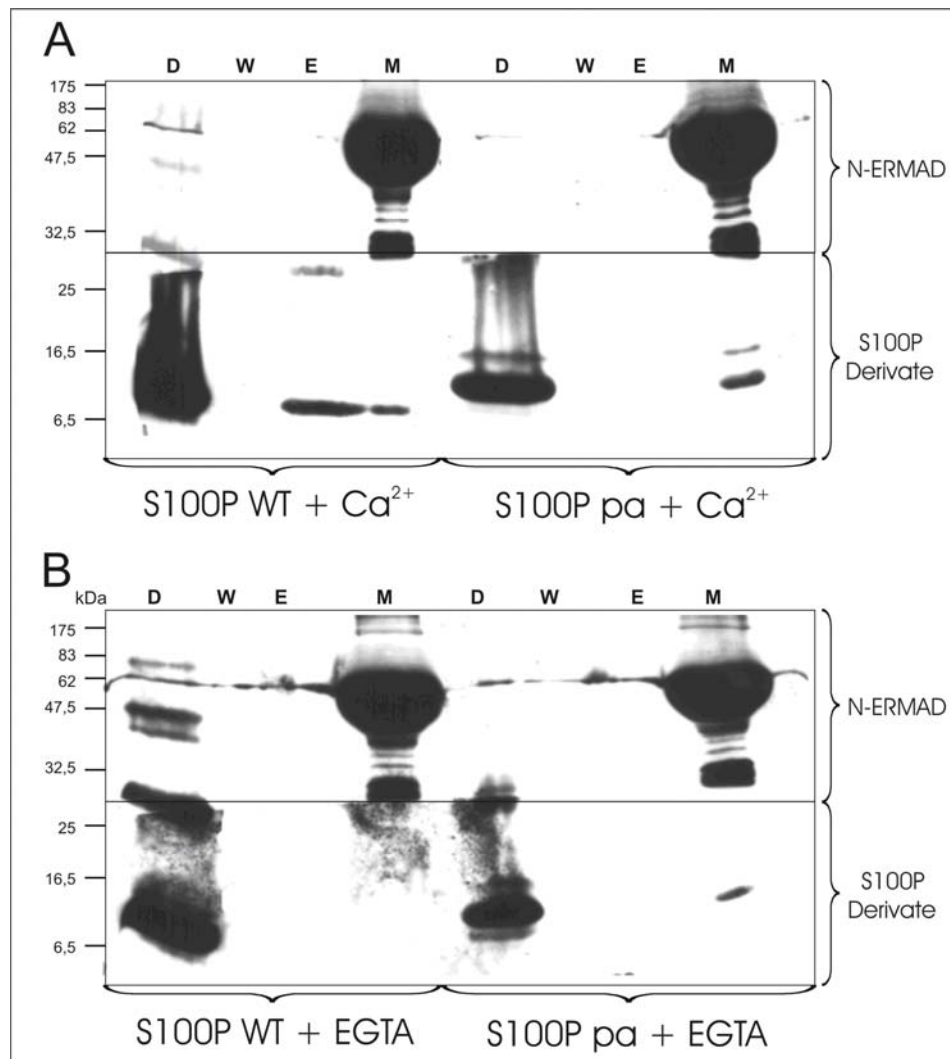


Abbildung 38: Die Interaktion des S100P pa Proteins mit der N-ERMAD Domäne von Ezrin erfolgt Ca^{2+} -unabhängig

Für die Analyse der Ca^{2+} -Abhängigkeit der S100P pa-Ezrin Interaktion wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Hierzu wurde GST-N-ERMAD Protein an einer Glutathion-Sepharose 4B Matrix immobilisiert. Anschließend wurde das His₆-S100P WT und His₆-S100P pa Protein in der Flüssigphase hinzugefügt und eine Probe der ungebundenen S100P Proteine im Durchfluss (D) genommen. Die Bindungsstudien wurden mit 0,5 mM $CaCl_2$ oder 1 mM EGTA durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen (W) wurden die Ca^{2+} -abhängig gebundenen Proteine mit einem EGTA enthaltenden Puffer eluiert (E) und eine Probe von der Protein-gebundenen Matrix (M) entnommen. Äquivalente Mengen sämtlicher Fraktionen wurden auf eine 15 %ige SDS-PAGE aufgetragen und im Westernblot analysiert. Die S100P-Proteine wurden durch einen monoklonalen S100P-Antikörper (S100P *ascitis*) und das N-ERMAD GST-Fusionsprotein über einen monoklonalen GST-Antikörper nachgewiesen. Sowohl in den S100P WT als auch in dem S100P pa Ansatz sind in den S100P-Protein enthaltenden Fraktionen neben den für die S100P-Proteine zu erwartenden 10 kDa großen Banden auch höhermolekulare Banden von ca. 20-30 kDa detektierbar, bei denen es sich vermutlich um dimere Strukturen der S100P Proteine handelt.

Die *in vitro* Bindungsstudien zeigen, dass nur das S100P pa Protein auch in Abwesenheit von Ca^{2+} eine Konformation besitzt, in der es an das N-ERMAD Protein zu binden vermag.

Die Westernblot Analyse zeigt wie bereits beschrieben (Koltzsch *et al.*, 2003), dass eine Bindung des His₆-S100P WT Proteins an die immobilisierte N-ERMAD Domäne nur in Gegenwart von Ca^{2+} erfolgt. So befindet sich in dem EGTA-enthaltendem Ansatz das gesamte His₆-S100P WT Fusionsprotein in der Durchflussfraktion (D) und es erfolgt keine

Bindung an die N-ERMAD-Matrix (M, siehe Abbildung 38). Hingegen zeigt der Ca^{2+} -enthaltende Ansatz, dass in Gegenwart von Ca^{2+} eine Bindung des His₆-S100P WT Fusionsproteins an die N-ERMAD-Matrix erfolgt. So konnte ein wesentlicher Teil des gebundenen His₆-S100P WT Proteins mittels des EGTA-Puffers eluiert werden (E). Allerdings erfolgte keine vollständige Elution des gebundenen His₆-S100P WT Fusionsproteins, was möglicherweise auf einer zu geringen Inkubationsdauer mit dem EGTA-Puffer oder aber einem zu geringen Elutionsvolumen beruht. Zudem befindet sich ein Teil des S100P WT Proteins in der Durchflussfraktion (D), was möglicherweise auf eine Überladung der Affinitätssäule beruht. Eventuell wurde zu wenig Matrix für die *in vitro* Bindungsstudien eingesetzt.

Im Gegensatz zu dem His₆-S100P WT Protein scheint die Bindung des His₆-S100P pa Proteins an die N-ERMAD Domäne von Ezrin unabhängig von Ca^{2+} zu erfolgen, da sowohl im Ca^{2+} -enthaltenden als auch dem Ca^{2+} -freien Ansatz eine Bindung des His₆-S100P pa Proteins an die N-ERMAD Domäne festzustellen ist.

Zwar befindet sich in beiden Ansätzen ungebundenes S100P pa Protein in den Durchflussfraktionen (D), allerdings scheint dieses ebenfalls teilweise auf einer Überladung der Säulen zu beruhen. Dessen ungeachtet befindet sich in beiden Ansätzen gebundenes His₆-S100P pa Protein in der Matrixfraktion (M), was dafür spricht, dass das S100P pa Protein unabhängig von Ca^{2+} an die N-ERMAD Domäne zu binden vermag. Das gebundene His₆-S100P pa Protein konnte nicht mittels EGTA-Puffer eluiert werden. Dies bestärkt die Annahme, dass die Interaktion des S100P pa Proteins mit der Ezrin N-ERMAD Domäne tatsächlich unabhängig von Ca^{2+} erfolgt.

Zusammengefasst legen die bisherigen Untersuchungen zur Konformation des S100P pa Proteins und seines Bindungsverhaltens den Schluss nahe, dass sich dieses tatsächlich in einer der S100A10 analogen permanent aktiven Konformation befindet.

4.5.4 Ektopische Expression und subzelluläre Lokalisation des S100P pa Fusionproteins in A431 Zellen.

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation des S100P pa Proteins sowie der S100P pa-Ezrin Interaktion *in vivo* wurden A431- und HeLa-Zellen transient mit einem GFP-S100P pa Konstrukt transfiziert. In A431-Zellen konnte bereits die Calcium-abhängige Rekrutierung des S100P in Calcium induzierte Membranausstülpungen (Mikrovilli) gezeigt werden, die vermutlich auf eine Calcium-abhängige Interaktion von S100P und Ezrin in den Mikrovilli zurückzuführen ist (Koltzsch *et al.*, 2003, siehe auch Abbildung 32). Den

vorherigen Ergebnissen zufolge wäre für das S100P pa GFP-Fusionsprotein eine Calcium-unabhängige Rekrutierung in die Mikrovilli zu erwarten.

Als am besten geeignete Transfektionsmethode für die A431-Zellen erwies sich die Nukleofektion (3.3.7.2.B), durch die eine Expressionsrate von ca. 5 % erzielt wurde. Zur Kontrolle wurden A431-Zellen in einem parallelen Ansatz mit einem GFP-S100P WT-Konstrukt transfiziert.

Nach 24stündiger Expression des GFP-S100P WT/ pa Fusionsproteins wurden die A431-Zellen Serum-depletiert, um eine Induktion intrazellulärer Calcium-Transienten und infolgedessen Calcium induzierter Membranausstülpungen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen fixiert und endogenes Ezrin mit einem polyklonalen Ezrin Antikörper nachgewiesen.

Wie in Abbildung 39.B erkennbar, weist das als Kontrolle eingesetzte GFP-fusionierte S100P WT Protein in den Serum-depletierten A431-Zellen eine zytosolische Verteilung auf und scheint nur an vereinzelt Stellen in länglichen Membranausstülpungen angereichert zu sein. Auch das endogene Ezrin scheint hauptsächlich zytosolisch verteilt und nur geringfügig in Mikrovilli-ähnlichen Membranstrukturen vorhanden zu sein. So ist nur eine sehr geringe Kollokalisierung des endogenen Ezrins und des S100P WT GFP-Fusionsproteins innerhalb der Membranausstülpungen erkennbar. Demnach scheint die Rekrutierung des GFP-fusionierten S100P WT und des endogenen Ezrin Proteins in die Mikrovilli-Strukturen der A431-Zellen von einer Stimulation und der sich daraus ergebenden transienten intrazellulären Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration abhängig zu sein.

Im Gegensatz zum S100P WT ist das S100P pa GFP-Fusionsprotein in den Serum-depletierten A431-Zellen nicht ausschließlich zytosolisch verteilt sondern vermehrt in Mikrovilli-ähnlichen Membranstrukturen angereichert (siehe Abbildung 39.A). Zudem ist auch das endogene Ezrin in diesen Membranstrukturen lokalisiert und weist eine eindeutige Kollokalisierung zu dem S100P pa GFP-Fusionsprotein auf. Demzufolge scheint die Rekrutierung des S100P pa Proteins in die Membranausstülpungen unabhängig von einer transienten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu erfolgen. Dies deckt sich mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen biochemischen Daten (siehe 4.5.2 und 4.5.3) und bestätigt wiederum die Hypothese, dass sich das S100P pa Protein durch die gezielten Veränderungen innerhalb der EF-Hände, in einer permanent aktiven und Ca^{2+} -unabhängigen Konformation befindet.

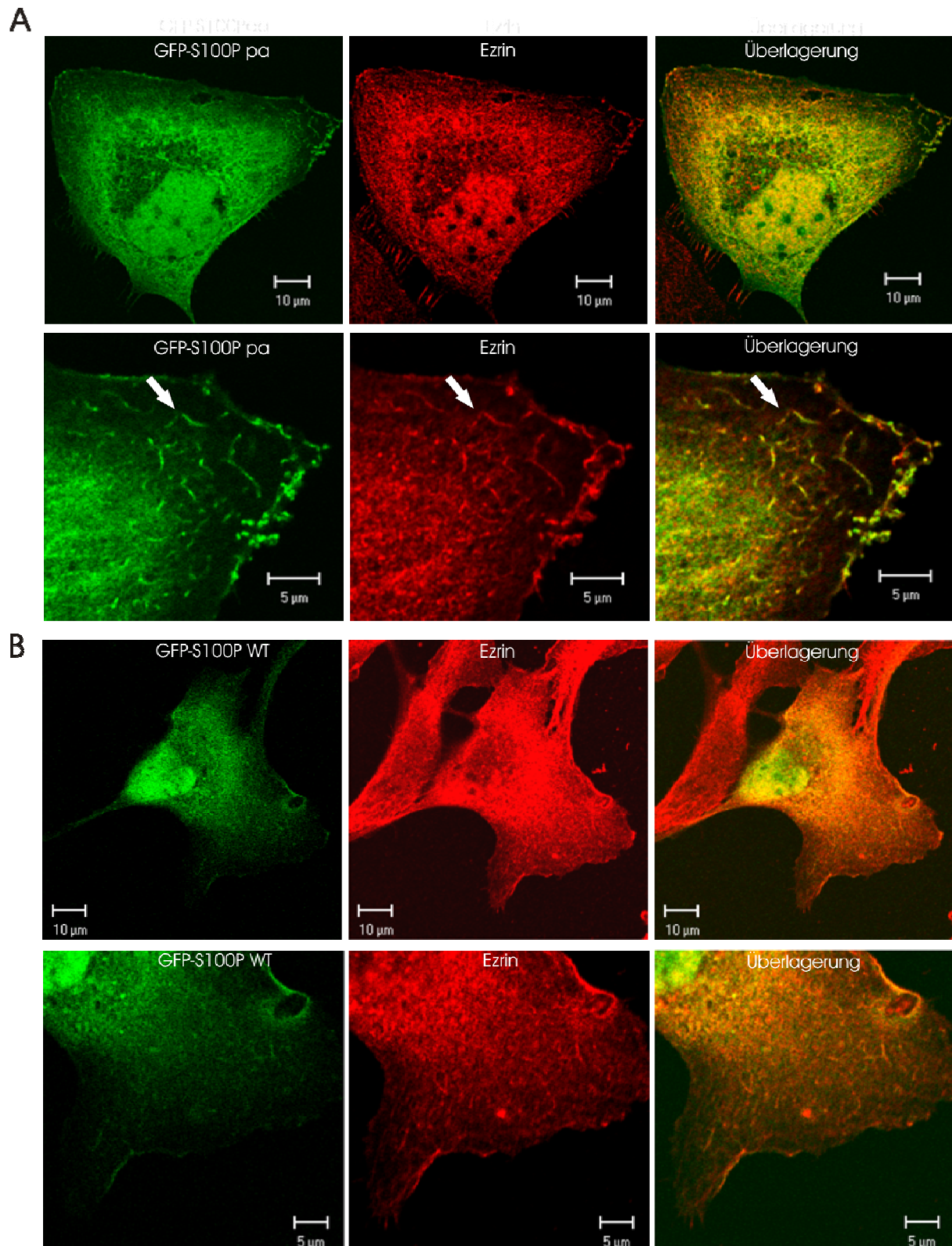


Abbildung 39: Das GFP-S100P pa Protein und das endogene Ezrin sind in Serum-depletierten A431-Zellen in Mikrovilli-ähnlichen Membranstrukturen lokalisiert

Die A431-Zellen wurden mit dem N-terminal fusionierten GFP-S100P WT- bzw. GFP-S100P pa-Konstrukt mittels Nukleofektion transient transfiziert (grün). Nach 24stündiger Expression wurden die Zellen 24 Stunden Serum-depletiert und mit PFA fixiert. Zur Detektion des endogenen Ezrins wurden die Zellen mit einem polyklonalen Ezrin Antikörper und einem TexasRed gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (rot). Die unteren Abschnitte der Figuren A und B zeigen eine Vergrößerung eines Teilausschnittes der oberen Bilder.

Im Gegensatz zum S100P WT Protein (B) ist im Falle des S100P pa Proteins (A) eine Anreicherung des GFP-Fusionsproteins und des endogenen Ezrins in Mikrovilli-ähnlichen Strukturen (s. Pfeile) feststellbar.

Zur weiteren Analyse der Ca^{2+} -unabhängigen Rekrutierung wurde darüber hinaus auch die Lokalisation des S100P pa in HeLa-Zellen untersucht (siehe Abbildung 40). Die HeLa-Zellen zeigten nach der Transfektion mittels Effectene (3.3.7.1.A) eine Transfektionsrate von ca. 40 %. Nach 24stündiger Expression des GFP-S100P WT/ pa Fusionsproteins wurden die HeLa-Zellen fixiert und endogenes Ezrin mit einem monoklonalen Ezrin Antikörper nachgewiesen. Da für HeLa-Zellen bisher keine Ca^{2+} -induzierte Ausbildung von Mikrovilli-ähnlichen Membranstrukturen beschrieben wurde, erfolgte hier keine Serum-Depletion des Kulturmediums.

Wie in Abbildung 40.B zu erkennen ist, zeigen das S100P WT GFP-Fusionsprotein und das endogene Ezrin in den HeLa-Zellen eine hauptsächlich zytosolische Verteilung. Im Gegensatz dazu zeigt das S100P pa GFP-Fusionsprotein zusätzlich eine verstärkte Lokalisation an der Plasmamembran (siehe Abbildung 40.A). Auch das endogene Ezrin scheint nicht nur ausschließlich zytosolisch verteilt sondern ebenfalls an der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien zeigen demnach, dass das S100P pa GFP-Fusionsprotein im Gegensatz zum S100P WT Protein Ca^{2+} -unabhängig an die Plasmamembran transloziert.

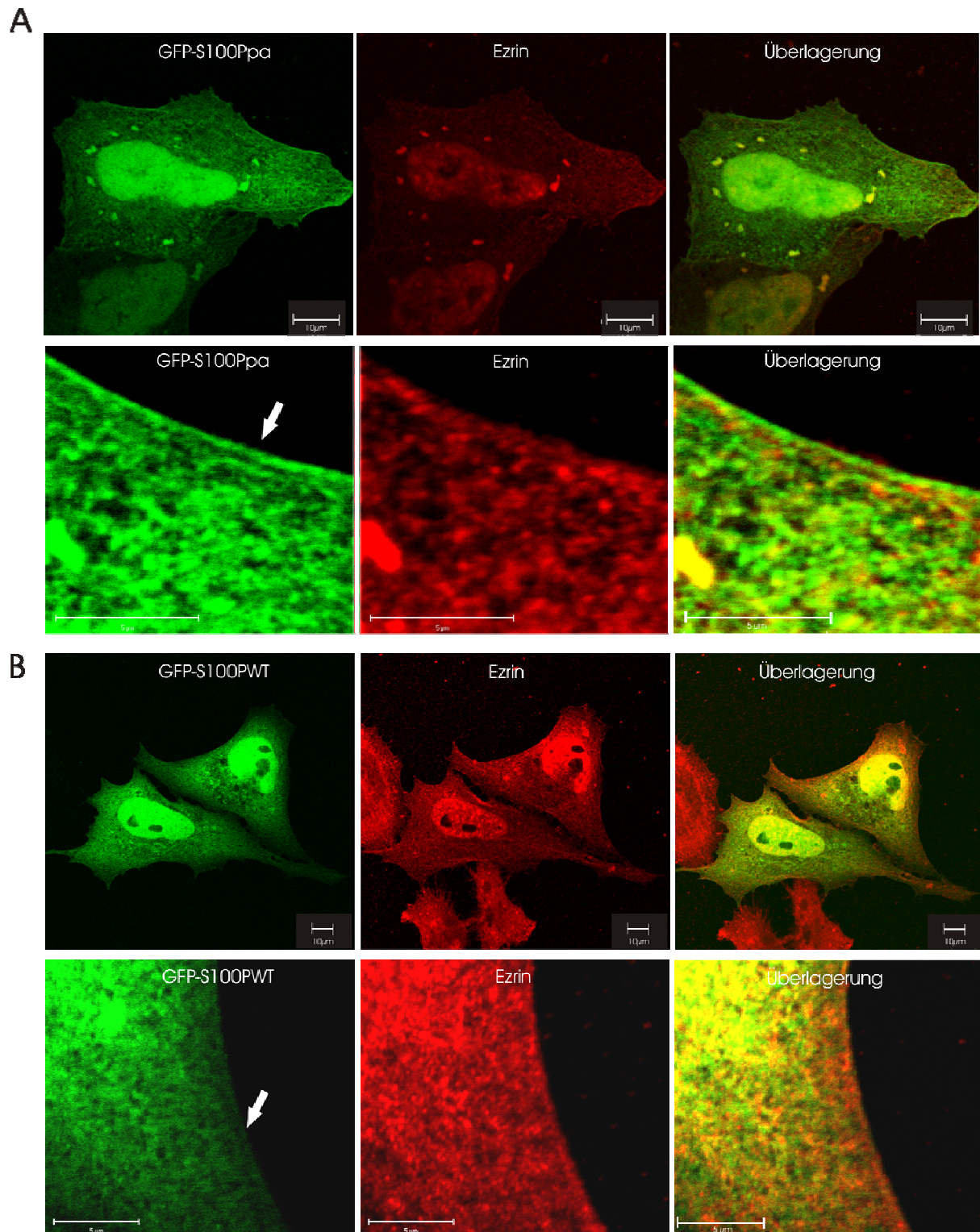


Abbildung 40: Das S100P pa GFP-Fusionsprotein zeigt eine verstärkte Plasmamembranfärbung in HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen wurden mit dem N-terminal fusionierten GFP-S100P WT- und GFP-S100P pa-Konstrukt mittels Effectene transient transfiziert (grün) und nach einer 24stündigen Expression mit PFA fixiert. Zur Detektion des endogenen Ezrins wurden die Zellen mit einem polyklonalen Ezrin Antikörper und einem TexasRed gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (rot). Die unteren Abschnitte der Figuren A und B zeigen eine Vergrößerung eines Teilausschnittes der oberen Bilder.

Im Gegensatz zum S100P WT (B) ist im Falle des S100P pa Proteins (A) eine stärkere Membranfärbung (s. Pfeile) erkennbar.

Die durchgeführten *in silico* Strukturanalysen, die Untersuchung der Hydrophobizität und die *in vitro* Bindungsstudien zeigen, dass S100P pa auch in Abwesenheit von Ca^{2+} eine Tertiärstruktur besitzt, in der hydrophobe Aminosäuren an der Proteinoberfläche exponiert werden, und die somit eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung an Effektorproteine ermöglicht. Desweiteren scheint die intrazelluläre Lokalisation des S100P pa GFP-Fusionsproteins der, durch einen Ca^{2+} -Transienten induzierten Rekrutierung des S100P WT GFP-Fusionsproteins zu entsprechen. Daher scheint das S100P pa Protein tatsächlich Ca^{2+} -unabhängig eine dem S100A10 Protein analoge permanent aktive Konformation zu besitzen.

5. Diskussion

Die ausschließlich in Vertebraten vorkommenden S100 Proteine fungieren als Ca^{2+} -Sensoren und regulieren verschiedenste intra- und extrazelluläre Prozesse. Die meisten Interaktionen der S100 Proteine erfolgen Ca^{2+} -abhängig wobei die Bindung von Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung der S100 Proteine führt, die es ihnen ermöglicht mit ihren Bindungspartnern zu interagieren. Ein Ca^{2+} -abhängiger Interaktionspartner des S100P ist Ezrin. Ezrin ist ein Mitglied der ERM-Proteinfamilie das vor allem in Epithelien exprimiert wird und dort an der Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett beteiligt ist (Berryman, *et al.*, 1993). Ezrin kann in der Zelle in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. In der als „ruhend“ bezeichneten Konformation sind durch intramolekulare Wechselwirkungen die meisten Bindungsstellen des Ezrins maskiert. Die Bindung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und Phosphorylierung eines C-terminalen Threoninrestes führen zu einer Aktivierung des Ezrins, die in einer Freisetzung der intramolekularen Maskierung resultiert, so dass Ezrin u.a. mit Aktinfilamenten und Transmembranproteinen interagieren kann (Matsui *et al.*, 1998; Simons *et al.*, 1998). Die Bindung von S100P führt ebenfalls zu einer Aktivierung von Ezrin, die es befähigt mit Aktinfilamenten zu interagieren (Koltzsch *et al.*, 2003). Basierend auf diesen Resultaten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ezrin-S100P Interaktion eingehender untersucht, um detailliertere Informationen über die Funktion dieser Proteine an der Membran-Zytoskelett Grenzfläche zu erhalten. Demzufolge wurde zunächst ein zelluläres Modellsystem für die Analyse der Interaktion *in vivo* charakterisiert. Zur detaillierteren Analyse der S100P-Ezrin Interaktion wurde anschließend mittels *in vitro* Bindungsstudien das S100P-Ezrin Interaktionsmotiv kartiert und die S100P-vermittelte Aktivierung des Ezrins eingehender untersucht. Hierzu wurde ein Vergleich zur Aktivierung über die $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Bindung erstellt, sowie die Relevanz von Ca^{2+} für die Interaktion und Aktivierung betrachtet.

Abschließend wurde die physiologische Bedeutung der S100P-Ezrin Interaktion untersucht. S100P und Ezrin sind nicht nur an einer Vielzahl an migratorischen Prozessen beteiligt, sondern sind auch in vielen humanen Krebsarten überexprimiert, so dass außerdem die Bedeutung der S100P-Ezrin Interaktion für die Tumorzellmigration analysiert wurde.

5.1 Expression und Lokalisation von endogenem S100P und Ezrin in humanen Zelllinien

Für die Etablierung eines zellulären Modellsystems zur Charakterisierung der S100P-Ezrin Interaktion wurde zunächst die Expression des endogenen S100P Proteins in verschiedenen Zelllinien untersucht. S100 Proteine werden ausschließlich in Vertebraten exprimiert und weisen eine spezifische, nur teilweise überlappende Gewebeverteilung auf. S100P wurde erstmals aus humaner Plazenta isoliert. Das S100P Gen wird in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert. Eine erhöhte Expression wurde neben der Plazenta auch in der Lunge, dem Skelettmuskel, dem Herzen, der Milz und in Leukozyten festgestellt (Becker *et al.*, 1992; Donato, 2001). Viele S100 Proteine werden verstärkt in unterschiedlichen Krebsstadien und Tumorarten exprimiert (Übersicht in Marenholz *et al.*, 2004). Auch im Falle des S100P wurde eine erhöhte Expression in Karzinomen, u.a. in Lungen- und Mammakarzinomen, beschrieben (Diederichs *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2001). Daher wurde die Expression des endogenen S100P sowohl in den Krebszelllinien HTB58, HeLa und SKBR3 als auch in der humanen Plattenepithelzelllinie A431 untersucht. Die Untersuchungen der Expression des endogenen S100P auf Proteinebene zeigten, dass in allen untersuchten Zelllinien das endogene Protein nur geringfügig exprimiert wird. Mit Ausnahme der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 musste zur zweifelsfreien Detektion im Westernblot zunächst eine Anreicherung an einer Phenyl-Sepharose-Matrix erfolgen. Für die A431-Zelllinie wurde selbst nach dieser Anreicherung die Expression des endogenen S100P Proteins nicht eindeutig und allenfalls in nur sehr geringen Mengen nachgewiesen (siehe Abbildung 30). Möglicherweise beruht die schlechte Detektion des endogenen S100P Proteins nicht nur auf einer niedrigen Proteinexpression sondern auch darauf, dass der hier eingesetzte monoklonale S100P Antikörper das endogene S100P Protein nicht effizient erkennt. So zeigte sich, dass dieser Antikörper rekombinantes His₆-fusioniertes S100P Protein besser erkennt als nicht fusioniertes S100P Protein. Dies ist gegebenenfalls darauf zurückzuführen, dass bei der Antikörperherstellung zur zweiten Immunisierung His₆-fusioniertes S100P Protein verwendet wurde. So besteht die Möglichkeit, dass dieser Antikörper ein Epitop erkennt, das sich aus Teilen des His₆-Tags und den N-terminalen Aminosäureresten des S100P zusammensetzt. Andererseits könnte das His₆-fusionierte Protein eine Konformation besitzen, in der das Epitop für den S100P Antikörper leichter zugänglich ist.

Für die A431-Zelllinie wurde im Zusammenhang mit der Stimulierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren eine Umverteilung von Ezrin in Mikrovilli-ähnliche Strukturen beschrieben (Bretscher, 1989). Demzufolge eignen sich diese Zellen besonders zur Charakterisierung der

S100P vermittelten Aktivierung, weshalb die Expression des endogenen S100P zusätzlich auf mRNA-Ebene überprüft und bestätigt wurde (siehe Abbildung 31). Demnach scheint in allen untersuchten Zelllinien das endogene S100P, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, exprimiert zu werden. Da die SKBR3 Zellen das höchste Expressionsniveau an endogenem S100P Protein aufwiesen und in den A431-Zellen die Relokalisation des Ezrins gut detektierbar ist, wurde die Lokalisation des endogenen S100P Proteins anhand dieser beiden Zelllinien untersucht. Im Gegensatz zu S100P ist Ezrin ein ubiquitär vorkommendes Protein, welches in allen S100P-positiven Epithelien exprimiert wird. Daher wurde die Charakterisierung der Ezrin Expression auf die Lokalisationsstudien beschränkt.

Dabei zeigte sich, dass in beiden untersuchten Zelllinien die Expression des endogenen S100P und Ezrin mittels des monoklonalen S100P Antikörpers (S100P *ascitis*) und des polyklonalen Ezrin Antikörpers nachweisbar ist. Zudem zeigten sowohl in den A431- als auch den SKBR3-Zellen beide endogene Proteine, nach einer Serum-Stimulation, neben einer zytosolischen Verteilung auch eine Anreicherung in Mikrovilli und anderen Aktin-reichen Membrandomänen. Außerdem war eine Kolo-kalisation beider Proteine innerhalb der Mikrovilli-ähnlichen Strukturen feststellbar (siehe Abbildung 32). Beide Beobachtungen stehen im Einklang mit den bereits veröffentlichten Daten des ektopisch exprimiertem S100P GFP-Fusionsproteins (Koltzsch *et al.*, 2003). Demnach scheinen sowohl die A431- als auch die SKBR3-Zellen geeignete Zellmodelle zur Charakterisierung der S100P-Ezrin Interaktion darzustellen.

5.2 Die S100P-Ezrin Interaktion

5.2.1 Expression und Reinigung rekombinant exprimierter S100P- und Ezrin-Derivate

Zur Charakterisierung der S100P-Ezrin Interaktion erfolgte zunächst die Kartierung des S100P-Ezrin Interaktionsmotivs. Für die Eingrenzung des jeweiligen Bindungsmotivs wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene C-terminal verkürzte N-ERMAD und S100P-Deletionsmutanten erzeugt (siehe Abbildung 15 und Abbildung 17) und diese rekombinant in *E. coli* B121(DE3) pLysS exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Im Falle der verkürzten Ezrin-Proteine dienten hierbei die zur Identifizierung des PtdIns(4,5)P₂ Bindungsmotivs verwendeten Ezrin-Derivate als Orientierungshilfe, da für diese bereits eine erfolgreiche Expression und Reinigung beschrieben wurde (Barret *et al.*, 2000). Die Analyse der Expression und Reinigung der verschiedenen GST- oder His₆-fusionierten Ezrin Derivate zeigte, dass alle Fusionsproteine nach IPTG Induktion exprimiert wurden (siehe Abbildung 16). Allerdings wurden nicht alle verkürzten Ezrin-Derivate gleichermaßen stark als lösliche Proteine exprimiert. Ezrin 173aa wies eine eher geringe Löslichkeit auf. Vermutlich führte hier die Deletion der C-terminalen Aminosäuren zu einer veränderten Konformation, welche die Löslichkeit des Proteins herabsetzte. His₆-N-ERMAD und die verkürzten GST-fusionierten Ezrin Derivate konnten über eine Glutathion-Sepharose bzw. eine Ni-NTA Matrix gereinigt werden. Bei der Reinigung der Ezrin GST-Fusionsproteine zeigte sich allerdings, dass sie nicht vollständig eluiert wurden sondern ein erheblicher Teil an der Matrix gebunden blieb. Darüberhinaus zeigte sich allgemein bei allen rekombinant exprimierten Ezrin-Fusionsproteinen ein gewisses Maß an Proteindegradation. Mittels gegen den His₆- oder GST-Tag gerichteter Antikörper konnte gezeigt werden, dass dieser Proteinabbau zum einen vornehmlich am C-Terminus der Proteine und zum anderen bereits in den Bakterien nach der Induktion mit IPTG erfolgt (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den Ezrin Fusionsproteinen wiesen die His₆-fusionierten S100 Proteine, d.h. sowohl die S100P WT und S100P F15A Fusionsproteine als auch die C-terminal verkürzten S100P 91aa und S100P 87aa Proteine, eine sehr hohe Löslichkeit auf. Mit Hilfe der anschließenden Reinigung konnten der Großteil der bakteriellen Verunreinigungen entfernt werden, und die isolierten S100P His₆-Fusionsproteine wiesen nur einen geringen Grad an Proteinabbau, vornehmlich am C-Terminus, auf (siehe Abbildung 18).

Trotz der teilweise geringen Löslichkeit der Ezrin Fusionsproteine und der auftretenden Proteindegradation wurde genügend intaktes Protein isoliert um dieses für die folgenden *in vitro* Bindungsstudien einsetzen zu können.

5.2.2 Kartierung des S100P-Ezrin Interaktionsmotivs und Analyse des S100P-vermittelten Aktivierungsmechanismus

In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindung von S100P Ca^{2+} -abhängig an die N-ERMAD Domäne des Ezrins erfolgt, welche neben der S100P Bindungsstelle zahlreiche weitere Bindungsstellen, u.a. für $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, beinhaltet (Bretscher *et al.*, 2002; Koltzsch *et al.*, 2003). Für viele S100 Proteine, wie beispielsweise S100A1 (Most *et al.*, 2003; Osterloh *et al.*, 1998), S100A11 (Rintala-Dempsey *et al.*, 2006), S100A12 (Hatakeyama *et al.*, 2004) und S100B (McClintock *et al.*, 2002) wurde gezeigt, dass konservierte hydrophobe Aminosäurereste im C-terminalen Bereich eine wesentliche Rolle für die Ligandenbindung spielen. Zur Untersuchung inwieweit die Bindung von Ezrin über die C-terminalen hydrophoben Aminosäurereste im S100P erfolgt, wurden *in vitro* Bindungsstudien mit C-terminal verkürzten S100P Derivaten durchgeführt. Diese zeigten, dass im Falle des S100P 87aa Proteins die Deletion von acht Aminosäureresten im C-Terminus zu einer Eliminierung der Ezrin Bindung führt. Im Gegensatz dazu wurde für S100P 91aa eine Bindung an die N-ERMAD-Domäne von Ezrin festgestellt (siehe Abbildung 20). Demzufolge sind für die Bindung von Ezrin besonders die hydrophoben Aminosäuren 88 bis 90 essentiell.

Daneben spielt die Anordnung hydrophober Aminosäuren auch für die Dimerisierung vieler S100 Proteine eine wesentliche Rolle. Unter anderem wurde im Falle des S100P Moleküls gezeigt, dass die Aminosäure Phenylalanin 15 an der Dimerisierung beteiligt ist und die Substitution des Phenylalanins durch ein Alanin (S100P F15A) zu einer vollständigen Eliminierung der Dimerisierung des S100P Proteins führt (Koltzsch *and Gerke*, 2000). Um sicherstellen zu können, dass die Deletion der C-terminalen Aminosäuren nicht ebenfalls die Dimerisierung der S100P Derivate beeinflusst und aufgrund dessen keine Bindung des S100P 87aa an die N-ERMAD-Domäne erfolgte, wurde die Ausbildung der Dimer-Strukturen in einem chemischen „*Crosslinking*“ Experiment untersucht. Dieses zeigte, dass die verkürzten S100P Proteine S100P 91aa und S100P 87aa die Fähigkeit zur Dimerisierung beibehalten haben (siehe Abbildung 23). Demzufolge sind die C-terminalen hydrophoben Aminosäuren zwar essentiell für die Bindung von Ezrin jedoch nicht an der Dimerisierung des S100P Proteins beteiligt. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die nicht

erfolgte Bindung des S100P 87aa an Ezrins N-ERMAD Domäne direkt auf der Deletion eines essentiellen Teils des Ezrin-Bindungsmotivs im S100P Protein beruht.

Zur Eingrenzung des S100P-Bindungsmotivs in der N-ERMAD Domäne von Ezrin wurden ebenfalls *in vitro* Bindungsstudien mit C-terminal verkürzten Ezrin GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Diese ergaben, dass die Aminosäuren 82 bis 173 der N-ERMAD Domäne für die Bindung des S100P Proteins obligatorisch sind. So erfolgte zwar noch eine Bindung des S100P WT Proteins an das Ezrin 173aa Protein, jedoch war keine Bindung an das 82 Aminosäuren große Erin 82aa Fusionsprotein feststellbar (siehe Abbildung 19). Kontrollexperimente mit dem monomeren S100P F15A Protein und EGTA bestätigten, dass die Bindung an Ezrin 173aa dimerspezifisch und Ca^{2+} -abhängig erfolgte und unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen unwahrscheinlich sind. Die zur Bindung von S100P essentiellen Aminosäuren 82-173 befinden sich in der F2-Subdomäne (Aminosäuren 88 bis 199) von Ezrins FERM-Domäne (siehe Abbildung 41).

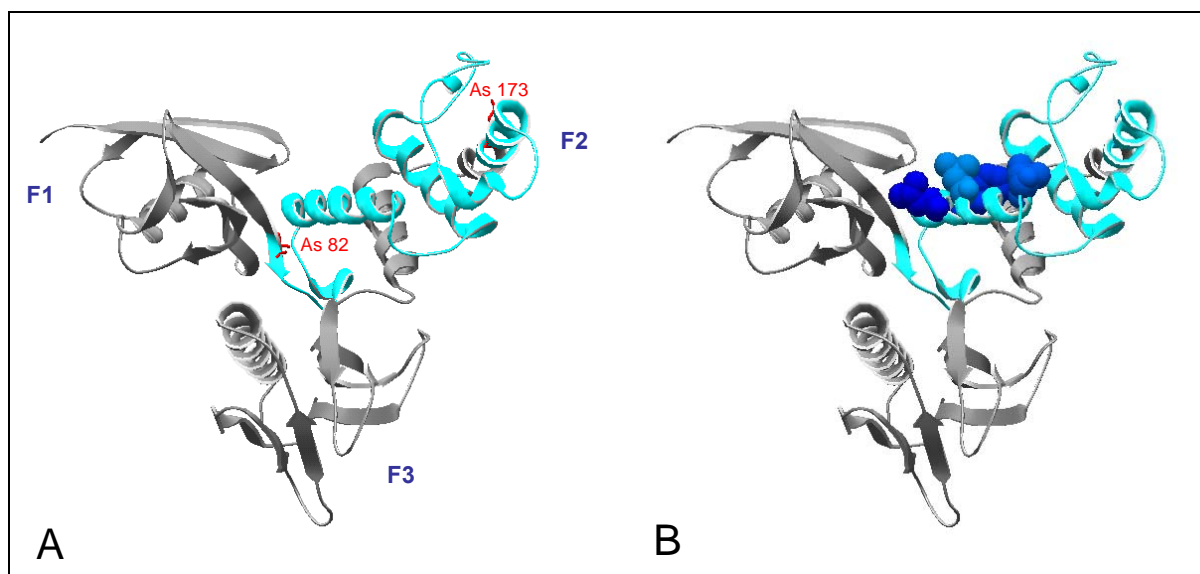


Abbildung 41: Lokalisation der S100P Bindungsstelle innerhalb der FERM-Domäne von Ezrin

In die Struktur der N-terminalen FERM-Domäne von Ezrin wurde der als S100P-Bindungsstelle identifizierte Bereich eingezeichnet (blau). Die Aminosäure 82 am Anfang und die Aminosäure 173 am Ende des Bindungsmotivs sind rot hervorgehoben (A). Die Interaktion des S100P mit Ezrins FERM-Domäne erfolgt wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen. An diesen Wechselwirkungen könnten besonders die hydrophoben Aminosäuren Leu 101, Phe 103, Leu 104 und Leu 111 (dunkelblau) beteiligt sein, da diese einen hydrophoben Bereich darstellen, welcher innerhalb der FERM-Domäne für S100P zugänglich erscheint (B).

Für die F2- als auch für die F3-Subdomäne wurde gezeigt, dass sie „flexible“ Regionen enthalten deren Konformation sich bei der Aktivierung von Ezrin verändert. Für die F2-Subdomäne wurden als solche Regionen die Aminosäurereste 135-150 und 155-180 identifiziert, und für die F3-Subdomäne die Aminosäurereste 210-214 und 235-267. Es wird postuliert, dass besonders an diesen Regionen eine Interaktion mit Bindungspartner erfolgt (Smith *et al.*, 2003). Unter zahlreichen Bindungspartnern von FERM-Domänen wurde u.a. auch für den HGF-Rezeptor (*hepatocyte growth factor receptor*) eine Bindung an die F2-Subdomäne der FERM-Domäne der FAK (*focal adhesion kinase*) nachgewiesen (Chen and Chen, 2006).

Die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ erfolgt ebenfalls an die FERM Domäne des Ezrins und mit den Aminosäuren 12-115 und 233-310 sind ebenso „flexible“ Regionen der Subdomänen F2 und F3 als Bindungsstellen identifiziert worden (Barret, 2000). Demzufolge scheinen sich die Bindungsstellen für PtdIns(4,5)P₂ und für S100P in der FERM-Domäne partiell zu überschneiden und es wäre denkbar, dass die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ und S100P kompetitiv erfolgt.

Für die N-ERMAD Domäne des Ezrins wurde eine Assoziation mit PtdIns(4,5)P₂-enthaltenden Liposomen beschrieben (Niggli *et al.*, 1995). Daher wurden zur Untersuchung der Competition zwischen der S100P- und PtdIns(4,5)P₂-Bindung Co-Sedimentationen mit PtdIns(4,5)P₂-enthaltenden Liposomen durchgeführt. Diese zeigten, dass die Zugabe von S100P WT zu einer signifikanten Verringerung (um ca. 30 %) der Bindung von N-ERMAD an die Liposomen führt (siehe Abbildung 26). Im Gegensatz dazu zeigte die Zugabe des monomeren S100P F15A und des nicht an Ezrin bindenden S100P 87aa Proteins keinen Einfluss auf die Liposomenbindung von N-ERMAD. Demzufolge scheint die Bindung von S100P WT spezifisch die Bindung von Ezrin an PtdIns(4,5)P₂ zu verringern. Zudem zeigten Messungen mit der Quarzmikrowaage (QCM), dass an einer Festkörper-unterstützten POPC/PtdIns(4,5)P₂ (97:3) Membran mit immobilisiertem Ezrin/N-ERMAD Protein keine Bindung des S100P Proteins an die N-ERMAD Domäne erfolgt (Dissertation Alexander Herrig, 2007). Demnach scheint auch im umgekehrten Fall die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ die S100P-Bindung an N-ERMAD zu verhindern. Dies erlaubt wiederum die Annahme, dass die Bindung von S100P kompetitiv zur Bindung von PtdIns(4,5)P₂ erfolgt. Möglicherweise führt die Bindung von S100P zu einer sterischen oder kinetischen Hemmung der PtdIns(4,5)P₂ Bindung. Neben dieser Möglichkeit könnte die Bindung von S100P zu einer Konformationsänderung in der N-ERMAD Domäne führen, welche die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ unterbindet und aktivierend wirkt. Durch den Vergleich der Kristallstrukturen

von inaktivem Moesin mit den aktivierten N-terminalen Domänen von Ezrin und Radixin konnten solche Konformationsänderungen detektiert werden (Pearson *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003; Hamada *et al.*, 2000).

Sowohl die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ als auch von S100P führen zu einer Konformationsänderung des Ezrin Moleküls, die in einer Aktivierung dessen Plasmamembran-Zytoskelett verknüpfender Funktion resultiert. So wurde u.a. gezeigt, dass die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ und die Phosphorylierung des Threoninrestes T567 von Ezrin für dessen Aktivierung erforderlich sind (Fievet *et al.*, 2004). Ebenso führt auf der anderen Seite auch die Bindung von S100P zumindest zu einer Freisetzung der im inaktiven Ezrin maskierten F-Aktin Bindungsstelle (Koltzsch *et al.*, 2003). Da im Rahmen dieser Arbeit eine Überschneidung der Bindungsmotive für S100P und PtdIns(4,5)P₂ festgestellt wurde, besteht die Möglichkeit, dass die beiden Aktivierungsmechanismen nach einem ähnlichen Grundschema ablaufen. Vermutlich stellt die Aktivierung über S100P einen zur PtdIns(4,5)P₂ Bindung alternativen Aktivierungsmechanismus dar, in welchem S100P als Ca²⁺-Sensor ein zelluläres Ca²⁺-Signal wahrnimmt, und dieses anschließend auf Ezrin als Effektorprotein überträgt. Dieser Weg könnte von besonderer Bedeutung sein, wenn eine Wachstumsfaktor-Stimulierung und Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu einer Verschiebung des PtdIns(4,5)P₂ / Ca²⁺-Gleichgewichts und Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt (siehe Abbildung 42). In diesem Fall wäre es denkbar, dass die Aktivierung von Ezrin vermehrt über die Bindung von S100P erfolgt. Zudem besteht die Möglichkeit, dass dieser Weg eine Signalverstärkungsfunktion besitzt und eine vermehrte Ca²⁺-Freisetzung zu einer verstärkten Aktivierung des Ezrin und seiner Plasmamembran-Zytoskelett verknüpfenden Funktion führt. In diesem Zusammenhang wäre die Bestimmung der Ca²⁺-(S100P) und PtdIns(4,5)P₂-Affinitäten (Ezrin) von entscheidender Bedeutung.

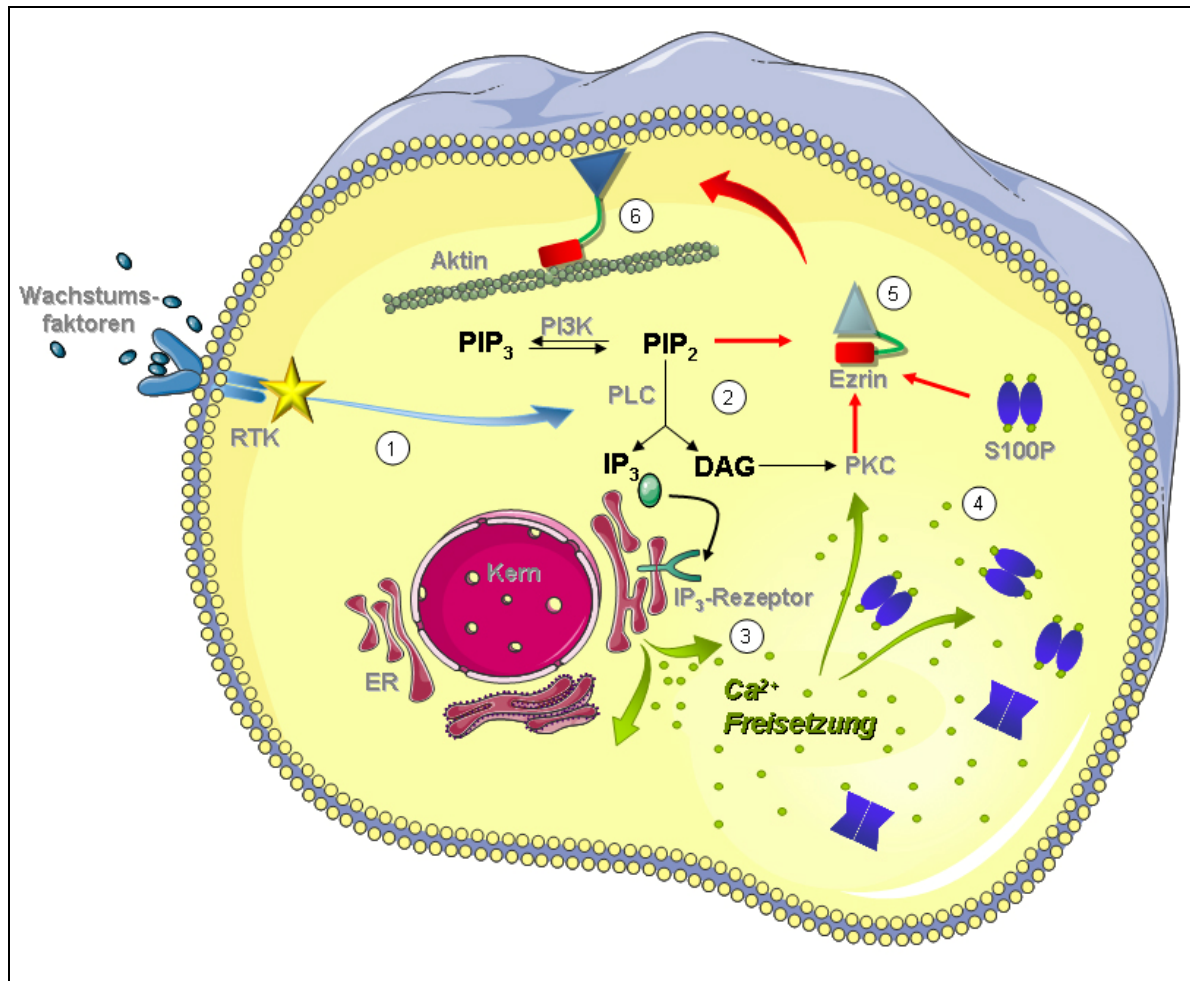


Abbildung 42: Modell zur Aktivierung des ruhenden Ezrins

Über die Bindung von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) werden Rezeptortyrosinkinasen (RTK) wie der EGF-Rezeptor aktiviert, die wiederum die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) bewirken (1). Diese ist ein Schlüsselenzym des Phosphoinositidstoffwechsels, das nach Aktivierung PtdIns(4,5)P₂ (PIP₂) in die beiden „second messenger“ Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) spaltet (2). Die Bindung des IP₃ an den IP₃-Rezeptor, einem ligandenaktivierten Calciumkanal in der Membran des ER, führt zu einer Freisetzung von Calciumionen aus dem ER (Calcium-Konzentrationen im mM Bereich) und bewirkt damit einen Anstieg der zyttoplasmatischen Calcium-Konzentration (in nicht stimulierten Zellen 100-150 nM) (3). Die erhöhten zyttoplasmatischen Calcium-Konzentration führen zu einer durch die Bindung von Calcium verursachten Konformationsänderung des S100P Proteins (Calcium-Affinität: $K_d = 1,6 \mu\text{M}$) die eine Interaktion mit dem „ruhenden“ Ezrin ermöglicht. Zum Anderen benötigt auch die Proteinkinase C (PKC) für ihre Funktion Calcium. Allerdings wird auch über die Bindung des „second messengers“ DAG die Affinität der PKC für Calcium erhöht, so dass schon bei physiologischen Konzentrationen eine Aktivität des Enzyms gewährleistet ist (4). Sowohl die Bindung von S100P an das „ruhende“ Ezrin als auch die PKC-vermittelte Phosphorylierung des Threoninrestes T567 und die Bindung von PIP₂ (5) führen zu einer Konformationsänderung des Ezrins, die in der Aktivierung dessen Membran-Zytoskelett verknüpfenden Funktion resultiert (6).

Prinzipiell kann die Aktivierung und Rekrutierung von Ezrin zur Plasmamembran über drei verschiedene Wege erfolgen (siehe Abbildung 43). Zum einen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Ezrin und dessen Rekrutierung zur Plasmamembran die Phosphorylierung eines konservierten Threoninrestes im C-Terminus sowie die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ erfordert (Fievet *et al.*, 2004, siehe Abbildung 43, (2)). Andererseits zeigten *in vitro* Bindungsstudien, dass die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ hinreichend ist, um eine Freisetzung der F-Aktinbindungsstelle in Ezrin zu bewirken (persönliche Mitteilung Claudia Steinem, Universität Göttingen). Demnach wäre es möglich, dass bereits die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ ausreichend ist, um Ezrin zu aktivieren und an die Plasmamembran zu rekrutieren.

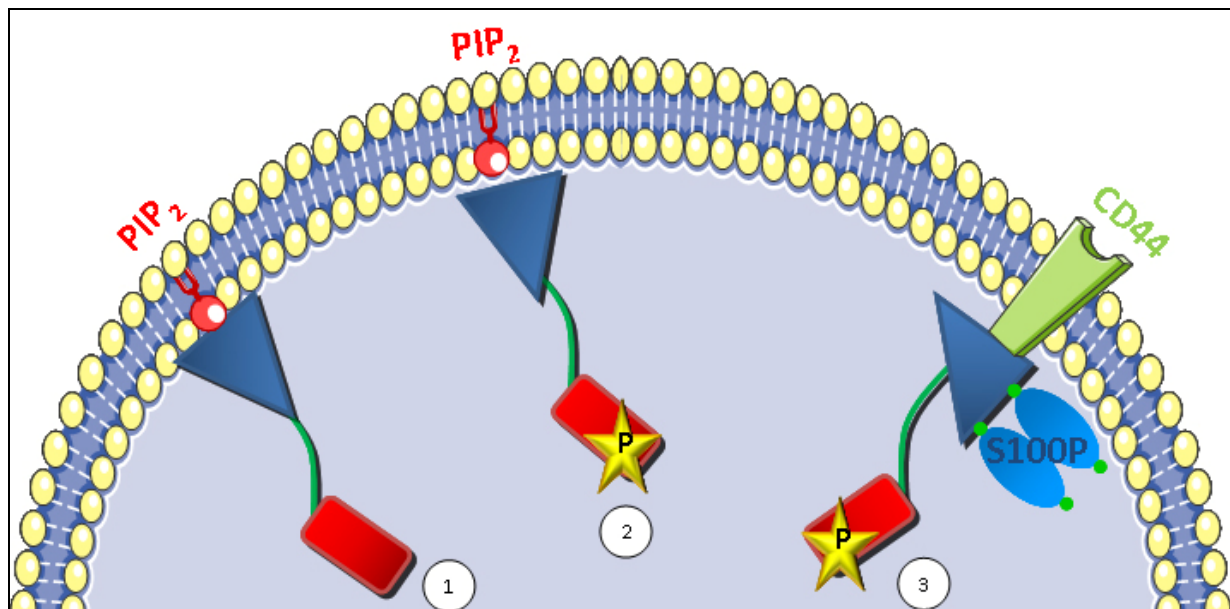


Abbildung 43: Aktivierung und Rekrutierung von Ezrin zur Plasmamembran

Theoretisch existieren drei verschiedene Möglichkeiten zur Aktivierung und Rekrutierung von Ezrin an die Plasmamembran. Zum einen wäre es möglich, dass die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ zu einer Aktivierung und Rekrutierung von Ezrin an die Plasmamembran führt (1). Daneben wurde beschrieben, dass nicht nur die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ sondern auch die Phosphorylierung des Threoninrestes T567 zur Aktivierung des Ezrins benötigt wird. Demnach könnte an der Plasmamembran phosphoryliertes, PtdIns(4,5)P₂ gebundenes Ezrin vorliegen, das gegebenenfalls zusätzlich mit transmembranen Proteinen interagiert (2). Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die Bindung von S100P eine Aktivierung des Ezrin bewirkt und dieses daraufhin an der Plasmamembran mit transmembranen Proteinen wie CD44 interagieren kann (3).

Zudem führte die Überexpression der Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PI4P5) in Mausfibroblasten und HeLa-Zellen zu einer verstärkten Rekrutierung von Ezrin an die Plasmamembran und in Mikrovilli (Matsui *et al.*, 1999; Auvinen *et al.*, 2007). Die PI4P5-Kinase ist verantwortlich für die Synthese von PtdIns(4,5)P₂, weshalb diese Untersuchungen die Hypothese, dass die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ die Aktivierung von Ezrin fördert, bestärkt (siehe Abbildung 43, (1)). Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass Ezrin durch die

Bindung von S100P aktiviert und zur Plasmamembran rekrutiert wird. So kolokalisieren Ezrin und S100P nach Wachstumsfaktor-Stimulation in Mikrovilli ähnlichen Strukturen. Dabei ist nicht eindeutig, ob S100P aktiv an der Rekrutierung von Ezrin beteiligt ist oder nur indirekt über die Bindung an Ezrin an die Membran rekrutiert wird. Außerdem ist bisher nicht bekannt, ob S100P an der Plasmamembran permanent an Ezrin gebunden bleibt, oder aber beispielsweise bei einer Abnahme des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels von Ezrin dissoziiert. In diesem Fall wäre es denkbar, dass Ezrin allein über die Interaktion mit transmembranen Proteinen an der Plasmamembran zurückgehalten wird. Zudem wurde bisher auch nicht eindeutig geklärt, inwieweit die Bindung von S100P Ezrin aktiviert. Zwar zeigten *in vitro* Bindungsstudien, dass die Bindung von S100P zu einer Freisetzung von Ezrins F-Aktinbindungsstelle führt (Koltzsch *et al.*, 2003), jedoch ist *in vivo* bei einer Wachstumsfaktor induzierten Stimulation nicht vollständig auszuschließen, dass u.a. zusätzlich eine Phosphorylierung an der Aktivierung des Ezrins beteiligt ist. Eine Möglichkeit dieses eingehender zu untersuchen wäre z.B. eine Hemmung der Proteinkinasen durch Staurosporin, einem Alkaloid aus *Streptomyces staurosporeus*. Desweiteren wäre auch die Überexpression zweier Ezrin-Mutanten, von denen eine das phosphorylierte Ezrin nachahmt (Ezrin T567D) und eine das nicht phosphorylierbare (Ezrin T567A) darstellt, hilfreich (Chambers and Bretscher, 2005). Vorausgesetzt die Bindung von S100P führt zu einer vollständigen Aktivierung von Ezrin, wäre hier im Falle der beiden ektopisch exprimierten Ezrin Mutanten, kein Unterschied zwischen der aktiven und inaktiven Mutante bezüglich der Aktivierung und der intrazellulären Lokalisation zu erwarten.

5.2.3 Relevanz von Ca^{2+} für die S100P-Ezrin Interaktion

Für eine eingehende Charakterisierung der S100P-vermittelten Ezrin Aktivierung wurde ferner die Funktion von Ca^{2+} bei der S100P-Ezrin Interaktion untersucht. *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass eine durch Ca^{2+} -Ionophor induzierte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels ausreichend ist, eine Aktivierung von Ezrin und dessen Rekrutierung an die Plasmamembran auszulösen (Koltzsch *et al.*, 2003). Für eine detailliertere Untersuchung der Relevanz des Ca^{2+} wurde, in Anlehnung an das S100A10 Protein, ein S100P Derivat (S100P pa) erzeugt, das Ca^{2+} -unabhängig in einer aktiven Konformation vorliegt. S100A10 ist ein Mitglied der S100 Familie, welches aufgrund der Deletion und Substitution mehrerer Aminosäuren inaktive EF-Hände besitzt, sich aber dennoch in einer permanent aktiven, der Ca^{2+} -gebundenen Form ähnlichen, Konformation befindet. Zur Erzeugung der S100P pa Mutante wurden die entsprechenden Aminosäuren

innerhalb der EF-Hände des S100P WT Proteins deletiert bzw. substituiert. Theoretische Strukturmodelle zeigten, dass die Konformation des S100P pa der des Ca^{2+} -gebundenen S100P WT Proteins in den für die Funktion entscheidenden Merkmalen sehr ähnelt. So weisen beide Proteine eine übereinstimmende Anordnung der Helices E1, E2, F1 und F2 auf. Zudem zeigte die Darstellung der Solvent-zugänglichen Oberfläche des S100P pa Homodimer-Modells, dass ähnlich wie im Ca^{2+} -gebundenen S100P WT Protein ein Großteil der hydrophoben Aminosäuren an der Oberfläche des Dimers exponiert werden und dort an Protein-Protein Kontakten beteiligt sein könnten (siehe Abbildung 35). Zur Überprüfung inwieweit tatsächlich im S100P pa Protein hydrophobe Aminosäuren exponiert werden, wurde dieses zunächst rekombinant in *E. coli* B121(DE3) pLysS exprimiert, bevor im Anschluss seine Bindungskapazität an eine hydrophobe Matrix untersucht wurde. Die Analyse der rekombinanten Expression zeigte, dass sowohl His₆- als auch unfusioniertes S100P pa Protein nach der IPTG-Induktion in großen Mengen als lösliches Protein exprimiert werden. Allerdings zeigte sich bei der anschließenden Reinigung der rekombinant exprimierten Proteine, dass die Reinigung des His₆-fusionierten S100P pa Proteins erfolgreicher als die des nicht fusionierten S100P pa Proteins war. Ein großer Teil des nicht fusionierten Proteins wurde nicht an die zur Reinigung verwendete Matrix gebunden und zudem enthielten die gereinigten Fraktionen weiterhin große Mengen bakterieller Verunreinigungen (siehe Abbildung 36). Daher folgten weitere Reinigungsschritte des nicht fusionierten S100P pa Proteins in der Arbeitsgruppe von Günter Fritz.

Die Analyse der Bindungseigenschaften des S100P pa Proteins an eine hydrophobe Matrix (Phenyl-Sepharose) ergab, dass S100P pa in der Abwesenheit von Ca^{2+} ausreichend hydrophob ist, um signifikant an die Phenyl-Sepharose-Matrix zu binden (siehe Abbildung 37). Im Gegensatz dazu zeigte sich im parallel mit S100P WT durchgeführten Kontrollexperiment eine vernachlässigbar geringe Bindung des Ca^{2+} -freien S100P WT Proteins an die hydrophobe Matrix, bei der es sich vermutlich um unspezifische Wechselwirkungen handelte. Demnach scheinen die Veränderungen innerhalb der S100P pa EF-Hände zumindest soweit die Konformation des Proteins zu verändern, dass es Ca^{2+} -unabhängig an die Phenyl-Sepharose-Matrix bindet. Dies erlaubt allerdings noch keine Aussage darüber, inwieweit die Konformation des S100P pa Proteins dahingehend verändert wurde, dass es Ca^{2+} -unabhängig mit Ezrin interagieren kann. Um dies eingehender zu untersuchen wurden, *in vitro* Bindungsstudien mit der N-ERMAD Domäne von Ezrin durchgeführt. Zur Kontrolle wurden parallel Ansätze mit S100P WT erstellt, für das eine Ca^{2+} -abhängige Bindung an die N-ERMAD Domäne beschrieben wurde (Koltzschner *et al.*,

2003). Die Bindungsstudien ergaben, dass S100P pa im Gegensatz zum S100P WT auch in Abwesenheit von Ca^{2+} signifikant an die N-ERMAD Domäne von Ezrin bindet (siehe Abbildung 38). Zudem zeigte sich, dass in dem Ca^{2+} -enthaltendem Ansatz anders als bei dem S100P WT Protein keine Elution von S100P pa mit EGTA erfolgte. Dies spricht wiederum dafür, dass im Falle von S100P pa die Bindung an die N-ERMAD Domäne Ca^{2+} -unabhängig erfolgt. Diese Beobachtungen konnten mittels *in vivo* Studien mit ektopisch exprimiertem S100P pa GFP-Fusionsprotein bestätigt werden. Untersuchungen mit Serum-depletierten GFP-S100P WT exprimierenden A431-Zellen zeigten, wie erwartet, eine vorwiegend zytosolische Verteilung des GFP-Fusionsproteins und des endogenen Ezrins, sowie nur eine geringfügige Lokalisation in Mikrovilli-ähnlichen Strukturen (Koltzsch *et al.*, 2003). In Serum-depletierten Zellen erfolgt keine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, so dass die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration von 100 nm nicht ausreichend ist, um eine Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung des S100P WT Proteins und die resultierende Aktivierung von Ezrins Plasmamembran-Zytoskelett verknüpfender Funktion zu aktivieren. Im Gegensatz dazu zeigte das endogene Ezrin zusammen mit dem S100P pa GFP-Fusionsprotein eine Anreicherung in Mikrovilli-ähnlichen Strukturen in den GFP-S100P pa exprimierenden Zellen (siehe Abbildung 39). Ähnliches zeigte sich auch bei der Expression der S100P GFP-Fusionsproteine in HeLa Zellen (siehe Abbildung 40). Für diese Zellen wurde zwar bisher keine Induktion von Mikrovilli-ähnlichen Strukturen beschrieben, dennoch zeigte das S100P pa GFP-Fusionsprotein in diesen Zellen eine stärkere Lokalisierung an der Plasmamembran als das S100P WT GFP-Fusionsprotein. Zudem zeigte auch das endogene Ezrin in den GFP-S100P pa exprimierenden HeLa Zellen eine stärkere Anreicherung an der Plasmamembran als in den GFP-S100P WT exprimierenden Zellen.

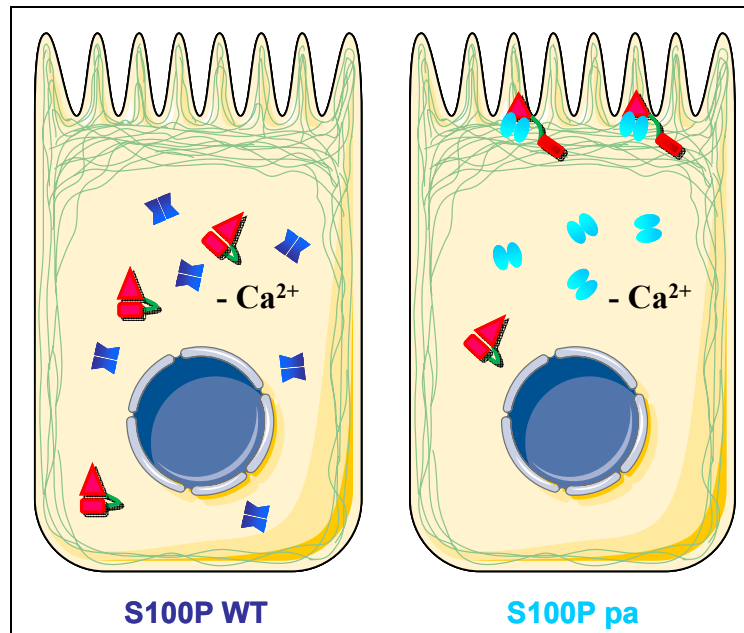


Abbildung 44: Modell zur Rekrutierung des endogenen Ezrins in Serum depletierten Zellen

In Serum depletierten Zellen führt die Ca^{2+} -unabhängige Bindung des S100P pa GFP-Fusionsproteins (hellblau) an Ezrin (rot) zu einer Aktivierung dessen Plasmamembran-Aktinzytoskelett verknüpfenden Funktion wodurch beide Proteine in Mikrovilli-ähnliche Strukturen translozieren. Im Gegensatz dazu ist für das S100P WT GFP-Fusionsprotein in Serum-depletierten Zellen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nicht ausreichend, um eine Aktivierung des Ezrins und Translokation beider Proteine auszulösen.

Die Lokalisationsstudien zeigen demnach, dass das S100P pa GFP-Fusionsprotein im Gegensatz zu dem GFP-fusionierten S100P WT Ca^{2+} -unabhängig an die Plasmamembran transloziert und dort mit Ezrin kolokalisiert. Dies spricht dafür, dass S100P pa auch *in vivo* unabhängig von Ca^{2+} an Ezrin bindet und möglicherweise dessen Aktivierung induziert. Um die Aktivierung des Ezrins über die Ca^{2+} -unabhängige Bindung des S100P pa Proteins genauer zu untersuchen und darüber auch Rückschlüsse auf die Notwendigkeit von Ca^{2+} für die Aktivierung von Ezrin ziehen zu können, müssten weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden. Im Falle der Lokalisationsstudien wären Untersuchungen mit Ca^{2+} -Chelatoren denkbar, um den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel noch weiter zu senken. Außerdem wäre es hilfreich S100P pa zusammen mit der nicht phosphorylierbaren Ezrin T567A Mutante ektopisch zu exprimieren um ausschließen zu können, dass zur Aktivierung des Ezrins die zusätzliche Phosphorylierung des T567 Restes notwendig ist.

Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, die Aktivierung des Ezrins *in vitro* mittels F-Aktin Co-Sedimentationsexperimenten zu untersuchen. Hier wurde bereits beschrieben, dass die Bindung von S100P WT zu einer Konformationsänderung des Ezrins führt. Diese resultiert in einer Freisetzung von dessen F-Aktinbindungsstelle, so dass Ezrin mit F-Aktin co-sedimentiert (Koltzsch *et al.*, 2003). Darüberhinaus könnte die Aktivierung des Ezrins über eine Zellfraktionierung in detergenzlösliche und -unlösliche Fraktionen untersucht werden.

Hier wurde bereits gezeigt, dass die HGF-vermittelte Aktivierung des Ezrins zu einer Anreicherung des Ezrins in der detergenzunlöslichen Zytoskelett Fraktion führt (Crepaldi *et al.*, 1997). Daher wäre denkbar, dass auch die Aktivierung über S100P zu einer Anreicherung des Ezrins in der Zytoskelett-Fraktion führt.

Zudem wäre auch die Kristallisation der S100P pa Proteinstruktur zur Aufklärung der Interaktion zwischen S100P pa und Ezrin und des Aktivierungsmechanismus hilfreich. Über die Kristallstruktur könnten genaue Aussagen über die Faltung des S100P pa Proteins und die Exposition der zur Interaktion notwendigen hydrophoben Aminosäurereste getroffen werden. Aus diesem Grund wird zur Zeit in Kooperation mit Günter Fritz (Universität Konstanz) die Kristallisation des S100P pa Proteins angestrebt.

5.3 Die S100P-Ezrin Interaktion in der Tumorzellmigration

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Ca^{2+} -abhängige Bindung von S100P an Ezrin, einen $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -unabhängigen Aktivierungsmechanismus darstellt, sollte dessen physiologische Relevanz eingehender untersucht werden. Sowohl für S100P als auch für Ezrin wurde eine Beteiligung an der Tumor-Metastasierung beschrieben. Wie viele andere S100 Proteine (Donato, 2001) wird auch S100P verstärkt in humanen Tumoren, wie z.B. Lungenkrebs (NSCLC), exprimiert und die Überexpression von S100P in der humanen Lungenkrebszelllinie HTB58 führt zu einer erhöhten transendothelialen Migration dieser Zellen (Diederichs *et al.*, 2004). Die Funktion des S100P in der Metastasierung von Lungenkrebs ist bisher nicht eindeutig charakterisiert worden. Es wird vermutet, dass S100P entweder extrazellulär über RAGE oder intrazellulär durch die Interaktion mit Ezrin die Metastasierung der Tumorzellen beeinflusst. Ezrin reguliert die Struktur des kortikalen Zytoskeletts. Eine erhöhte Expression des Ezrins steht u.a. in Zusammenhang mit der Metastasierung sowie Entwicklung verschiedener Tumorarten wie z.B. Knochenkrebs (Khanna *et al.*, 2004). Da Ezrin durch die Bindung von S100P aktiviert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Aktivierungsmechanismus für die Tumorzellmigration relevant sein könnte. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Ezrin-S100P Interaktion auf die transendotheliale Migration von HTB58 Zellen eingehender untersucht. Dies erfolgte anhand eines Zellkulturmodells in welchem die Migration verschiedener HTB58-Zelllinien, die stabil S100P und Ezrin GFP-Fusionsproteine exprimierten, durch einen endothelialen Monolayer betrachtet wurde. Die Auswertung dieser Migrationsexperimente ergab, dass sowohl die Überexpression des S100P WT als auch des permanent aktiven Ezrin T567D GFP-Fusionsproteins zu einer signifikanten Steigerung der transendothelialen Migration der HTB58 Zellen um ca. 50 % führte (siehe Abbildung 28). Dies steht im Einklang mit den bereits veröffentlichten Daten zur Expression von S100P in NSCLC (Diederichs *et al.*, 2004). Darüberhinaus bestätigt es die Annahme, dass beide Proteine in der Tumorzellmigration bei NSCLC beteiligt sind. Die Überexpression des nicht an Ezrin bindenden S100P 87aa GFP-Fusionsproteins führte zu keiner signifikanten Steigerung der transendothelialen Migration, was wiederum verdeutlicht, dass nicht nur die Überexpression dieser beiden Proteine sondern auch deren gegenseitige Interaktion für die Tumorzellmigration von Bedeutung zu sein scheint.

Die Funktionen des S100P und Ezrins in der Migration sind wahrscheinlich sehr komplex und noch weitestgehend ungeklärt. So wurde z.B. im Falle des Ezrins gezeigt, dass je nach Art des Tumors die Expression von Ezrin die Tumorzellmigration verstärkt (Hiscox and Jiang, 1999)

oder aber verringert (Brown et al., 2003; Crepaldi et al., 1997; Lee et al., 2004). Dennoch wurde z.B. für Lymphozyten beschrieben, dass die phosphorylierte Form des Ezrins für die Ausbildung polarer, auch als „cap“ bezeichneter Strukturen essentiell ist. Diese dienen als Ausgangspunkt für die Ausbildung von Uropodien, welche wiederum durch gezielte Verteilung von Adhäsionsmolekülen wie CD44, den Lymphozyten eine schnelle Migration ermöglichen. Darüberhinaus wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die Überexpression des permanent aktiven Ezrin T567D zu vergrößerten Uropodien und einer Steigerung der Migration bei Lymphozyten führt (Lee et al., 2004).

Auch in Studien mit der Karzinosarkomzelllinie Walker 256 konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des endogenen Ezrins zu einer Verringerung der spontanen Zellmigration um 70 % führt. Walker 256 Zellen bilden im vorderen Zellbereich polare Strukturen aus, in denen u.a. phosphoryliertes Ezrin angereichert ist. Zwar bilden Walker 256 Zellen, in denen das endogene Ezrinlevel mittels siRNA reduziert wurde, immer noch polare Strukturen aus, allerdings wird vermutet, dass die Ezrin-Reduktion zu einer mangelhaften Verknüpfung zwischen der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett führt. Auch wenn dies möglicherweise keinen Einfluss auf die Zellpolarisierung besitzt, wird zumindest die Migration dieser Zellen stark beeinträchtigt (Rossy et al., 2007).

Diesen Untersuchungen zufolge wäre es denkbar, dass auch die Bindung von S100P eine Aktivierungsmöglichkeit des Ezrins darstellt, die dazu führt, dass über das aktivierte Ezrin innerhalb der Tumorzellen eine Polarität oder Verknüpfung mit F-Aktin erzeugt wird, die für die Migration der Zellen erforderlich ist (siehe Abbildung 45).

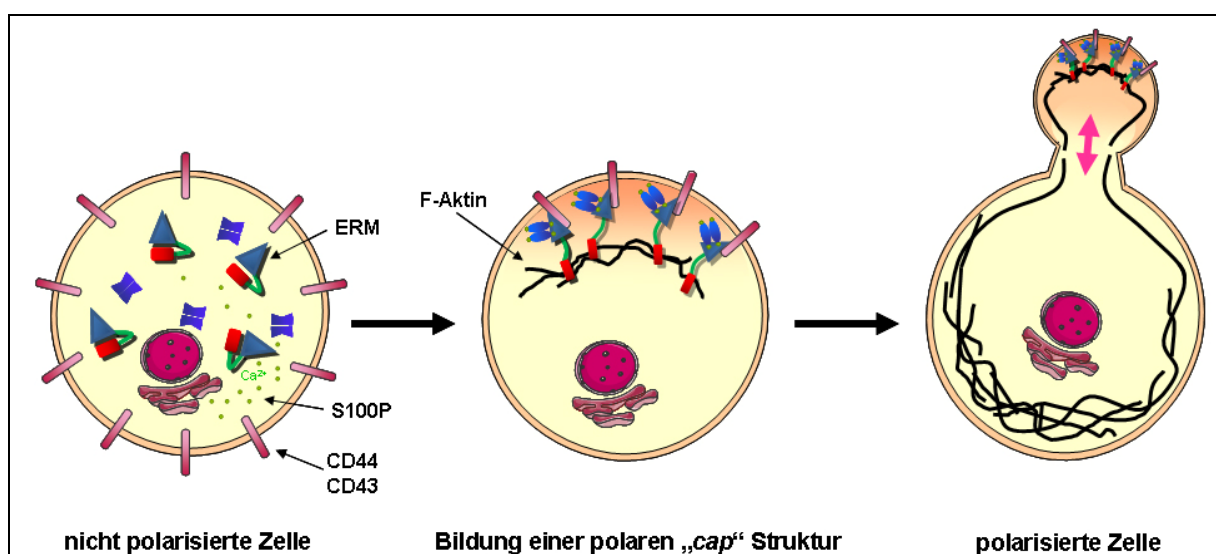


Abbildung 45: Modell zur S100P-Ezrin Interaktion in der Tumorzellmigration

Die Bindung von S100P an Ezrin in der nicht polarisierten Zelle resultiert in einer Aktivierung des Ezrins. Dies führt möglicherweise wiederum zur Polarisierung und Migration der Tumorzelle.

Zur detaillierteren Charakterisierung der S100P-Ezrin Interaktion in der Tumorzellmigration erscheint ein Mausmodell zur Untersuchung der Metastasierung *in vivo* sinnvoll. Hierzu könnten den Mäusen stabile Ezrin- und S100P-Lungenkrebszelllinien subkutan injiziert werden, um anschließend die Metastasierung und Tumorbildung zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Die zur EF-Hand Familie Ca^{2+} -bindender Proteine gehörenden S100 Proteine fungieren als Ca^{2+} -Sensoren, die verschiedenste intra- und extrazelluläre Prozesse regulieren. Die Bindung des Ca^{2+} führt bei ihnen zu einer Konformationsänderung, die eine Interaktion mit ihren Bindungspartnern ermöglicht. Ein Ca^{2+} -abhängiger Interaktionspartner des S100P ist Ezrin, ein Mitglied der ERM-Proteinfamilie. Ezrin wird vor allem in Epithelien exprimiert und ist dort an der Verknüpfung zwischen Plasmamembran und Aktinzytoskelett beteiligt (Berryman et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Ezrin und S100P über die hydrophoben Aminosäurereste 88-90 im C-Terminus des S100P und die Aminosäurereste 82-173 der N-terminalen FERM Domäne des Ezrins erfolgt. Ezrin kann innerhalb der Zelle in zwei unterschiedlichen Konformationen vorliegen. In der als „ruhend“ bezeichneten Konformation sind durch intramolekulare Wechselwirkungen die meisten Bindungsstellen für Interaktionspartner des Ezrins maskiert. Die Bindung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und die Phosphorylierung eines C-terminalen Threoninrestes führen durch Aufhebung der intramolekularen Maskierung zur Aktivierung, so dass Ezrin u.a. mit Aktinfilamenten und Transmembranproteinen interagieren kann (Matsui et al., 1998; Simons et al., 1998). Die Bindung von S100P führt ebenfalls zu einer Aktivierung von Ezrin, die es befähigt Aktinfilamente zu binden (Koltzsch et al., 2003). Wie in dieser Arbeit gezeigt, erfolgt diese Bindung von S100P kompetitiv zur Bindung von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ und die Aktivierung des Ezrins läuft vermutlich nach einem der $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ vermittelten Aktivierung ähnlichen Mechanismus ab. S100P wirkt somit als Ca^{2+} -Sensor, der ein zelluläres Ca^{2+} -Signal wahrnimmt und dieses auf Ezrin als Effektorprotein überträgt. Die Bedeutung des Ca^{2+} für die S100P-Ezrin Interaktion konnte auch mittels einer permanent aktiven (pa) S100P Mutante verdeutlicht werden. Es zeigte sich, dass diese Mutante der Ca^{2+} -gebundenen Form des S100P WT Proteins bezüglich seiner hydrophoben Eigenschaften ähnelt und Ca^{2+} -unabhängig an die FERM- Domäne des Ezrins zu binden vermag. Daneben zeigte das S100P pa Protein in unstimulierten Zellen, d.h. bei niedrigen zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen, eine Assoziation mit der Plasmamembran und Kollokalisierung mit Ezrin, wie es bereits für das S100P WT im Ca^{2+} -gebundenen Zustand beschrieben wurde (Koltzsch et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten demzufolge daraufhin, dass die Aktivierung des Ezrins allein über die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels erfolgen kann.

Anhand eines Zellkulturmodells konnte zudem verdeutlicht werden, dass die S100P-Ezrin Interaktion für die Migration von Lungenkarzinomzellen (NSCLC) relevant ist. So resultiert

sowohl die Überexpression des S100P WT als auch des permanent aktiven Ezrin T567D Proteins in der Lungenkrebszelllinie HTB58 in einer gesteigerten transendothelialen Migration. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression des nicht an Ezrin bindenden S100P 87aa Proteins zu keiner erhöhten Migration der Lungenkrebszelllinie. Demzufolge scheint die Interaktion zwischen S100P und Ezrin maßgeblich für die gesteigerte Migration der Lungenkarzinomzellen zu sein.

7. Literaturverzeichnis

- Ambartsumian, N., J. Klingelhofer, M. Grigorian, C. Christensen, M. Kriajevska, E. Tulchinsky, G. Georgiev, et al. 2001. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 20, (34) (Aug 2): 4685-4695.
- Arumugam, T., V. Ramachandran, and C. D. Logsdon. 2006. Effect of cromolyn on S100P interactions with RAGE and pancreatic cancer growth and invasion in mouse models. *Journal of the National Cancer Institute* 98, (24) (Dec 20): 1806-1818.
- Arumugam, T., D. M. Simeone, A. M. Schmidt, and C. D. Logsdon. 2004. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation end products (RAGE). *The Journal of Biological Chemistry* 279, (7) (Feb 13): 5059-5065.
- Auvinen, E., N. Kivi, and A. Vaheri. 2007. Regulation of ezrin localization by Rac1 and PIPK in human epithelial cells. *Experimental Cell Research* 313, (4) (Feb 15): 824-833.
- Barret, C., C. Roy, P. Montcourrier, P. Mangeat, and V. Niggli. 2000. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *The Journal of Cell Biology* 151, (5) (Nov 27): 1067-1080.
- Bartling, B., G. Rehbein, W. D. Schmitt, H. S. Hofmann, R. E. Silber, and A. Simm. 2007. S100A2-S100P expression profile and diagnosis of non-small cell lung carcinoma: Impairment by advanced tumour stages and neoadjuvant chemotherapy. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 43, (13) (Sep): 1935-1943.
- Baudier, J., and D. Gerard. 1986. Ions binding to S100 proteins. II. conformational studies and calcium-induced conformational changes in S100 alpha alpha protein: The effect of acidic pH and calcium incubation on subunit exchange in S100a (alpha beta) protein. *The Journal of Biological Chemistry* 261, (18) (Jun 25): 8204-8212.
- Becker, T., V. Gerke, E. Kube, and K. Weber. 1992. S100P, a novel Ca²⁺-binding protein from human placenta. cDNA cloning, recombinant protein expression and Ca²⁺ binding properties. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 207, (2) (Jul 15): 541-547.
- Berryman, M., and A. Bretscher. 2000. Identification of a novel member of the chloride intracellular channel gene family (CLIC5) that associates with the actin cytoskeleton of placental microvilli. *Molecular Biology of the Cell* 11, (5) (May): 1509-1521.
- Berryman, M., Z. Franck, and A. Bretscher. 1993. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *Journal of Cell Science* 105 (Pt 4), (Pt 4) (Aug): 1025-1043.
- Berryman, M., R. Gary, and A. Bretscher. 1995. Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: A proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 131, (5) (Dec): 1231-1242.
- Bertin, M., I. Angriman, M. Scarpa, R. Mencarelli, R. Ranzato, C. Ruffolo, L. Polese, M. Iacobone, and D. F. D'Amico. 2007. Prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Hepato-Gastroenterology* 54, (73) (Jan-Feb): 124-128.

- Bonilha, V. L., M. E. Rayborn, I. Saotome, A. I. McClatchey, and J. G. Hollyfield. 2006. Microvilli defects in retinas of ezrin knockout mice. *Experimental Eye Research* 82, (4) (Apr): 720-729.
- Bourguignon, L. Y., H. Zhu, A. Chu, N. Iida, L. Zhang, and M. C. Hung. 1997. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *The Journal of Biological Chemistry* 272, (44) (Oct 31): 27913-27918.
- Boussac, M., and J. Garin. 2000. Calcium-dependent secretion in human neutrophils: A proteomic approach. *Electrophoresis* 21, (3) (Feb): 665-672.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, (May 7): 248-254.
- Bretscher, A. 1989. Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *The Journal of Cell Biology* 108, (3) (Mar): 921-930.
- Bretscher, A., K. Edwards, and R. G. Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: Integrators at the cell cortex. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology* 3, (8) (Aug): 586-599.
- Bretscher, A., R. Gary, and M. Berryman. 1995. Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry* 34, (51) (Dec 26): 16830-16837.
- Brown, M. J., R. Nijhara, J. A. Hallam, M. Gignac, K. M. Yamada, S. L. Erlandsen, J. Delon, M. Kruhlak, and S. Shaw. 2003. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood* 102, (12) (Dec 1): 3890-3899.
- Bruce, B., G. Khanna, L. Ren, G. Landberg, K. Jirstrom, C. Powell, A. Borczuk, et al. 2007. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clinical & Experimental Metastasis* 24, (2): 69-78.
- Cao, T. T., H. W. Deacon, D. Reczek, A. Bretscher, and M. von Zastrow. 1999. A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 401, (6750) (Sep 16): 286-290.
- Chambers, D. N., and A. Bretscher. 2005. Ezrin mutants affecting dimerization and activation. *Biochemistry* 44, (10) (Mar 15): 3926-3932.
- Chen, S. Y., and H. C. Chen. 2006. Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Molecular and Cellular Biology* 26, (13) (Jul): 5155-5167.
- Chuang, A. Y., A. M. DeMarzo, R. W. Veltri, R. B. Sharma, C. J. Bieberich, and J. I. Epstein. 2007. Immunohistochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 31, (8) (Aug): 1246-1255.
- Crepaldi, T., A. Gautreau, P. M. Comoglio, D. Louvard, and M. Arpin. 1997. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 138, (2) (Jul 28): 423-434.

- Curto, M., and A. I. McClatchey. 2004. Ezrin...a metastatic determinant? *Cancer Cell* 5, (2) (Feb): 113-114.
- Davey, G. E., P. Murmann, and C. W. Heizmann. 2001. Intracellular Ca²⁺ and Zn²⁺ levels regulate the alternative cell density-dependent secretion of S100B in human glioblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276, (33) (Aug 17): 30819-30826.
- Diakowski, W., M. Grzybek, and A. F. Sikorski. 2006. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochemica Et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 44, (4): 231-248.
- Diederichs, S., E. Bulk, B. Steffen, P. Ji, L. Tickenbrock, K. Lang, K. S. Zanker, et al. 2004. S100 family members and trypsinogens are predictors of distant metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 64, (16) (Aug 15): 5564-5569.
- Doi, Y., M. Itoh, S. Yonemura, S. Ishihara, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 1999. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *The Journal of Biological Chemistry* 274, (4) (Jan 22): 2315-2321.
- Donato, R. 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique* 60, (6) (Apr 15): 540-551.
- Donato R. 2001. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, (7) (Jul): 637-668.
- Downen, S. E., T. Crnogorac-Jurcevic, R. Gangeswaran, M. Hansen, J. J. Eloranta, V. Bhakta, T. A. Brentnall, J. Luttges, G. Kloppel, and N. R. Lemoine. 2005. Expression of S100P and its novel binding partner S100PBPR in early pancreatic cancer. *The American Journal of Pathology* 166, (1) (Jan): 81-92.
- Dransfield, D. T., A. J. Bradford, J. Smith, M. Martin, C. Roy, P. H. Mangeat, and J. R. Goldenring. 1997. Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *The EMBO Journal* 16, (1) (Jan 2): 35-43.
- Edwards, S. D., and N. H. Keep. 2001. The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: An analysis of structural changes on activation. *Biochemistry* 40, (24) (Jun 19): 7061-7068.
- Emoto, Y., R. Kobayashi, H. Akatsuka, and H. Hidaka. 1992. Purification and characterization of a new member of the S-100 protein family from human placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 182, (3) (Feb 14): 1246-1253.
- Fernandez-Fernandez, M. R., D. B. Veprintsev, and A. R. Fersht. 2005. Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, (13) (Mar 29): 4735-4740.
- Fievet, B. T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard, and M. Arpin. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *The Journal of Cell Biology* 164, (5) (Mar 1): 653-659.

- Foell, D., T. Kucharzik, M. Kraft, T. Vogl, C. Sorg, W. Domschke, and J. Roth. 2003. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut* 52, (6) (Jun): 847-853.
- Foell, D., H. Wittkowski, T. Vogl, and J. Roth. 2007. S100 proteins expressed in phagocytes: A novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of Leukocyte Biology* 81, (1) (Jan): 28-37.
- Fohr, U. G., C. W. Heizmann, D. Engelkamp, B. W. Schafer, and J. A. Cox. 1995. Purification and cation binding properties of the recombinant human S100 calcium-binding protein A3, an EF-hand motif protein with high affinity for zinc. *The Journal of Biological Chemistry* 270, (36) (Sep 8): 21056-21061.
- Fritz, G., T. Buchert, and P. M. Kroneck. 2002. The function of the [4Fe-4S] clusters and FAD in bacterial and archaeal adenylylsulfate reductases. evidence for flavin-catalyzed reduction of adenosine 5'-phosphosulfate. *The Journal of Biological Chemistry* 277, (29) (Jul 19): 26066-26073.
- Fuentes, M. K., S. S. Nigavekar, T. Arumugam, C. D. Logsdon, A. M. Schmidt, J. C. Park, and E. H. Huang. 2007. RAGE activation by S100P in colon cancer stimulates growth, migration, and cell signaling pathways. *Diseases of the Colon and Rectum* 50, (8) (Aug): 1230-1240.
- Garrett, S. C., K. M. Varney, D. J. Weber, and A. R. Bresnick. 2006. S100A4, a mediator of metastasis. *The Journal of Biological Chemistry* 281, (2) (Jan 13): 677-680.
- Gary, R., and A. Bretscher. 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Molecular Biology of the Cell* 6, (8) (Aug): 1061-1075.
- Gary, R., and A. Bretscher. 1993. Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, (22) (Nov 15): 10846-10850.
- Gerke, V., C. E. Creutz, and S. E. Moss. 2005. Annexins: Linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6, (6) (Jun): 449-461.
- Gribenko, A. V., J. E. Hopper, and G. I. Makhatadze. 2001. Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins. *Biochemistry* 40, (51) (Dec 25): 15538-15548.
- Guerreiro Da Silva, I. D., Y. F. Hu, I. H. Russo, X. Ao, A. M. Salicioni, X. Yang, and J. Russo. 2000. S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells in vitro and early stages of breast cancer development in vivo. *International Journal of Oncology* 16, (2) (Feb): 231-240.
- Hall, A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions* 33, (Pt 5) (Nov): 891-895.
- Hall, R. A., L. S. Ostedgaard, R. T. Premont, J. T. Blitzer, N. Rahman, M. J. Welsh, and R. J. Lefkowitz. 1998. A C-terminal motif found in the beta2-adrenergic receptor, P2Y1 receptor and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determines binding to the Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor family of PDZ proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, (15) (Jul 21): 8496-8501.

- Hall, R. A., R. T. Premont, C. W. Chow, J. T. Blitzer, J. A. Pitcher, A. Claing, R. H. Stoffel, et al. 1998. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392, (6676) (Apr 9): 626-630.
- Hamada, K., T. Shimizu, T. Matsui, S. Tsukita, and T. Hakoshima. 2000. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *The EMBO Journal* 19, (17) (Sep 1): 4449-4462.
- Hanzel, D. K., T. Urushidani, W. R. Usinger, A. Smolka, and J. G. Forte. 1989. Immunological localization of an 80-kDa phosphoprotein to the apical membrane of gastric parietal cells. *The American Journal of Physiology* 256, (6 Pt 1) (Jun): G1082-9.
- Hatakeyama, T., M. Okada, S. Shimamoto, Y. Kubota, and R. Kobayashi. 2004. Identification of intracellular target proteins of the calcium-signaling protein S100A12. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 271, (18) (Sep): 3765-3775.
- Heiska, L., K. Alfthan, M. Gronholm, P. Vilja, A. Vaheri, and O. Carpen. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 273, (34) (Aug 21): 21893-21900.
- Heizmann, C. W. 2005. The importance of calcium-binding proteins in childhood diseases. *The Journal of Pediatrics* 147, (6) (Dec): 731-738.
- Heizmann, C. W., G. Fritz, and B. W. Schafer. 2002. S100 proteins: Structure, functions and pathology. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 7, (May 1): d1356-68.
- Hirao, M., N. Sato, T. Kondo, S. Yonemura, M. Monden, T. Sasaki, Y. Takai, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1996. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: Possible involvement of phosphatidylinositol turnover and rho-dependent signaling pathway. *The Journal of Cell Biology* 135, (1) (Oct): 37-51.
- Hiscox, S., and W. G. Jiang. 1999. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *Journal of Cell Science* 112 Pt 18, (Sep): 3081-3090.
- Hofmann, M. A., S. Drury, C. Fu, W. Qu, A. Taguchi, Y. Lu, C. Avila, et al. 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97, (7) (Jun 25): 889-901.
- Hofmann, M. A., S. Drury, B. I. Hudson, M. R. Gleason, W. Qu, Y. Lu, E. Lalla, et al. 2002. RAGE and arthritis: The G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes and Immunity* 3, (3) (May): 123-135.
- Hughes, S. C., and R. G. Fehon. 2007. Understanding ERM proteins--the awesome power of genetics finally brought to bear. *Current Opinion in Cell Biology* 19, (1) (Feb): 51-56.
- Hughes, S. C., and R. G. Fehon. 2006. Phosphorylation and activity of the tumor suppressor merlin and the ERM protein moesin are coordinately regulated by the slik kinase. *The Journal of Cell Biology* 175, (2) (Oct 23): 305-313.
- Ishii, Y., T. Kasukabe, and Y. Honma. 2005. Immediate up-regulation of the calcium-binding protein S100P and its involvement in the cytokinin-induced differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1745, (2) (Sep 10): 156-165.

- Jin, G., S. Wang, X. Hu, Z. Jing, J. Chen, K. Ying, Y. Xie, and Y. Mao. 2003. Characterization of the tissue-specific expression of the s100P gene which encodes an EF-hand Ca²⁺-binding protein. *Molecular Biology Reports* 30, (4) (Dec): 243-248.
- Khanna, C., X. Wan, S. Bose, R. Cassaday, O. Olomu, A. Mendoza, C. Yeung, R. Gorlick, S. M. Hewitt, and L. J. Helman. 2004. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nature Medicine* 10, (2) (Feb): 182-186.
- Kligman, D., and D. C. Hilt. 1988. The S100 protein family. *Trends in Biochemical Sciences* 13, (11) (Nov): 437-443.
- Koltzsch, M., and V. Gerke. 2000. Identification of hydrophobic amino acid residues involved in the formation of S100P homodimers in vivo. *Biochemistry* 39, (31) (Aug 8): 9533-9539.
- Koltzsch, M., C. Neumann, S. König, and V. Gerke. 2003. Ca²⁺-dependent binding and activation of dormant ezrin by dimeric S100P. *Molecular Biology of the Cell* 14, (6) (Jun): 2372-2384.
- Koss, M., G. R. Pfeiffer 2nd, Y. Wang, S. T. Thomas, M. Yerukhimovich, W. A. Gaarde, C. M. Doerschuk, and Q. Wang. 2006. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by TNF- α and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176, (2) (Jan 15): 1218-1227.
- Krieg, J., and T. Hunter. 1992. Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *The Journal of Biological Chemistry* 267, (27) (Sep 25): 19258-19265.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, (5259) (Aug 15): 680-685.
- Lallemand, D., M. Curto, I. Saotome, M. Giovannini, and A. I. McClatchey. 2003. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes & Development* 17, (9) (May 1): 1090-1100.
- Lee, J. H., T. Katakai, T. Hara, H. Gonda, M. Sugai, and A. Shimizu. 2004. Roles of p-ERM and rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *The Journal of Cell Biology* 167, (2) (Oct 25): 327-337.
- Liang, J., G. Luo, X. Ning, Y. Shi, H. Zhai, S. Sun, H. Jin, et al. 2007. Differential expression of calcium-related genes in gastric cancer cells transfected with cellular prion protein. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 85, (3) (Jun): 375-383.
- Louvet-Vallee, S. 2000. ERM proteins: From cellular architecture to cell signaling. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 92, (5) (Aug): 305-316.
- Makitie, T., O. Carpen, A. Vaheri, and T. Kivela. 2001. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42, (11) (Oct): 2442-2449.
- Mandinova, A., D. Atar, B. W. Schafer, M. Spiess, U. Aebi, and C. W. Heizmann. 1998. Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 14), (Pt 14) (Jul 30): 2043-2054.

- Marenholz, I., C. W. Heizmann, and G. Fritz. 2004. S100 proteins in mouse and man: From evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, (4) (Oct 1): 1111-1122.
- Markowitz, J., I. Chen, R. Gitti, D. M. Baldisseri, Y. Pan, R. Udan, F. Carrier, A. D. MacKerell Jr, and D. J. Weber. 2004. Identification and characterization of small molecule inhibitors of the calcium-dependent S100B-p53 tumor suppressor interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, (21) (Oct 7): 5085-5093.
- Martin, M., C. Roy, P. Montcourrier, A. Sahuquet, and P. Mangeat. 1997. Three determinants in ezrin are responsible for cell extension activity. *Molecular Biology of the Cell* 8, (8) (Aug): 1543-1557.
- Martin, T. A., G. Harrison, R. E. Mansel, and W. G. Jiang. 2003. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Critical Reviews in oncology/hematology* 46, (2) (May): 165-186.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *The Journal of Cell Biology* 140, (3) (Feb 9): 647-657.
- Matsui, T., S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1999. Activation of ERM proteins in vivo by rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Current Biology : CB* 9, (21) (Nov 4): 1259-1262.
- McClatchey, A. I. 2003. Merlin and ERM proteins: Unappreciated roles in cancer development? *Nature Reviews. Cancer* 3, (11) (Nov): 877-883.
- McClatchey, A. I., and M. Giovannini. 2005. Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, merlin. *Genes & Development* 19, (19) (Oct 1): 2265-2277.
- McClintock, K. A., L. J. Van Eldik, and G. S. Shaw. 2002. The C-terminus and linker region of S100B exert dual control on protein-protein interactions with TRTK-12. *Biochemistry* 41, (17) (Apr 30): 5421-5428.
- Moore, B. W. 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19, (6) (Jun 9): 739-744.
- Morrison, H., L. S. Sherman, J. Legg, F. Banine, C. Isacke, C. A. Haipek, D. H. Gutmann, H. Ponta, and P. Herrlich. 2001. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes & Development* 15, (8) (Apr 15): 968-980.
- Most, P., A. Remppis, C. Weber, J. Bernotat, P. Ehlermann, S. T. Pleger, W. Kirsch, et al. 2003. The C terminus (amino acids 75-94) and the linker region (amino acids 42-54) of the Ca²⁺-binding protein S100A1 differentially enhance sarcoplasmic Ca²⁺ release in murine skinned skeletal muscle fibers. *The Journal of Biological Chemistry* 278, (29) (Jul 18): 26356-26364.
- Mousses, S., L. Bubendorf, U. Wagner, G. Hostetter, J. Kononen, R. Cornelison, N. Goldberger, et al. 2002. Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays. *Cancer Research* 62, (5) (Mar 1): 1256-1260.

- Mueller, A., B. W. Schafer, S. Ferrari, M. Weibel, M. Makek, M. Hochli, and C. W. Heizmann. 2005. The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280, (32) (Aug 12): 29186-29193.
- Nakamura, N., N. Oshiro, Y. Fukata, M. Amano, M. Fukata, S. Kuroda, Y. Matsuura, T. Leung, L. Lim, and K. Kaibuchi. 2000. Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 5, (7) (Jul): 571-581.
- Ng, T., M. Parsons, W. E. Hughes, J. Monypenny, D. Zicha, A. Gautreau, M. Arpin, et al. 2001. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *The EMBO Journal* 20, (11) (Jun 1): 2723-2741.
- Nguyen, R., D. Reczek, and A. Bretscher. 2001. Hierarchy of merlin and ezrin N- and C-terminal domain interactions in homo- and heterotypic associations and their relationship to binding of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP. *The Journal of Biological Chemistry* 276, (10) (Mar 9): 7621-7629.
- Niggli, V., C. Andreoli, C. Roy, and P. Mangeat. 1995. Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Letters* 376, (3) (Dec 4): 172-176.
- Ninomiya, I., T. Ohta, S. Fushida, Y. Endo, T. Hashimoto, M. Yagi, T. Fujimura, et al. 2001. Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 18, (4) (Apr): 715-720.
- Nollet, F., G. Berx, and F. van Roy. 1999. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Molecular Cell Biology Research Communications : MCBRC* 2, (2) (Aug): 77-85.
- Ohtani, K., H. Sakamoto, T. Rutherford, Z. Chen, A. Kikuchi, T. Yamamoto, K. Satoh, and F. Naftolin. 2002. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Letters* 179, (1) (May 8): 79-86.
- Ohuchida, K., K. Mizumoto, T. Egami, H. Yamaguchi, K. Fujii, H. Konomi, E. Nagai, K. Yamaguchi, M. Tsuneyoshi, and M. Tanaka. 2006. S100P is an early developmental marker of pancreatic carcinogenesis. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12, (18) (Sep 15): 5411-5416.
- Orian-Rousseau, V., L. Chen, J. P. Sleeman, P. Herrlich, and H. Ponta. 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-met signaling. *Genes & Development* 16, (23) (Dec 1): 3074-3086.
- Oshiro, N., Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 1998. Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *The Journal of Biological Chemistry* 273, (52) (Dec 25): 34663-34666.
- Ostendorp, T., E. Leclerc, A. Galichet, M. Koch, N. Demling, B. Weigle, C. W. Heizmann, P. M. Kroneck, and G. Fritz. 2007. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *The EMBO Journal* (Jul 26).

- Osterloh, D., V. V. Ivanenkov, and V. Gerke. 1998. Hydrophobic residues in the C-terminal region of S100A1 are essential for target protein binding but not for dimerization. *Cell Calcium* 24, (2) (Aug): 137-151.
- Pearson, M. A., D. Reczek, A. Bretscher, and P. A. Karplus. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101, (3) (Apr 28): 259-270.
- Pedrocchi, M., B. W. Schafer, I. Durussel, J. A. Cox, and C. W. Heizmann. 1994. Purification and characterization of the recombinant human calcium-binding S100 proteins CAPL and CACY. *Biochemistry* 33, (21) (May 31): 6732-6738.
- Pestonjamas, K., M. R. Amieva, C. P. Strassel, W. M. Nauseef, H. Furthmayr, and E. J. Luna. 1995. Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Molecular Biology of the Cell* 6, (3) (Mar): 247-259.
- Pietromonaco, S. F., P. C. Simons, A. Altman, and L. Elias. 1998. Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *The Journal of Biological Chemistry* 273, (13) (Mar 27): 7594-7603.
- Pujuguet, P., L. Del Maestro, A. Gautreau, D. Louvard, and M. Arpin. 2003. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Molecular Biology of the Cell* 14, (5) (May): 2181-2191.
- Rety, S., J. Sopkova, M. Renouard, D. Osterloh, V. Gerke, S. Tabaries, F. Russo-Marie, and A. Lewit-Bentley. 1999. The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nature Structural Biology* 6, (1) (Jan): 89-95.
- Rintala-Dempsey, A. C., L. Santamaria-Kisiel, Y. Liao, G. Lajoie, and G. S. Shaw. 2006. Insights into S100 target specificity examined by a new interaction between S100A11 and annexin A2. *Biochemistry* 45, (49) (Dec 12): 14695-14705.
- Rossy, J., M. C. Gutjahr, N. Blaser, D. Schlicht, and V. Niggli. 2007. Ezrin/moesin in motile walker 256 carcinosarcoma cells: Signal-dependent relocalization and role in migration. *Experimental Cell Research* 313, (6) (Apr 1): 1106-1120.
- Roy, C., M. Martin, and P. Mangeat. 1997. A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *The Journal of Biological Chemistry* 272, (32) (Aug 8): 20088-20095.
- Ruse, M., A. Lambert, N. Robinson, D. Ryan, K. J. Shon, and R. L. Eckert. 2001. S100A7, S100A10, and S100A11 are transglutaminase substrates. *Biochemistry* 40, (10) (Mar 13): 3167-3173.
- Russo, J., Y. F. Hu, I. D. Silva, and I. H. Russo. 2001. Cancer risk related to mammary gland structure and development. *Microscopy Research and Technique* 52, (2) (Jan 15): 204-223.
- Sainio, M., F. Zhao, L. Heiska, O. Turunen, M. den Bakker, E. Zwarthoff, M. Lutchman, et al. 1997. Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 110 (Pt 18), (Pt 18) (Sep): 2249-2260.

- Santamaria-Kisiel, L., A. C. Rintala-Dempsey, and G. S. Shaw. 2006. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *The Biochemical Journal* 396, (2) (Jun 1): 201-214.
- Sato, N., N. Fukushima, H. Matsubayashi, and M. Goggins. 2004. Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. *Oncogene* 23, (8) (Feb 26): 1531-1538.
- Schafer, B. W., and C. W. Heizmann. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences* 21, (4) (Apr): 134-140.
- Schmidt, A., and M. N. Hall. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, : 305-338.
- Schmidt, A. M., S. D. Yan, S. F. Yan, and D. M. Stern. 2001. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation* 108, (7) (Oct): 949-955.
- Schor, A. P., F. M. Carvalho, C. Kemp, I. D. Silva, and J. Russo. 2006. S100P calcium-binding protein expression is associated with high-risk proliferative lesions of the breast. *Oncology Reports* 15, (1) (Jan): 3-6.
- Schwartz-Albiez, R., A. Merling, H. Spring, P. Moller, and K. Koretz. 1995. Differential expression of the microspike-associated protein moesin in human tissues. *European Journal of Cell Biology* 67, (3) (Jul): 189-198.
- Shaw, A. S. 2001. FERMinG up the synapse. *Immunity* 15, (5) (Nov): 683-686.
- Shaw, G. S., R. S. Hodges, and B. D. Sykes. 1990. Calcium-induced peptide association to form an intact protein domain: 1H NMR structural evidence. *Science (New York, N.Y.)* 249, (4966) (Jul 20): 280-283.
- Sherman, L. S., T. A. Rizvi, S. Karyala, and N. Ratner. 2000. CD44 enhances neuregulin signaling by schwann cells. *The Journal of Cell Biology* 150, (5) (Sep 4): 1071-1084.
- Shiraishi, N., and M. Nishikimi. 1998. Suppression of copper-induced cellular damage by copper sequestration with S100b protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357, (2) (Sep 15): 225-230.
- Simons, P. C., S. F. Pietromonaco, D. Reczek, A. Bretscher, and L. Elias. 1998. C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253, (3) (Dec 30): 561-565.
- Smith, W. J., N. Nassar, A. Bretscher, R. A. Cerione, and P. A. Karplus. 2003. Structure of the active N-terminal domain of ezrin. conformational and mobility changes identify keystone interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 278, (7) (Feb 14): 4949-4956.
- Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Direct interaction of the rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the rho small G protein. *The Journal of Biological Chemistry* 272, (37) (Sep 12): 23371-23375.

- Thiery, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews.Cancer* 2, (6) (Jun): 442-454.
- Tran Quang, C., A. Gautreau, M. Arpin, and R. Treisman. 2000. Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the net and dbl oncogenes. *The EMBO Journal* 19, (17) (Sep 1): 4565-4576.
- Tsuda, M., Y. Makino, T. Iwahara, H. Nishihara, H. Sawa, K. Nagashima, H. Hanafusa, and S. Tanaka. 2004. Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 279, (45) (Nov 5): 46843-46850.
- Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, A. Kawai, and S. Tsukita. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *The Journal of Cell Biology* 126, (2) (Jul): 391-401.
- Turunen, O., T. Wahlstrom, and A. Vaheri. 1994. Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *The Journal of Cell Biology* 126, (6) (Sep): 1445-1453.
- Tynninen, O., O. Carpen, J. Jaaskelainen, T. Paavonen, and A. Paetau. 2004. Ezrin expression in tissue microarray of primary and recurrent gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 30, (5) (Oct): 472-477.
- Vaheri, A., O. Carpen, L. Heiska, T. S. Helander, J. Jaaskelainen, P. Majander-Nordenswan, M. Sainio, T. Timonen, and O. Turunen. 1997. The ezrin protein family: Membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Current Opinion in Cell Biology* 9, (5) (Oct): 659-666.
- Wang, G., A. Platt-Higgins, J. Carroll, S. de Silva Rudland, J. Winstanley, R. Barraclough, and P. S. Rudland. 2006. Induction of metastasis by S100P in a rat mammary model and its association with poor survival of breast cancer patients. *Cancer Research* 66, (2) (Jan 15): 1199-1207.
- Wang, G., S. Zhang, D. G. Fernig, D. Spiller, M. Martin-Fernandez, H. Zhang, Y. Ding, Z. Rao, P. S. Rudland, and R. Barraclough. 2004. Heterodimeric interaction and interfaces of S100A1 and S100P. *The Biochemical Journal* 382, (Pt 1) (Aug 15): 375-383.
- Wang, Q., M. Williamson, S. Bott, N. Brookman-Amisshah, A. Freeman, J. Nariculam, M. J. Hubank, A. Ahmed, and J. R. Masters. 2007. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* (May 7).
- Watanabe, Y., R. Kobayashi, T. Ishikawa, and H. Hidaka. 1992. Isolation and characterization of a calcium-binding protein derived from mRNA termed p9Ka, pEL-98, 18A2, or 42A by the newly synthesized vasorelaxant W-66 affinity chromatography. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 292, (2) (Feb 1): 563-569.
- Yan, S. S., Z. Y. Wu, H. P. Zhang, G. Furtado, X. Chen, S. F. Yan, A. M. Schmidt, et al. 2003. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nature Medicine* 9, (3) (Mar): 287-293.
- Yonemura, S., T. Matsui, S. Tsukita, and S. Tsukita. 2002. Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: An essential role for polyphosphoinositides in vivo. *Journal of Cell Science* 115, (Pt 12) (Jun 15): 2569-2580.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
A	Ampere
aa	<i>amino acids</i>
Abb.	Abbildung
ad.	auf
A. dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxidsulfat
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ca^{2+}	Calciumion
CaCl_2	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
C-ERMAD	<i>C-terminal ERM association domain</i>
CO_2	Kohlenstoffdioxid
C-terminal	carboxyterminal
Cu^{2+}	Kupferion
Da	Dalton
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	Dubelbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-Phosphat
DTT	Dithiothreitol
EBP50	<i>ERM binding phosphoprotein 50</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	<i>cell-extracellular-matrix</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-Hand	spezifisches Aminosäuremotiv in Proteinen
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(-2-aminoethylether)-N,N,N'-Tetraessigsäure
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
et al.	und andere ("et alii")
E3KARP	NHE Typ 3 Kinase A regulatorisches Protein
F	Farad
FACS	<i>fluorescent analysis cell sorter</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum
FERM Domäne	Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin Domäne
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
G-Protein	Guanylnucleotid-Protein
GSP	<i>gene specific primers</i>
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTP γ S	Guanosin-gamma-thiophosphat
h	Stunde
H	Helix
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks Zellen
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
H ₂ O	Wasser
HGF	hepatocyte growth factor
HIC	hydrophobe Wechselwirkungs-Chromatographie
ICAM2	<i>intracellular adhesion molecule-2</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Lambda
LB-Medium	Luria Bertani Medium
μ	micro (10^{-6})

m	milli (10^{-3})
M	molar
Mg ²⁺	Magnesiumion
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
n	nano (10^{-9})
N-ERMAD	<i>N-terminal ERM association domain</i>
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NSCLC	<i>non small cell lung cancer</i>
N-terminal	aminoterminal
Ω	Ohm
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p	Piko (10^{-12})
pa	permanent aktiv
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS ⁺⁺	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI4P5-Kinase	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	<i>post nuclear supernatant</i>
POX	Peroxidase
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
RAGE	Rezeptor für fortgeschrittene Glykosilierungsendprodukte
Rd(N) ₆	<i>random hexamers</i>
RhoGDI,	<i>Rho Guanine Dissociation Inhibitor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
sec	Sekunden
Ser	Aminosäure Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline with tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X100	Alkylphenylpolyethylenglycol (TX100)
U	Enzymeinheit Units
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VF	Verdünnungsfaktor
v/v	Volumen/Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
Zn ²⁺	Zinkion
z.B.	Zum Beispiel

8.2 Sequenzen

8.2.1 Sequenz Ezrin human (gi 31282)

```

1 M P K P I N V R V T T M D A E L E F A I
1 ATGCCGAAACCAATCAATGTCCGAGTTACCACCATGGATGCAGAGCTGGAGTTTGCAATC
21 Q P N T T G K Q L F D Q V V K T I G L R
61 CAGCCAAATACAACCTGGAAAACAGCTTTTTTGGATCAGGTGGTAAAGACTATCGGCCCTCCGG
41 E V W Y F G L H Y V D N K G F P T W L K
121 GAAGTGTGGTACTTTGGCCTCCACTATGTGGATAATAAAGGATTTCTACTCTGGCTGAAG
61 L D K K V S A Q E V R K E N P L Q F K F
181 CTGGATAAGAAGGTGTCTGCCAGGAGGTGAGGAAGGAGAATCCCCTCCAGTTCAAGTTC
81 R A K F Y P E D V A E E L I Q D I T Q K
241 CGGGCCAAGTTCTACCCTGAAGATGTGGCTGAGGAGCTCATCCAGGACATCACCCAGAAA
101 L F F L Q V K E G I L S D E I Y C P P E
301 CTTTTCTTCCCTCCAAGTGAAGGAAGGAATCCTTAGCGATGAGATCTACTGCCCCCTGAG
121 T A V L L G S Y A V Q A K F G D Y N K E
361 ACTGCCGTGCTCTTGGGGTCTACGCTGTGCAGGCCAAGTTTGGGGACTACAACAAAAGAA
141 V H K S G Y L S S E R L I P Q R V M D Q
421 GTGCACAAGTCTGGGTACCTCAGCTCTGAGCGGCTGATCCCTCAAAGAGTGATGGACCAG
161 H K L T R D Q W E D R I Q V W H A E H R
481 CACAACTTACCAGGGACAGTGGGAGGACCGGATCCAGGTGTGGCATGCGGAACACCGT
181 G M L K D A M L E Y L K I A Q D L E M
541 GGGATGCTCAAAGATAATGCTATGTTGGAATACCTGAAGATTGCTCAGGACCTGGAAATG
201 Y G I N Y F E I K N K K G T D L W L G V
601 TATGGAATCAACTATTTTCGAGATAAAAAACAAGAAAGGAACAGACCTTTGGCTTGGAGTT
221 D A L G L N I Y E K D D K L T P K I G F
661 GATGCCCTTGGACTGAATATTTATGAGAAAAGATGATAAGTTAACCCCAAAGATTGGCTTT
241 P W S E I R N I S F N D K K F V I K P I
721 CTTTGGAGTGAAATCAGGAACATCTCTTTCAATGACAAAAAGTTTGTCAATAAACCCATC
261 D K K A P D F V F Y A P R L R I N K R I
781 GACAAGAAGGCACCTGACTTTGTGTTTTATGCCCCACGTCTGAGAATCAACAAGCGGATC
281 L Q L C M G N H E L Y M R R R K P D T I
841 CTGCAGCTCTGCATGGGCAACCATGAGTTGTATATGCGCCGCAGGAAGCCTGACACCATC
301 E V Q Q M K A Q A R E E K H Q K Q L E R
901 GAGGTGCAGCAGATGAAGGCCAGGCCCGGGAGGAGAAGCATCAGAAGCAGCTGGAGCGG
321 Q Q L E T E K K R R E T V E R E K E Q M
961 CAACAGCTGGAAACAGAGAAGAAAAGGAGAGAAAACCGTGGAGAGAGAGAAAAGAGCAGATG
341 M R E K E E L M L R L Q D Y E E K T K K
1021 ATGCGCGAGAAGGAGGAGTTGATGCTGCGGCTGCAGGACTATGAGGAGAAGCAAAGAAG
361 A E R E G L S E Q I Q R A L Q L E E R K
1081 GCAGAGAGAGAGCTCTCGGAGCAGATTGAGAGGGCCCTGCAGCTGGAGGAGAGAGGAAG
381 R A Q E E A E R L E A D R M A A L R A K
1141 CGGGCACAGGAGGAGGCCGAGCGCTAGAGGCTGACCGTATGGCTGCACTGCGGGCTAAG
401 E E L E R Q A V D Q I K S Q E Q L A A E
1201 GAGGAGCTGGAGAGACAGGCGGTGGATCAGATAAAGAGCCAGGAGCAGCTGGCTGCGGAG
421 L A E Y T A K I A L L E E A R R R K E D
1261 CTTGCAGAATACACAGCCAAGATTGCCCTCCTGGAAGAGGCGCGGAGGCGCAAGGAGGAT
441 E V E E W Q H R A K E A Q D D L V K T K
1321 GAAGTTGAAGAGTGGCAGCACAGGGCCAAAGAAGCCCAGGATGACCTGGTGAAGACCAAG
461 E E L H L V M T A P P P P P P P V Y E P
1381 GAGGAGCTGCACCTGGTGTATGACAGCACCCCCGCCCCACCACCCCCCGTGTACGAGCCC
481 V S Y H V Q E S L Q D E G A E P T G Y S
1441 GTGAGCTACCATGTCCAGGAGAGCTTGCAGGATGAGGGCGCAGAGCCCACGGGCTACAGC
501 A E L S S E G I R D D R N E E K R I T E
1501 GCGGAGCTGTCTAGTGAGGGCATCCGGGATGACCGCAATGAGGAGAAGCGCATCACTGAG
521 A E K N E R V Q R Q L V T L S S E L S Q
1561 GCAGAGAAGAACGAGCGTGTGCAGCGGCAGCTCGTGACGCTGAGCAGGCTGTCCCAG
541 A R D E N K R T H N D I I H N E N M R Q
1621 GCCCGAGATGAGAATAAGAGGACCCACAATGACATCATCCACAACGAGAACATGAGGCAA
561 G R D K Y K T L R Q I R Q G N T K Q R I

```

1681 GGCCGGGACAAGTACAAGACGCTGCGGCAGATCCGGCAGGGCAACACCAAGCAGCGCATC
581 D E F E A L *
1741 GACGAGTTCGAGGCCCTGTAA

8.2.2 Sequenz S100P human (gi 36177)

1 M T E L E T A M G M I I D V F S R Y S G
1 ATGACGGAAGTAGAGACAGCCATGGGCATGATCATAGACGTCTTTTCCCGATATTCGGGC
21 S E G S T Q T L T K G E L K V L M E K E
61 AGCGAGGGCAGCACGCAGACCCTGACCAAGGGGGAGCTCAAGGTGCTGATGGAGAAGGAG
41 L P G F L Q S G K D K D A V D K L L K D
121 CTACCAGGCTTCCTGCAGAGTGGAAAAGACAAGGATGCCGTGGATAAATTGCTCAAGGAC
61 L D A N G D A Q V D F S E F I V F V A A
181 CTGGACGCCAATGGAGATGCCAGGTGGACTTCAGTGAGTTCATCGTGTTCGTGGCTGCA
81 I T S A C H K Y F E K A G L K *
241 ATCACGTCTGCCTGTCAACAAGTACTTTGAGAAGGCAGGACTCAAATGA

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

- **Austermann J.**, Gerke V.
The Ca²⁺-dependent S100P-ezrin interaction promotes transendothelial tumor cell migration
(Manuskript in Vorbereitung)
- **Austermann J.**, Fritz G.; Gerke V.
Construction and characterization of a dominant active S100P mutant
(Manuskript in Vorbereitung)
- Herrig A., Janke M., **Austermann J.**; Gerke V., Janshoff A. & Steinem C. **2006**
Cooperative adsorption of ezrin on PIP₂-containing membranes
Biochemistry, 45(43), 13025-34
- Radke S., **Austermann J.**, Russo-Marie F., Gerke V., Rescher U. **2004**
Specific association of annexin 1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain.
FEBS Lett. 2004 Dec 3;578(1-2):95-8.

Tagungsbeiträge

Vorträge:

- “S100P: a novel activator of ezrin”
ECS Workshop 2007, Juni 2007, Seix

Posterpräsentationen:

- “Characterization of the S100P mediated ezrin activation”
9th Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells, Juli 2006,
Strasbourg
- “Characterization of the S100P mediated ezrin activation”
29th Annual Meeting of the German Society of Cell Biology, März 2006,
Braunschweig
- “Characterization of the Ca²⁺-regulated S100P-ezrin interaction”
Annual Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology, September
2004, Münster
- “Characterization of the Ca²⁺-regulated S100P-ezrin interaction”
8th European Symposium on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells,
Juli 2004, Cambridge

Lebenslauf

Judith Austermann

geboren am 15.03.1978 in Münster

Familienstand: ledig

Name des Vaters: Ludger Austermann

Name der Mutter: Edith Austermann geb. Schintag

Schulbildung: Grundschule: von 1984 bis 1988 in Sendenhorst
Realschule: von 1988 bis 1994 in Sendenhorst
Gymnasium: von 1994 bis 1997 in Münster

Hochschulreife (*Abitur*): am 03.06.1997 in Münster

Studium: Biologie
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
WS 1997 / 98 bis August 2003

Prüfungen: Diplom im Fach Biologie am 27.08.2003 an der
Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

Promotionsstudiengang: 15.09.2003

Tätigkeit: Wissenschaftliche Mitarbeiterin: 15.09.2003

Beginn der Dissertation September 2003;
am Institut für Medizinische Biochemie in Münster;
unter der Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. V. Gerke

Judith Austermann

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Volker Gerke für die Bereitstellung des interessanten Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft sowie die uneingeschränkte Unterstützung dieser Doktorarbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei den Herren Prof. Dr. Alexander Schmidt und Prof. Dr. Martin Bähler für die Begutachtung und Vertretung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie bedanken.

Herrn Dr. Günter Fritz danke ich für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Proteinkristallisation sowie die wertvollen Diskussionen und Anregungen zur Proteinaufreinigung.

Herrn Dr. Carsten Müller Tidow und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die hervorragende Kooperation im Bereich der Tumorzellmigration.

Alexander Herrig danke ich für die netten Besuche in Münster und die stets gute Zusammenarbeit.

Bei meinen „Projektkameraden“ Annika, Björn und Michaela möchte ich mich besonders für die gegenseitige Unterstützung, die Hilfsbereitschaft und den Spaß im Laboralltag bedanken.

Allen aktuellen, sowie ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die nette Zeit im ZMBE.

Marco, Michaela, Annika und Sebastian danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Michaela, Julia, Annika und Vera danke ich für die gute Kameradschaft und die Abwechslung vom Laboralltag.

Mein ganz herzlicher Dank gilt allen meinen Freunden und Verwandten, die mich immer unterstützen.

Claas danke ich dafür, dass ich mich immer auf ihn verlassen konnte und er stets aufmunternde Worte fand.

Besonders meinen Eltern und Ulrike, die mich während dieser Zeit immer begleitet haben, sage ich:

Dankeschön!

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Münster, 01.10.07

Judith Austermann