

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Prof. Dr. rer. nat. Aymelt Itzen

**Rolle der Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 für das metastatische
Potential von Mammakarzinomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Juliana Schattschneider

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.07.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Sabine Windhorst

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Abstract.....	7
Einleitung	8
Mammakarzinom.....	9
Metastasierung.....	10
Blut-Hirn-Schranke	13
Therapie des Mammakarzinoms.....	14
Paclitaxel	15
Mikrotubuli.....	17
Spindelapparat	19
Posttranslationale Modifikationen an Mikrotubuli.....	20
Tubulin Tyrosine Ligase Like 4.....	21
Intrazelluläres Trafficking	23
Zielsetzung	25
Material und Methoden	26
Material.....	26
Methoden.....	33
Klonierung.....	33
Plasmidpräparation	33
Bestimmung der DNA-Konzentration.....	34
Polymerase-Kettenreaktion/PCR.....	34
PCR-Produktreinigung	35
Poly-T-Addition an DNA	35
pGEM-T easy Ligation.....	35
Transformation in XL-1-Blue Bakterien	35
Bakterien-Klon-Expansion.....	36
Not 1-Testverdau	36
Sequenzierung	36
Präparativer Verdau	37
Gelextraktion / Gel-clean up.....	37
Klonierung in den Zielvektor	37
Transformation in XL-1-Blue-Bakterien.....	38
Sequenzierung	38
Plasmidpräparation - Midi-Prep	38
Komplettsequenzierung der TTLL4-DNA	39
Kultur von Mammakarzinomzellen.....	39

Zellkultur	39
lentivirale Transduktion.....	39
Lagerung von Mammakarzinomzellen in flüssigem Stickstoff.....	40
Entnahme von Mammakarzinomzellen aus flüssigem Stickstoff.....	41
Vervielfältigung von Mammakarzinomzellen	41
CASY-Zellzählung	41
Proteinlysatpräparation aus Mammakarzinomzellen.....	42
Proteinbestimmung mittels Bradford Assay	42
SDS-PAGE	42
Western Blot	43
RNA-Extraktion	45
Reverse Transkription.....	45
RT-PCR.....	46
qPCR.....	46
Transwell	47
Sphäroide.....	48
F-Aktin-Färbung durch Alexa-fluor488-gekoppeltem Phalloidin.....	48
VASP-Färbung durch Immunofluoreszenz.....	49
Scratch Assay.....	49
Adhäsionsassay.....	50
Adhäsionsassay auf Endothelzellen	51
MTT Assay	52
Bestimmung der F-Aktin-Konzentration.....	53
Vesikeltransport	53
Ergebnisse.....	54
Klonierung von TTLL4	54
Nachweis der TTLL4-Überexpression mittels Western Blot und qPCR.....	56
Effekt von TTLL4 auf die Transmigration und die Migration	58
Effekt von TTLL4 auf die Adhäsion	60
Einfluss von TTLL4 auf das Zellwachstum	61
Effekt von TTLL4 auf das Aktin-Zytoskelett.....	63
Einfluss von TTLL4 auf den Vesikeltransport.....	65
Diskussion	66
Überexpression von TTLL4 in MDA-MB-231-Zellen und daraus folgende Mikrotubuliglutamylierung	66
Effekt von TTLL4 auf den Vesikeltransport.....	68
Einfluss von TTLL4 auf das metastatische Potential in vitro	69
Potentiell durch TTLL4 verursachte Veränderung des Aktin-Zytoskeletts	70

Zusammenfassende Schlussfolgerung.....	72
Abkürzungsverzeichnis	74
Abbildungsverzeichnis	77
Tabellenverzeichnis	78
Literaturverzeichnis	79
Anhang	85
Danksagung	93
Lebenslauf	94
Eidesstattliche Versicherung.....	95

Zusammenfassung

Das TTLL4-Potein (Tubulin Tyrosine Ligase Like 4) ist eine Polyglutamylase und durch die posttranslationale Polyglutamylierung von Mikrotubuli an unterschiedlichsten zellulären Prozessen beteiligt. Da ein Zusammenhang zwischen einer TTLL4-Überexpression und der Hirnmetastasierung von Mammakarzinomen beobachtet werden konnte, war es in dieser Arbeit von Interesse zu untersuchen, ob Mammakarzinome und deren Metastasierung auch in vitro von der TTLL4-Überexpression (TTLL4^{plus}) beeinflusst werden. Hierzu erfolgte die Klonierung und die Überexpression von TTLL4 in MDA-MB-231-Zellen. Die erfolgreiche Überexpression von TTLL4 in den MDA-MB-231-Zellen konnte mittels Westernblot und qPCR nachgewiesen werden. Weiterhin wurden die Transmigration, Migration, Adhäsion, die Adhäsion auf Endothelzellen, das Zellwachstums, der Vesikeltransport und der Effekte auf das Aktin-Zytoskelett untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TTLL4^{plus} den Vesikeltransport beschleunigt und die Adhäsion der MDA-MB-231-Zellen auf Kollagen I und Kollagen IV verbessert.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Migration und Trasmigration der Zellen durch TTLL4^{plus} nicht signifikant beeinflusst werden. Das Aktin-Zytoskelett und die Viabilität der Zellen blieben trotz TTLL4^{plus} ebenfalls unverändert.

Zukünftig wäre es interessant zu untersuchen, ob und wie der Effekt von TTLL4 auf die Adhäsion und den Vesikeltransport mit der Glutamylierung von Mikrotubuli zusammenhängt.

Abstract

The TTLL4 protein is a polyglutamylase and is involved in a wide variety of cellular processes through the post-translational polyglutamylation of microtubules. Since a connection between TTLL4 overexpression and brain metastasis from breast cancer has been observed, this work aimed to examine whether breast cancer and its metastasis are also influenced by TTLL4 overexpression (TTLL4^{plus}) in vitro. For this purpose, TTLL4 was cloned and overexpressed in MDA-MB-231 cells. The successful overexpression of TTLL4 in the MDA-MB-231 cells was demonstrated by Western blot and qPCR. Furthermore, additional experiments were carried out assessing transmigration, migration, adhesion, adhesion to endothelial cells, cell growth, vesicle transport and the effects on the actin cytoskeleton. Overall, the study showed that TTLL4^{plus} seemed to accelerate vesicle transport and improve adhesion of MDA-MB-231 cells to collagen I and collagen IV.

Furthermore, cell migration and transmigration were not significantly affected by TTLL4^{plus}. The actin cytoskeleton and the viability of the cells also remain unchanged despite TTLL4^{plus}.

In future studies it would be interesting to analyze if the effects of TTLL4 on vesicle trafficking and adhesion are related to glutamylation of microtubule.

Einleitung

Das Mammakarzinom ist eines der häufigsten Karzinome bei Frauen und deren Therapie stellt weiterhin eine große Herausforderung dar. Dieses Karzinom metastasiert in unterschiedliche Organe, unter anderem in das Gehirn. In Untersuchungen von Gewebeproben konnte eine Korrelation zwischen der Metastasierung in das Gehirn und einer Überexpression von TTLL4 beobachtet werden. Diese Arbeit basiert auf Grundlage dieser Erkenntnisse und konzentriert sich auf TTLL4 und dessen Überexpression in Mammakarzinomzellen, die in der Lage sind, in das Gehirn zu metastasieren. In folgendem Text wird auf das Mammakarzinom, dessen Metastasierung, auf TTLL4 und die durch dieses beeinflussten Strukturen und Vorgänge, eingegangen. Hierzu wird zunächst der theoretische Hintergrund erklärt, dann die Zielsetzung der Arbeit erläutert, gefolgt von Materialien und Versuchsdurchführungen und der Präsentation der Ergebnisse mit anschließender Diskussion.

Mammakarzinom

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung mit einem Anteil von 24 % aller neu aufgetretenen Krebserkrankungen und 18 % aller an Krebs verstorbenen Frauen dar. Im Jahr 2000 gab es jährlich ungefähr 46000 bis 50000 Neuerkrankungen in Deutschland, bei einem Durchschnittsalter von 63,9 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 77 % (Kreienberg et al. 2006). Weltweit sind steigende Inzidenzen und Sterberaten zu verzeichnen und es wird erwartet, dass diese in den nächsten Jahren weiterhin steigen werden. Auch bei Frauen unter 45 Jahren steigt die Rate derer, die an Brustkrebs versterben (Anastasiadi et al. 2017).

Ein multifaktorielles Geschehen führt zum Auftreten von Mammakarzinomen. Mehr als 90 % aller Mammakarzinome entstehen spontan, ungefähr 5 % der Mammakarzinome sind hereditär, wobei bei etwa der Hälfte der Patienten eine Mutation in den Breast-Cancer-Genen, BRCA1 und BRCA2, vorliegt (Kiechle 2011). Zu den Risikofaktoren zählen das Alter, die familiäre Disposition mit einer Erhöhung des Risikos bei erkrankten Verwandten ersten Grades, Keimbahnmutationen im BRCA-Gen und eine bereits stattgefundenen Erkrankung an einem Mammakarzinom in der Vergangenheit. Weitere Risikofaktoren können eine frühe Menarche oder späte Menopause, Übergewicht, spätes oder kein Gebären und eine Hormonsubstitution darstellen. Einige der genannten Risikofaktoren führen zu einer erhöhten oder verlängerten Östrogenausschüttung im Körper, was mit vermehrtem Auftreten von Brustkrebs in Verbindung gebracht werden kann (Kreienberg et al. 2006).

Mögliche Symptome des Mammakarzinoms sind tastbare Knoten in der Brust, vergrößerte Lymphknoten, selten Schmerzen, einseitige Mamillensekretion, ekzematöse Veränderungen der Brustwarze, Mamillenretraktion, Größen- oder Formveränderung der Brust und entzündliche Veränderungen und Hauterscheinungen, wie die so genannte Orangenhaut. Um die Diagnose des Mammakarzinoms zu sichern, sollten eine Anamnese, die körperliche Untersuchung mit Inspektion und Palpation, bildgebende Verfahren, wie die Sonographie und die Mammographie und, wenn nötig, eine histologische Sicherung mittels Biopsie durchgeführt werden.

Die häufigsten histologischen Typen des Mammakarzinoms sind das invasiv-duktales Karzinom, welches von den Milchgängen ausgeht und das invasiv-lobuläre Karzinom, welches von den Drüsenläppchen ausgeht. Eine gemischte Form kann ebenfalls auftreten.

Weitere Subtypen, die jedoch selten auftreten, sind unter anderem das medulläre, das tubuläre, das muzinöse und das papilläre Karzinom (Kiechle 2011).

Weitere Unterschiede beim Mammakarzinom gibt es hinsichtlich der Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie des Transmembranösen Wachstumsfaktorrezeptors 2 (HER2). 70 % der betroffenen Patienten haben Mammakarzinome welche Hormonrezeptor positiv und HER2 negativ sind, 15-20 % sind HER2 positiv und 15 % der Mammakarzinome sind Triple negativ (TNBC), das bedeutet Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptor negativ. Bei der medikamentösen und endokrinologischen Therapie gibt es ebenfalls Unterschiede. Patienten mit Hormonrezeptor positiven Mammakarzinomen sprechen gut auf eine endokrine Therapie an und können in einigen Fällen zusätzlich mit einer Chemotherapie behandelt werden. HER2 positive Tumore sprechen gut auf die Antikörpertherapie und eine Therapie mit Anthracyclinen und Taxanen an. Diese können ebenfalls in Kombination mit einer Chemotherapie erfolgen. Triple negative Mammakarzinome können neben der chirurgischen und der Strahlentherapie nur mit einer Chemotherapie behandelt werden und sprechen auf keine gezielte Therapie an. Hier kann weder eine endokrine, noch eine Antikörpertherapie erfolgen (Waks und Winer 2019).

Metastasierung

Das Mammakarzinom ist eine Krebsart, die in verschiedene Organe metastasieren kann. Am häufigsten von Metastasen betroffen sind die Knochen, die Lunge, die Leber und das Gehirn. Ein großer Anteil der Patienten, die an Brustkrebs versterben, versterben nicht aufgrund des Primärtumors, sondern aufgrund der bereits stattgefundenen Metastasierung in andere Organe (Scully et al. 2012). Dies ist sogar bei annähernd 90 % der an Krebs versterbenden Patienten der Fall. Bei 25 % bis 50 % der an Brustkrebs erkrankten Patienten kommt es noch Jahrzehnte nach der Diagnose und der Entfernung des Primärtumors zu einem Auftreten von Metastasen, die auch zum Tod führen können (Kozłowski et al. 2015).

Sind bereits Lymphknoten befallen, hat der Primärtumor schon eine bestimmte Größe erreicht und ist das Tumorgewebe schlecht oder nicht differenziert, steigt auch das gesamte Risiko der Fernmetastasenbildung im Körper. Somit zählen diese Eigenschaften zu den prognostischen Markern für die Metastasierung bei Brustkrebs.

Die Angioinvasion, das Level des uPA/PAI1-Proteins, die Vervielfältigung des HER2-Gens, das Profil der Gen-Expression und die Expression von Steroid-Rezeptoren gehören ebenfalls dazu (Weigelt et al. 2005).

Eine Erklärung der Entstehung von Metastasen ist in folgender Abbildung 1 dargestellt.

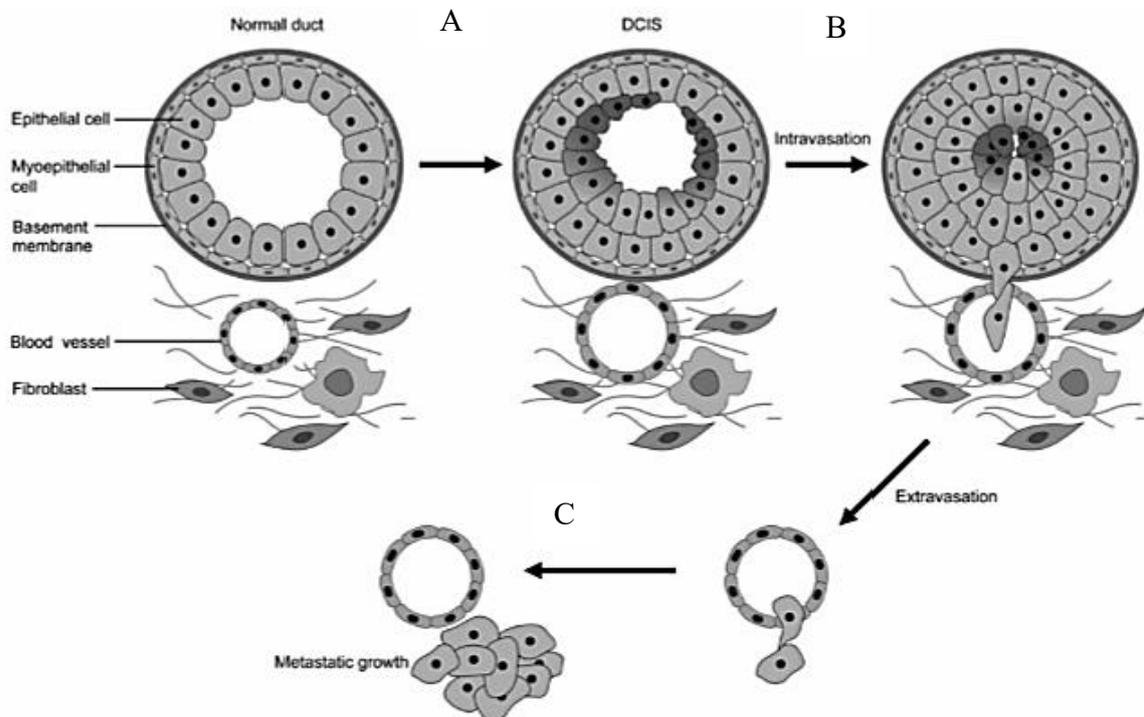


Abbildung 1 Metastasierung des Mammakarzinoms; **(A)** Primärtumor, **(B)** Infiltration von umliegendem Gewebe und Blut- oder Lymphgefäßen, **(C)** Extravasation innerhalb weiterer Organe, **(D)** Proliferation der Tumorzellen im betroffenen Organ. (Scully et al. 2012).

Zunächst kommt es zu einer Angiogenese in der Umgebung und innerhalb des Primärtumors. Eine vorhandene Hypoxie und die Ausschüttung von Zytokinen, wie TNF-alpha, VEGF und Interleukin 8, beschleunigen die Angiogenese (Kozłowski et al. 2015). Die Tumorzellen des Primärtumors beginnen dann das umgebende Gewebe zu infiltrieren. Hierzu müssen die Zellen beweglich sein, was durch eine Herunterregulierung von E-Cadherin und einer Veränderung der Zell-zu-Zell-Adhäsion ermöglicht wird. Die Zellen können sich einzeln oder kollektiv bewegen. Bei der Migration einzelner Zellen ist diese entweder eine proteaseabhängige mesenchymale Bewegung, oder eine amöboide Bewegung. Bei der amöboiden Bewegung können die Zellen ihre Form verändern und so durch kleine Poren der Matrix gelangen (Scully et al. 2012).

Da die Gefäße innerhalb des Tumors durchlässiger als normale Blutgefäße sind, gelangen die Tumorzellen in die Blutgefäße und somit in den systemischen Kreislauf. Auch in die Lymphgefäße können Tumorzellen gelangen und sich so im Körper verteilen und zu weiteren Organen gelangen. Nach einem Arrest des Zellzyklus heften sich die Tumorzellen an die Endothelzellen und somit an die Kapillarwände der Zielorgane an und es kann zu einer Extravasation der Zellen kommen. Die Tumorzellen gelangen in das Organparenchym, wo sie sich erneut vermehren können. Dies hängt unter anderem mit dem vermehrten Auftreten von N-Cadherin und Integrinen zusammen, wodurch die Tumorzellen sich an Stromazellen heften können und ins Stroma gelangen. Eine Anheftung der Tumorzellen ist ebenfalls durch das Vorhandensein von extrazellulärem Fibronectin, Laminin, Kollagen, Fibrinogen und Vitronectin möglich, da hier Bindungsstellen für Zellrezeptoren zu finden sind. Zusätzlich kommt es zu einer Angiogenese, die der Versorgung der Tumorzellen dient. Ob es zur Metastasenbildung und Angiogenese in Organen kommt, hängt ebenfalls von dem Tumormikromilieu ab, da die Tumorzellen mit Bestandteilen des Stromas und umgebenden Zellen interagieren. Weiterhin führen unter anderem Mutationen, entzündliche Prozesse, die Ausschüttung von Signalmolekülen und die Hypoxie zu einer Angiogenese. Die so entstehenden Blutgefäße versorgen den Tumor nicht ausreichend mit Sauerstoff, was erneut zu einer Hypoxie führt, wodurch noch mehr pro-angiogenetische Faktoren, wie VEGF, ausgeschüttet werden und die Angiogenese verstärkt wird. Die Primärmetastasen können weitere Metastasen bilden, welche als Sekundär- oder Tertiärmetastasen bezeichnet werden. Während der Metastasierung werden das Immunsystem des Patienten geschwächt und die apoptotischen Vorgänge minimiert.

Die Diagnostik erfolgt aufgrund der Symptomatik, durch Biopsien, bildgebende Verfahren und Tumormarker im Blut (Scully et al. 2012; Kozłowski et al. 2015).

Blut-Hirn-Schranke

Eins der Organe, in welches das Mammakarzinom häufig metastasiert, ist das Gehirn. Bei ungefähr 30 % der Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom entstehen trotz erfolgter systemische Therapie Metastasen im Gehirn (Bublak 2019). Jedoch ist es für die malignen Zellen schwieriger in das Gehirn als in andere Organe zu gelangen, da das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt wird. Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus unterschiedlichen Zellen sowie aus nicht zellulären Bestandteilen und dient der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns, der Regulierung welche Substanzen passieren können und der Vermittlung zwischen der Peripherie und dem zentralen Nervensystem. So wird eine für die Neuronen ideale Umgebung geschaffen. Die Blut-Hirn-Schranke ist ebenfalls dafür zuständig, Signale von der Peripherie in das Gehirn und umgekehrt weiterzuleiten und die Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr sowie die Ausschleusung von Toxinen zu kontrollieren (Obermeier et al. 2016).

Der Aufbau der Blut-Hirn-Schranke wird in folgender Abbildung 2 verdeutlicht.

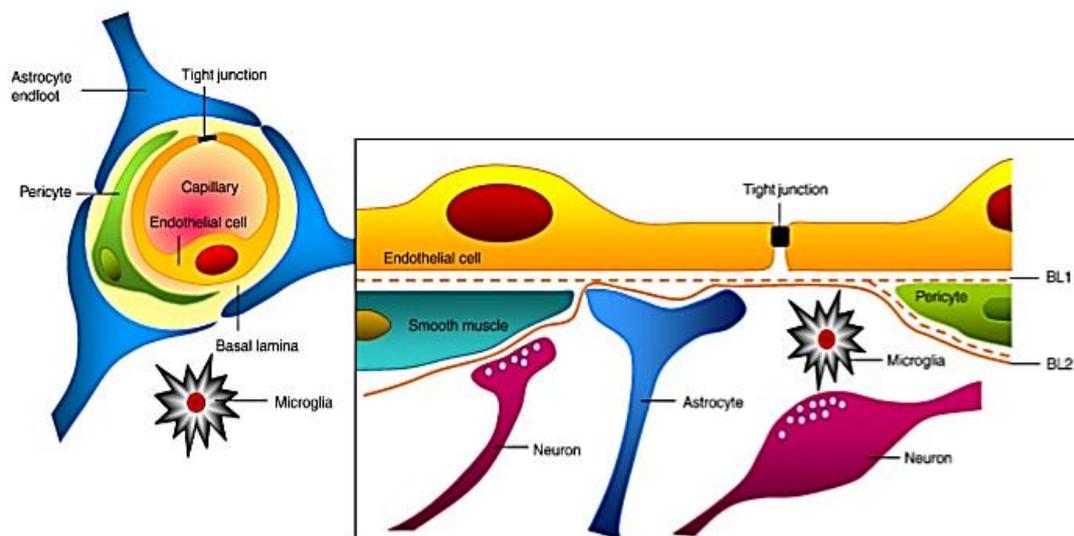


Abbildung 2 Blut-Hirn-Schranke; Die Abbildung zeigt eine Kapillare und verschiedene Zellen, die die Blut-Hirn-Schranke bilden. Zu sehen sind die luminal gelegenen Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten, sowie Neuronen und Mikrogliazellen.

(Abbott et al. 2010).

Einen wichtigen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke stellen die Endothelzellen dar. Sie bilden die innere Gefäßwand der Blutgefäße, in diesem Fall die Intima der Kapillaren. Sie sind durch Tight Junctions und Adherens Junctions eng miteinander verbunden und bilden so eine Diffusionsbarriere, wodurch die Diffusion von hydrophilen Substanzen eingeschränkt wird. Transportmoleküle und Enzyme regulieren den transzellulären Transport (Obermeier et al. 2016; Obermeier et al. 2013; Abbott et al. 2006).

Eine Basalmembran, in welche Perizyten eingebettet sind, ist ebenfalls Teil der Blut-Hirn-Schranke. Sie besteht größtenteils aus Typ-IV-Kollagen, Laminin, Perlecan und Nidogen. Zusätzliche Bestandteile sind Fibronectin, Glykosaminoglykane, Agrin und Osteonectin (Obermeier et al. 2016; Hallmann et al. 2005). Die Perizyten können als Teil der Basalmembran bis zu 40 % der Außenwände der zerebralen Gefäße bedecken. Ihre Aufgabe ist es den Gefäßdurchmesser und den Blutfluss, sowie die Permeabilität der Gefäße durch Einfluss auf die Endothelzellen zu regulieren. An der abluminalen Seite der Blut-Hirn-Schranke bilden Astrozyten Ausläufer aus, deren Endfüße die Gefäße umschließen. Sie bedecken bis zu 99 % der zerebralen Gefäße, indem sie die Basalmembran mit den Perizyten umschließen (Obermeier et al. 2016; Mathiisen et al. 2010). Weitere Zellen, die einen Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke haben, sind die Neuronen und Mikrogliazellen. Zwischen den einzelnen Zellen der Blut-Hirn-Schranke besteht eine Kommunikation. Sollte diese gestört sein, kann dies dazu führen, dass Pathogene und Toxine in das zentrale Nervensystem gelangen (Obermeier et al. 2016).

Therapie des Mammakarzinoms

In der Therapie des Mammakarzinoms gab es in den letzten Jahren einige Fortschritte, wodurch die Überlebensrate der erkrankten Personen stieg. Ein zu nennender Fortschritt ist die endokrine Therapie mit Trastuzumab, welche bei HER2 positiven Karzinomen angewendet wird, jedoch nur für 20 % der Patienten relevant ist. Es gibt mehrere unterschiedliche Therapiemethoden, von denen einige im nachfolgenden Text beschrieben werden. Dennoch kommt es weiterhin zu häufigen Rezidiven und dem Fortschreiten der Erkrankung. Zusätzlich haben viele dieser Therapien auch unerwünschte Nebenwirkungen.

Mögliche Therapieformen beim Mammakarzinom sind die brusterhaltende operative Therapie mit vollständiger Entfernung des Tumorgewebes, eine Mastektomie, die adjuvante Strahlentherapie, wenn nötig die Entfernung der axillären Lymphknoten, eine endokrine Systemtherapie wie die antihormonelle Therapie mit Tamoxifen, die zielgerichtete Anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab oder die systemische Chemotherapie.

Die Chemotherapie wird durchgeführt, wenn ein Befall der Lymphknoten vorhanden ist, bei schlecht differenzierten Zellen, des Weiteren bei jungem Erkrankungsalter, bei endokrin nicht sensitiven oder fraglich sensitiven Tumoren, Triple negativen Tumoren und bei HER2 positiven Tumoren in Kombination mit Trastuzumab. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren, Inoperabilität und inflammatorischen Karzinomen sollte ebenfalls eine Chemotherapie durchgeführt werden. Die Therapie sollte ein Taxan und ein Anthrazyklin beinhalten (Deutsche Krebsgesellschaft 2017).

Paclitaxel

Taxane gehören zu den erfolgversprechenden Medikamenten gegen Brustkrebs, wobei Paclitaxel zu den effektivsten Therapeutika gegen Brustkrebs zählt. Durch Paclitaxel wird die Anzahl der Rezidive reduziert und die Überlebensrate bei positivem Lymphknotenbefund erhöht. Auch bei bereits vorhandenen Metastasen sind Taxane sehr wirksam, weshalb im Folgenden auf diese eingegangen werden soll (Patt et al. 2006).

Paclitaxel wirkt, indem es die Mikrotubuli irreversibel stabilisiert und die Depolymerisierung von Mikrotubuli (MTs) verhindert. Es kann bei verschiedenen Krebsarten, wie unter anderem beim Mammakarzinom, eingesetzt werden. Bisher war bekannt, dass es zu einem mitotischen Arrest kommt, wodurch ein Großteil der Zellen abstirbt. Jedoch ist es nicht gesichert, dass der mitotische Arrest tatsächlich der Grund für das Absterben der Zellen im Körper bei einer Behandlung mit Paclitaxel ist. Es wird untersucht, ob Paclitaxel zu einem Zelltod während der Interphase führt. Eine weitere Hypothese ist, dass Paclitaxel durch multiple und nicht korrekt abgelaufene Zellteilungen zum Zelltod führt (Weaver 2014).

Paclitaxel und andere Taxane haben jedoch nicht nur die erwünschten tumorbekämpfenden Effekte, sondern auch viele Nebenwirkungen.

Eine der häufigsten Nebenwirkungen von Paclitaxel ist die periphere Neuropathie, welche auch chronifizieren kann (Weaver 2014).

Weitere Nebenwirkungen sind Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen, Hitzewallungen, vasomotorische Symptome und andere vegetative Regulationsstörungen (Deutsche Krebsgesellschaft 2017).

Außerdem ist es bei der Gabe von Paclitaxel nötig, dieses zunächst in Ethanol und Cremophor aufzulösen, was häufig zu Hypersensitivitätsreaktionen führt. Gibt man Paclitaxel zusammen mit Anthrazyklinen, kann es zu Wechselwirkungen und zu einer Kardiotoxizität kommen. Die Gabe von Paclitaxel kann auch zu einer Neutropenie führen. Diese tritt häufig zwischen dem fünften und siebten Tag der Therapie auf und ist für Paclitaxel dosislimitierend. Weitere Nebenwirkungen sind unter anderem die reversible Alopezie, Fatigue, Ausschlag und gastrointestinale Symptome (Patt et al. 2006).

Weiterhin kann es bei dem Einsatz von Chemotherapeutika zu Resistenzen kommen. Einer der Mechanismen, der zu Resistenzen führt, ist die gesteigerte Expression von dem Multidrug Resistance Gen (MDR-Gen), wodurch Chemotherapeutika wie Vinca-Alkaloide, Anthrazykline und Taxane nicht mehr ausreichend wirken können. Hierzu zählen Proteine wie das P-Glykoprotein und das Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP)-1. Das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) kann ebenfalls dazu führen, dass Resistenzen entstehen und die orale Absorption verringert wird. Das Multidrug Resistance-Related Protein 2 reduziert die orale Verfügbarkeit und erhöht den Abbau über die Leber und die Ausscheidung über den Darm und auch das Multidrug MDR Protein 7 hat Auswirkungen auf die Therapie, denn es fungiert als Membrantransporter/Carrier für Paclitaxel. Es entstehen Resistenzen durch Mechanismen, wie dem zunehmenden Transport der Therapeutika aus den Zellen durch MDR-Gene, der verminderten Aufnahme der Therapeutika, einer erhöhten Anzahl an Medikamenten-metabolisierenden Enzymen, Veränderungen der DNA-Reparaturaktivität und Verringerungen der Anfälligkeit der Zellen für die Apoptose. Es wird vermutet, dass Mutationen im Tubulin oder assoziierten Proteinen ebenfalls zu Resistenzen führen können (Patt et al. 2006).

Mikrotubuli

Mikrotubuli sind hohle tubuläre Strukturen mit einem Außendurchmesser von 25 nm. Sie sind Bestandteil des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen und bestehen aus Hetero-Tubulindimeren, welche aus α - und β -Tubulin gebildet werden

(Gadadhar et al. 2017; Janke und Bulinski 2011). Die α/β -Tubulindimere haben einen kugelförmigen Kern und ein C-terminales Ende, welches negativ geladen ist, mehrere posttranslationale Modifikationen durchläuft und an der Außenseite der MTs sichtbar wird (Garnham et al. 2015). MTs haben eine einheitliche Struktur und viele unterschiedliche Aufgaben die sie erfüllen. Sie beeinflussen die Form der Zellen, die Zellteilung durch Bildung des Spindelapparats, die Beweglichkeit der Zellen, die Zelldifferenzierung, den intrazellulären Transport sowie neuronale Funktionen und bilden Zilien und Flagellen durch Axoneme. MTs ragen beispielsweise in das gesamte Zytoplasma der Zelle hinein und positionieren und organisieren verschiedene Organellen. Sie tragen auch zur Polarität einer Zelle bei. Während der Mitose sind sie für die Trennung der Chromosomen verantwortlich. Die Funktionen der MTs werden durch MT-assoziierte Proteine, welche die MTs stabilisieren, destabilisieren oder diese mit Strukturen verknüpfen können, sowie dem Tubulin code bestimmt, welcher die Posttranslationalen Modifikationen (PTMs) und verschiedene Variationen von α - und β -Tubulin beinhaltet (Gadadhar et al. 2017; Natarajan et al. 2017; Forges et al. 2012).

Gebildet werden MTs durch die Polymerisation der α/β -Tubulindimere zu Protofilamenten und anschließend zu kompletten MTs.

Abbildung 3 zeigt den Auf- und den Abbau der Mikrotubuli.

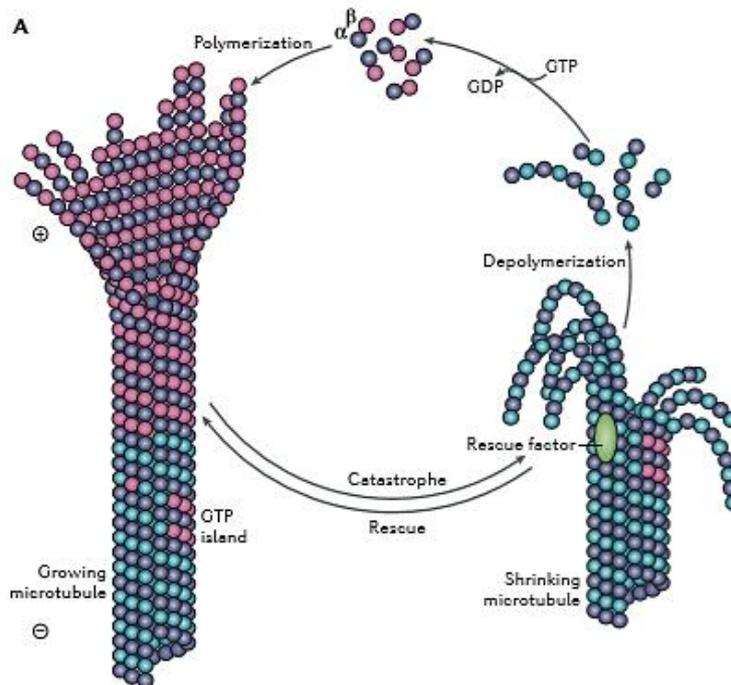


Abbildung 3 Auf- und Abbau, bzw. Polymerisation und Depolymerisation der Mikrotubuli, welche aus $\alpha\beta$ -Tubulindimeren bestehen. Der Begriff „Catastrophe“ beschreibt den Übergang vom Aufbau zum Abbau und der Begriff „Rescue“ den Übergang vom Abbau zum Aufbau der Mikrotubuli. Die Hydrolyse von GTP zu GDP ist dargestellt. Der „Rescue factor“ beschreibt mehrere Dimere, die GTP binden und der Stabilisierung dienen. Die Dimere werden auf der Abbildung dem linken Mikrotubuli beim Aufbau hinzugefügt. In Anlehnung an (Akhmanova und Steinmetz 2015).

Beim Aufbau der MTs entsteht ein stabiles Ende mit einer Kappe aus GTP-gebundenem β -Tubulin. Bei der Polymerisation lagern sich $\alpha\beta$ -Tubulindimere an die MTs an und das an β -Tubulin gebundene GTP wird zu GDP hydrolysiert, wodurch am Minus-Ende eine Kette aus GDP-gebundenem β -Tubulin entsteht. Es kommt durch die Hydrolyse ebenfalls zu einer Konformationsänderung von α -Tubulin und einer Veränderung an den Verknüpfungen der Protofilamente. Überwiegt die Hydrolyse von GTP gegenüber der Bindung von neuem, mit GTP-gebundenem β -Tubulin, entsteht eine Instabilität, welche zum Abbau und zur Depolymerisation der MTs führt, wobei die Protofilamente der MTs ihre Form verändern und sich verbiegen. Dadurch wird die dynamische Instabilität der MTs erklärt. Beeinflusst wird die dynamische Instabilität, wie auch die Verbindung der MTs durch MT-assoziierte Proteine, den MAPs, und durch Motorproteine.

Die Polymerisation und die Depolymerisation finden hauptsächlich am Plus-Ende statt, jedoch können diese auch am Minus-Ende stattfinden (Akhmanova und Steinmetz 2015; Desai und Mitchison 1997; Brouhard und Rice 2014).

Spindelapparat

Für das Überleben eines Organismus sind die Zellproliferation und die genaue Trennung der Chromosomen bei der Zellteilung wichtig. Hierfür sind die mitotische Spindel und über 200 assoziierte Proteine zuständig. Ein Spindelapparat wird sowohl bei der Mitose als auch bei der Meiose ausgebildet, besteht aus MTs und ist bipolar (Prosser und Pelletier 2017; Petry 2016). Während der Metaphase der Mitose kommt es zur Trennung der Chromosomen. Hier gibt es drei Arten von MTs: Astral-Mikrotubuli, welche den Spindelapparat am Zytoplasma und Zytoskelett befestigen, Kinetochor-Mikrotubuli, welche in der folgenden Abbildung als K-Fiber gezeigt sind und Interpolar-Mikrotubuli. Die Kinetochor-MTs wachsen von den Zentrosomen, welche aus Zentriolenpaaren bestehen, in Richtung der Chromosomen und heften sich an die Kinetochoren an. Kinetochore sind Proteinkomplexe aus vielen mikrotubulibindenden Proteinen, die an Zentromere binden und die Interaktion zwischen MTs und Chromosomen regulieren. Die Kinetochor-MTs verkürzen sich anschließend und die Interpolar-MTs verschieben sich in der Anaphase gegeneinander, so dass die Chromosomen in Richtung Zentrosomen gedrückt werden. Die dynamische Instabilität der MTs spielt eine wichtige Rolle. Hierbei kommt es zum häufigen Auf- und Abbau und so auch zur Verlängerung und Verkürzung der MTs, deren Minus-Enden zu den Polen zeigen und deren Plus-Enden in Richtung der Chromosomen zeigen (Prosser und Pelletier 2017; Petry 2016; Cleveland et al. 2003).

Abbildung 4 stellt den Spindelapparat mit den einzelnen Bestandteilen dar.

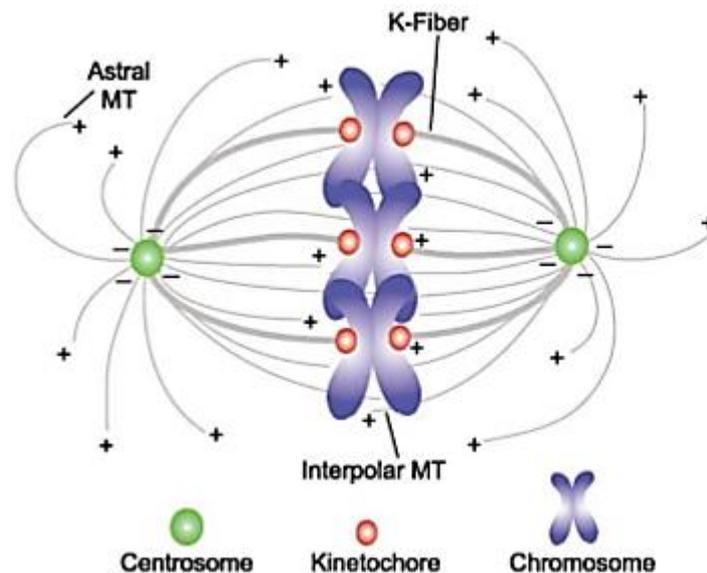


Abbildung 4 Spindelapparat; Die Abbildung zeigt die MTs, welche so ausgerichtet sind, dass die Minus-Enden in Richtung der Zentrosomen und die Plus-Enden von den Zentrosomen weg zeigen. Mittig, in der äquatorialen Ebene, befinden sich die Chromosomen. Kinetochor-MTs reichen bis an die Chromosomen heran und werden mit diesen über Kinetochore verbunden. Zur Stabilisierung der mitotischen Spindel in der Mitte der Zelle, am Zytoplasma und Zytoskelett, dienen die Astral-MTs. (Kline-Smith und Walczak 2004).

Posttranslationale Modifikationen an Mikrotubuli

Posttranslationale Modifikationen (PTMS) an Mikrotubuli haben Einfluss auf deren Dynamik und Stabilität, deren Interaktionen mit Proteinen, wie den MAPs, deren Funktionen und zählen zum Tubulin Code. Effektoren modifizieren hierbei die Untereinheiten des Tubulins. Einige dieser Modifikationen sind die Detyrosinierung/Tyrosinierung, die Glutamylierung/Polyglutamylierung, die Glycylierung und die Acetylierung. Viele dieser Modifikationen sind reversibel. Je nachdem, wo in der Zelle, bzw. in welchen Zellen sich die MTs befinden, erfolgen unterschiedliche posttranslationale Modifikationen (Yu et al. 2015; Forges et al. 2012). Da die MTs einen großen Teil des Zytoskeletts ausmachen, haben die Modifikationen einen Einfluss auf die Form, die Beweglichkeit und den Lebenszyklus eukaryotischer Zellen (Janke und Bulinski 2011). Bei bestimmten Erkrankungen, zu denen auch einige Krebserkrankungen gehören, wurden vermehrte posttranslationale Modifikationen an MTs beobachtet (Garnham und Roll-Mecak 2012).

Die unterschiedlichen Modifikationen werden durch verschiedene Enzyme katalysiert. Die Polyglutamylierung reguliert die Bindung von Kinesinen und auch MAPs wie Tau, was den Vesikeltransport und die Stabilität der MTs reguliert (Garnham und Roll-Mecak 2012; Yu et al. 2015; Kubo et al. 2010; Maas et al. 2009; Janke und Bulinski 2011).

Tubulin Tyrosine Ligase Like 4

Das Gen Tubulin Tyrosine Ligase Like 4, auch TTLL4 genannt, und das durch das Gen exprimierte Protein, gehören zu der Familie der Proteine mit einer TTL-Domäne. Diese Proteine können Aminosäuren und weitere Substrate an das Tubulin binden (Janke et al. 2005).

Abbildung 5 zeigt die Proteinstruktur von TTLL4

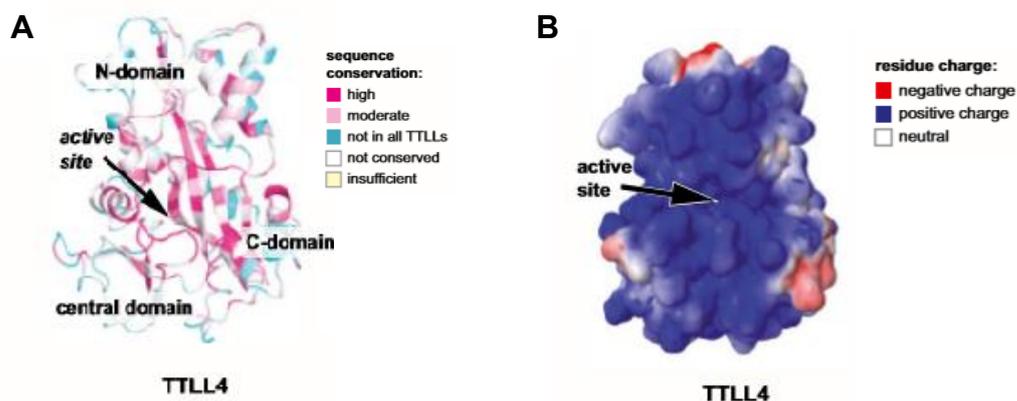


Abbildung 5 (A) Modell eines „Residue conservation profile“ von TTLL4, 5, 6 und 7, (B) Modell eines elektrostatischen Profils von TTLL4, 5, 6 und 7. In Anlehnung an (Natarajan et al. 2017).

Die strukturelle Faltung vieler der TTLL-Proteine ähnelt sich. Diese Modelle wurden auf Grundlage von bekannten Modellen von TTLL und TTLL7 erstellt und zeigen die bei TTLL4 weiterhin erhaltenen Strukturen. An dem aktiven Zentrum von TTLL4 ist eine positive Ladung vorhanden, wodurch TTLL4 gut an das negativ geladene C-terminale Ende von Tubulin binden kann (Natarajan et al. 2017).

Das TTLL4-Protein führt eine posttranslationale Polyglutamylierung, welche ATP-abhängig ist, an Proteinen durch und gehört somit zu den Polyglutamylasen. Hierbei wird Glutamat an eine Carboxylgruppe eines Glutamatrestes des Proteins gehängt, wodurch saure Seitenketten entstehen. Dieser Vorgang ist sehr komplex, wurde erstmals an α -Tubulin und β -Tubulin beobachtet und ist für unterschiedliche Funktionen der Mikrotubuli und für Zellprozesse wichtig. Jedoch können auch nichttubuläre Proteine polyglutamyliert werden, wie das NAP1 und NAP2. Der Vorgang ist reversibel und wird durch ein noch unbekanntes Protein rückgängig gemacht (van Dijk et al. 2008; Garnham et al. 2015; Audebert et al. 1993; Natarajan et al. 2017). Die entstehenden Seitenketten variieren in ihrer Länge. Die Polyglutamylierung von Tubulin ist unter anderem wichtig für die Stabilität von Zentriolen, für die axonemale Beweglichkeit und bei der Mitose (Janke et al. 2005). Die Modifizierung der Tubuli findet am C-terminalen Ende statt und die Proteinbanden können in Versuchen durch den für die Polyglutamylierung spezifischen Antikörper GT335 dargestellt werden (van Dijk et al. 2008; Eddé et al. 1990). TTLL4 ist in gesunden Zellen im Hodengewebe, im Gehirn, im Knochenmark, im Verdauungstrakt, im respiratorischen System, im Endometrium, im Ovar, in der Cervix, der Brust, der Plazenta, im Pankreas, im Binde- und Weichgewebe, im Fettgewebe, im Muskelgewebe, im Gewebe des Herzens und der Leber, der Gallenblase, in der Nebenniere und der Niere, in Lymphknoten, in der Prostata, der Haut, der Milz, der Harnblase, der Schilddrüse und dem Magen zu finden. Die mRNA von TTLL4 ist hauptsächlich im Gehirn und im Hodengewebe vorhanden (The Human Protein Atlas o. J.). TTLL4 wird auch in malignen Zellen unterschiedlicher Karzinomarten exprimiert. Bei einigen Krebsarten kommt es zu einer Überexpression von TTLL4. Ein Beispiel ist, neben dem Mammakarzinom, das duktales Pankreaskarzinom, welches zu den tödlichsten Krebsarten zählt. Die Fünfjahresüberlebensrate beträgt hier nur 5 %. Von den Patienten, die eine operative und kurative Entfernung des Tumors hatten, sterben 80-90 % daran, dass sich der Krebs schon zu sehr im Körper ausgebreitet und Metastasen gebildet hat. Auch Chemotherapeutika können, trotz des Fortschritts der letzten Jahre die Überlebensrate der Patienten nur gering beeinflussen (Kashiwaya et al. 2010; DiMagno et al. 1999). Diese Erkenntnisse führten dazu, dass die überexprimierten Gene in den malignen Pankreaszellen genauer untersucht wurden, wobei TTLL4 von großem Interesse war und auch weiterhin ist.

Neben den schon genannten Auswirkungen der Polyglutamylierung wird auch vermutet, dass dadurch die Stabilität der Proteine, der Zellzyklus, die Zellproliferation und die Interaktionen zwischen Mikrotubuli und anderen Proteinen beeinflusst werden (Kashiwaya et al. 2010; Bobinnec et al. 1998; Regnard et al. 1999). Bei Fehlregulierungen der Polyglutamylierung können physiologische Prozesse im Körper gestört werden. Hierzu gehören Ziliopathien, Krebs und Neurodegenerationen. Ein Zusammenhang zwischen der Polyglutamylierung, der erhöhten Stabilität und Langlebigkeit von Mikrotubuli und einem beschleunigten Vesikeltransport wurden beobachtet (Garnham et al. 2015; Spiliotis et al. 2008; Natarajan et al. 2017). TTLL4 hat ebenfalls einen Einfluss auf die angeborenen lymphoiden Zellen ILC3, welche an der frühen Immunabwehr beteiligt sind und für die Organentwicklung und Gewebereparatur einiger Organe wie Lymphknoten wichtig sind. Sie sind an der Abwehr bakterieller Infektionen beteiligt. TTLL4 katalysiert zusammen mit TTLL13 die Polyglutamylierung von IL-7Ra, welches STAT5 aktiviert, wodurch der Transkriptionsfaktor Sall3 exprimiert wird. Sall3 ist wichtig für die Zelldifferenzierung der ILC3-Zellen (Liu et al. 2017).

Vor Beginn dieser Arbeit wurde das Gewebe von 200 an Brustkrebs erkrankten Patienten auf eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von Zytoskelett-assoziierten Proteinen und dem Vorhandensein von Hirnmetastasen untersucht. Hier wurde die mRNA-Konzentration dieser Proteine in Primärtumoren analysiert. Dabei zeigte nur die mRNA-Konzentration von TTLL4 eine signifikante Korrelation mit dem Auftreten von Hirnmetastasen. Zu Beginn dieser Arbeit waren diese Daten noch nicht veröffentlicht. Mittlerweile wurden diese in Arnold et al., 2020 publiziert.

Intrazelluläres Trafficking

Der intrazelluläre Vesikel-Transport verläuft entweder entlang von Aktin-Filamenten oder auf MTs. Bei dem mikrotubulibasierten Transport werden Vesikel mit Hilfe von Motorproteinen entlang der MTs bewegt. Hierbei werden im Wesentlichen Organellen (Vesikel) von einem zum anderen Ort transportiert. Dieser Transport wird neben den Motorproteinen auch durch Gerüstproteine und das Zytoskelett reguliert. Proteine wie Kinesin-1 und Dynein binden und bewegen sich entlang der MTs, wobei Dynein sich häufig in Richtung des negativen Endes und Kinesin sich in Richtung des positiven Endes der MTs bewegt.

Der Transport der Vesikel zwischen zum Beispiel der Zellperipherie und dem Zellkern ist für zahlreiche physiologische Prozesse von Bedeutung (Verdeny-Vilanova et al. 2017; Zajac et al. 2013; Vale 2003; Bálint et al. 2013). Ob die Überkreuzungsstellen der MTs einen Einfluss auf den intrazellulären Transport haben, wird zwar vermutet, ist jedoch noch unklar. Es könnte an den Stellen, wo es zu Kreuzungen der MTs kommt, zu kurzen Unterbrechungen des Transports und somit zur Anhäufung von Vesikeln kommen, da die MTs ein komplexes Netzwerk innerhalb der Zelle bilden. Kommt es zu einer Unterbrechung des Transports in gesunden Zellen, werden die Vesikel schnell abtransportiert. Für den Transport der Vesikel scheint ebenfalls die Größe der Vesikel eine wichtige Rolle zu spielen (Verdeny-Vilanova et al. 2017; Bálint et al. 2013).

Generell gelten MTs als eine Art Transportweg für die Motorproteine. Hierbei befinden sich in vielen Zellen die Minus-Enden nahe dem Zellkern in einem MT-organisierendem Zentrum, dem Zentrosom, während die Plus-Enden in Richtung Zellperipherie zeigen. Durch die Hydrolyse von ATP wird Energie für die Motorproteine frei, die sich so entlang der MTs bewegen können. Es ist wahrscheinlich, dass durch bestimmte Mechanismen, wie den posttranslationalen Modifikationen, den MAPs und dem Aufbau des MT-Netzwerks, Motorproteine gesteuert und somit in die richtige Richtung gelenkt werden. Beispielsweise kann durch die Polyglutamylierung der MTs die Prozessivität von Kinsein-1 gesteigert werden. Durch MAPs werden die Polymerisation und die PTMs der MTs reguliert, was einen Einfluss auf die Beweglichkeit von Kinesin und Dynein entlang der MTs hat. MAPs können ebenfalls die Aktivität der Motorproteine steigern oder reduzieren. Einen zusätzlichen Einfluss auf den intrazellulären Transport hat die Anordnung der MTs innerhalb einer Zelle. Je nach Ausrichtung der MTs, können die Vesikel in unterschiedliche Richtungen gelenkt werden und so unterschiedliche Zielorte erreichen. In einigen Zellen, wie den Neuronen, gibt es bündelartige Anordnungen der MTs in den Axonen, was zu einer Beschleunigung des Transports beiträgt. MTs und deren Modifikationen, sowie das Zusammenspiel mit bestimmten Proteinen sind also maßgeblich daran beteiligt den intrazellulären Transport zu regulieren (Balabanian et al. 2018).

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, zu zeigen, ob eine TTLL4-Überexpression das metastatische Potential von Mammakarzinomzellen *in vitro* beeinflusst.

Hierzu wurde TTLL4 in der TNBC-Zelllinie MDA-MB-231 stabil überexprimiert und die Effekte von TTLL4 auf die Migration, Transmigration, das Zellwachstum, F-Aktin, die Adhäsion und den Vesikeltransport untersucht.

Material und Methoden

Material

In den nachfolgenden Tabellen wurden Produktnamen durch kursive Schriftsetzung gekennzeichnet.

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien, Kits

Reagenz, Chemikalie, Nährmedium	Firma
3.1-Puffer	NEB
<i>Accumax</i> -Zellaggregat-Dissoziatopnsmedium	Bioscience
Acrylamid/Bisacrylamid	Serva
APS (Ammoniumpersulfat)	Bio-Rad
Agarose-Gel/TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	Serva
<i>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent</i> -Konzentrat	Bio-Rad
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biomol
<i>CASYton</i>	OLS OMNI Life Science
<i>Cryo-Save</i> -Einfriermedium	CCpro
DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol)	Roth
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's-Medium)	Gibco™
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
dNTP/dATP	Rosh
Desoxynukleotidtriphosphat/ Desoxyadenosintriphosphat	
Ethanol	Chem solut
<i>FastDigest</i> Green-Puffer	Thermo Scientific™
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco by LiTechnologies
Fibronektin, human	Advanced Bio Matrix
GFP-BDNF Brain-derived neurotrophic factor- green fluorescent protein	Prof. Dr. Matthias Kneussel, Center for Molecular Neurobiology, UKE
<i>High-fidelity</i> -Puffer	Thermo fisher
Hyperladder (DNA-Leiter)	Bioline
K2-Multiplikator	Biontex
K2-Transfektions-Reagenz	Biontex
Kollagen I	Roche
Kollagen IV aus menschlicher Plazenta	Sigma life science
LB-Medium (Lysogeny Broth-Medium)	Roth
<i>Lipofectamine® LTX</i> mit <i>Plus™</i> -Reagenz	Thermo Fisher Scientific™
Loading Dye (LD, 6x, Ladefarbstoff)	PeqLab

Reagenz, Chemikalie, Nährmedium	Firma
Luminol- und Peroxid-Lösung	GE Helatcare
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Thermo Scientific™
NaCl (Natriumchlorid)	Thermo Scientific™
Milchpulver 2,5 %	Roth
<i>M-PER™ Mammalian Protein Extraction-Reagenz</i>	Thermo Scientific™
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma
<i>OptiMEM</i> , serumreduziertes Medium	Gibco™
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma
Puromycindihydrochlorid	Sigma
<i>Quick-Load® Purple 100 bp DNA-Leiter</i>	New England Biolabs
<i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein-Leiter</i>	Thermo Scientific™
Taq-DNA-Polymerase-Puffer (10x)	Thermo Scientific™
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	Sigma
TNF- α human	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin/EDTA	Gibco by LiTechnologies
Well-Platten	Greiner
Kit	Firma
<i>Macherey-Nagel-Kit</i>	Macherey-Nagel
<i>Macherey-Nagel-Kit Nucleospin Gel and PCR clean-up, Gel-Extraktion</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoBond® Xtra Midi EF</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin® Gel und PCR clean-up</i> Aufreinigung von DNA aus Gel und Umpufferung	Macherey-Nagel
<i>Plasmid Miniprep-Kit, NucleoSpin® Plasmid (NoLid)</i>	Monarch®, Macherey-Nagel
<i>Taq Roche-Kit, qPCR-Mastermix (FastStart SYBR grün)</i>	Roche

Tabelle 2: Laborgeräte und Materialien

Material	Firma
<i>Biosphere</i> Filter-Pipettenspitzen	Biosphere Plus
Blot-Papier	Roth
Boyden-Kammer	Costar
Zellkultur-Mikroplatte schwarz	Greiner bio-one
Chamber-Slide (Kammerobjektträger)	Ibidi
Cryoröhrchen	Sarstedt, Nunc
Gel-, Glas- und Aluminiumplatte, Gel-Halter, Abstandhalter, Kamm, Gummilippe, Schrauben	Amersham Bioscience
Kulturflaschen	Sarstedt
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Skalpell	Braun
Spritzenvorsatzfilter (0,45 µm)	Sarstedt
TC-Schale 100	Sarstedt
<i>Tissue Culture Plate</i> (Gewebekulturplatte)	Falcon

Gerät	Firma
Elektrophorese-Kammer	Amersham Bioscience
Heizblock, ThermoStat plus	Eppendorf
<i>ImageQuant</i> TM <i>LAS4000</i>	GE Healthcare
Inkubator (<i>Heracell</i> TM <i>240i</i>)	Thermo Scientific TM
<i>NanoDrop</i> TM <i>2000 c</i> , Spectrophotometer	Thermo Scientific TM
Transferkammer Western-Blot	Biorad
Schüttelinkubator	Brunswick
UV-Tisch	Bachhofer
Vortex (<i>Genie2</i> TM)	Scientific Industries
Zentrifugen	Heraeus, Hermle, Thermo Scientific TM

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Puffer	Herstellung
Blockinglösung	5,8 g Maleinsäure, 4,38 g NaCl, 5,0 g Boehringer Blocking Reagent, 400 ml destilliertes Wasser (A. dest.)
Medium für die hCMEC	EBM-2, FCS 5 %, Ascorbinsäure (5µg/ml), Hydrocortison (1,4 µM), Chemically defined lipid concentrate 1 %, bFGF (1 ng/ml)
PBS (phosphate buffered saline) Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Sammelgepuffer (4x)	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS
SDS-Probenpuffer (4x)	250 mM Tris, pH 6,8 4 % SDS, 30 % Glycerol, 20 % Mercaptoethanol, 1,3 % Bromphenolblau
TBS-Puffer (tris-buffered saline) TRIS-gepufferte Kochsalzlösung	150 mM NaCl, 7,7 mM Tris/HCl pH 7,5
TBS-T (TBS mit Tween 20)	1x TBS, 0,1 % Tween 20
Trenngepuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % SDS
Western-Blot-Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Firma
<i>Alexa Fluor</i> ® 488 Ziege, anti-Maus-IgG (1:2000)	Invitrogen #A-11008 (bei vasp verwendet)
<i>Alexa Fluor</i> ® 568 Ziege, anti-Maus-IgG (1:2000)	Invitrogen #A-11030
GAPDH (glyceraldehyde-3- Phosphate dehydrogenase), Spezies Maus, Verdünnung 1:5000 WB, Molekulargewicht 37 kDa	Santa Cruz Biotechnology SC32233
GT335 (Polyglumylase), Spezies Maus, Verdünnung: 1:4000	AdipoGen Life Sciences
HRP-conjugated Ziege, anti-Maus-IgG	Abcam #ab205719
HRP-conjugated Ziege, anti-Maus-IgG	Abcam #ab205718
Anti-β-Tubulin	Sigma-Aldrich #T4026
Anti-VASP	Santa Cruz SC 46668

Tabelle 5: Zellen und Bakterienstämme

Zellen	Herkunft
MDA-MB-231	ATCC #HTB-26
hCMEC/D3 / Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line	Von Leticia Oliveira Ferreira, Forschungslabor der Gynäkologie, UKE, zur Verfügung gestellt
HEK-293-T Zellen	Von Leticia Oliveira Ferreira, Forschungslabor der Gynäkologie, UKE, zur Verfügung gestellt
Bakterien	Herkunft
<i>XL-1-Blue</i> Bakterien	Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie, UKE

Tabelle 6: Enzyme

Enzyme	Firma
<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase	Thermo Scientific™
Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)-DNA-Polymerase	Thermo Scientific™
Restriktionsenzym AseI	NEB
Restriktionsenzym NotI FD	Thermo Scientific™
<i>SuperScript</i> ™ III Reverse Transcriptase	Invitrogene

Tabelle 7: Vektoren und Primer

Primer	Herkunft
MN668 5'- ATGCGGCCGCATGGCCTCA- GCAGGAACACAG-3'	Alle Primer wurden von Marcus Nalaskowski, Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Biochemie und Signaltransduktion, UKE zur Verfügung gestellt
MN669 5'-ATGCGGCCGCTTATGGGCT- CACAGCCAGGAG-3'	
MN670 (600for) 5'- CTGCCATCTCAGGGAA- GATCC-3'	
MN671 (800rev) 5'CTTATGGTCAACAGGCTGCGG -3'	
MN672 (1400for) 5'-GTGGCCAC- CCGCCTCTCTTCC-3'	
MN673 (2200for) 5'- CCAGGTTATTCACAAGTG- GAG-3'	
MN674 (3000for) 5'- TGCTGGATGTCCTGACAC- CAG-3'	
Primer P07 for GAGCTCACAACCCCTCACTC	
Primer p16 rev 5'-GGCCTTATTCCAAGCGGCTT- 3'	
GAPDH for 5'- AGTCCCTGCCCACTCAG -3'	

Primer	Herkunft
GAPDH rev 3'TACTTTATTGATGGTACATGAC AAGG -5'	
Primer qPCR TTL4 3089 for GTCAACATTTCCCAAGCCTC	
Primer qPCR TTL4 3089 rev GAGCCATTCGACATTTGTCCC	
Vektoren	
pLeGO-iC2-Puro+-HsTTL4	Freundlicherweise von Dr. Kristoffer Riecken (Department of Stem Cell Transplantation, University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE)) zur Verfügung gestellt

Tabelle 8: TTL4

Name	Herkunft
<i>Clone ORF Shuttle, ORFeome V8.1:</i> CCSBo5058H0981131D Clone ID: 131H09 TTL4-Gen	Source BioScience

Methoden

Klonierung

Um die DNA der TTLL4-Polyglutamylase vervielfältigen zu können, wurde sie zunächst aus Bakterien gewonnen. Die Bakterien, die TTLL4-DNA von Source BioScience und die Primer wurden freundlicherweise von Marcus Nalaskowski zur Verfügung gestellt.

Die Bakterien wurden über Nacht in 6 ml Medium und 12 µl Ampicillin gezüchtet. Dafür wurden vier Falcon-Zentrifugenröhrchen mit jeweils 6 ml Medium und 12 µl Ampicillin verwendet, in die einige Bakterien mit Hilfe einer Pipettenspitze überführt wurden und welche über Nacht bei 37 °C in den Schüttelinkubator gegeben wurden.

Plasmidpräparation

Die vier Falcon-Zentrifugenröhrchen wurden am folgenden Tag bei 5000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, bis der Überstand klar war und sich ein Pellet am Boden der Falcon-Zentrifugenröhrchen gebildet hat.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit dem Macherey-Nagel-Kit bearbeitet.

Zunächst wurde das Zellpellet in 250 µl A1-Puffer resuspendiert bis keine Zellklumpen mehr vorhanden waren.

Anschließend wurde 250 µl A2-Puffer hinzugefügt, alles gleichmäßig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 300 µl A3-Puffer eingemischt. Das Gemisch wurde dann 5 Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert, bis der Überstand klar war.

Eine Filtersäule wurde in einem 2ml- Reaktionsgefäß platziert und der Überstand aus jeweils zwei Reaktionsgefäßen wurde in einen Filter pipettiert und eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.

Um die Membran der Filtersäule, in der sich nun die DNA befand, von Rückständen zu befreien, wurden 600 µl A4-Puffer auf die Filtersäule gegeben und diese dann eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert.

Die Filtersäule wurde anschließend in ein neues 1,5 ml-Röhrchen gegeben und 50 µl AE-Puffer wurden hinzugefügt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und eine Minute zentrifugiert, um die DNA aus der Membran zu lösen.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Um die Konzentration der DNA zu messen, wurde zunächst 1 µl AE-Puffer als Lösung für eine Blindprobe und anschließend 1 µl der Lösung mit der DNA auf den Nano Drop gegeben. Eine Kurve und die genaue Konzentration der vorhandenen DNA wurden erstellt und ermittelt.

Polymerase-Kettenreaktion/PCR

Mit Hilfe einer PCR konnte die TTLL4-DNA vervielfältigt werden.

Es wurde ein Mastermix aus 87,5 µl destilliertem Wasser, 25 µl 5 x HF-Puffer, 2,5 µl dNTPs, 2,5 µl Forward-Primer, 2,5 µl Reverse-Primer und 2,5 µl Phusion-DNA-Polymerase hergestellt. Beide Primer wurden von Markus Nalaskowski bereitgestellt.

Der gesamte Mastermix wurde auf zwei 1 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. In eines der Reaktionsgefäße wurde 1 µl der TTLL4-DNA pipettiert, in das andere 1 µl Wasser zur Kontrolle.

Die Primer wurden mit destilliertem Wasser auf 10 pmol/µl verdünnt.

Die beiden Reaktionsgefäße mit den Gemischen wurden in den Thermozykler mit folgenden Programmen gegeben.

- Programm:
1. 98°C 30 Sekunden
 2. 98°C 15 Sekunden
 3. 70,3°C 30 Sekunden
 4. 72°C 2 Minuten
 5. 72°C 10 Minuten

Die Schritte zwei, drei und vier wurden fünfundzwanzigmal wiederholt. Die Temperatur für Schritt drei wurde für beide Primer mit einem „online Tm Calculator“ (ThermoFisher scientific), einem Online-Rechner zur Berechnung der Schmelztemperatur, ausgerechnet.

Um zu sehen, ob die DNA für das TLL4-Protein erfolgreich vervielfältigt wurde, wurden 10 % der Gemische auf ein 1 %-Agarose-Gel aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese lief für 40 Minuten bei 100V.

Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet, um die DNA-Banden sichtbar zu machen.

PCR-Produktreinigung

50 µl PCR-Produkt der Reaktion wurden mit 100 µl NTI-Puffer vermischt, in ein NucleoSpin-Filter gegeben und für 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert. Die Membran des Filters wurde mit 700 µl NT3-Puffer gewaschen und für 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert. Um die Membran zu trocknen, wurde der Filter für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Die sich nun im Filter befindliche DNA wurde mit 20 µl NE-Puffer eluiert, wobei der Puffer eine Minute bei Raumtemperatur auf der Membran gelassen und daraufhin der Filter eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert wurde.

Poly-T-Addition an DNA

Folgende Stoffe wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert:

13 µl Eluat der PCR-Aufreinigung, 2 µl dATP (2Mm), 1 µl MgCl₂ (50mM), 2 µl 10 x Taq-DNA-Polymerase-Puffer, 2 µl Taq-DNA-Polymerase.

pGEM-T easy Ligation

In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µl 2 x Ligationspuffer, 1 µl pGEM-T Easy, 4 µl pA-Tailingansatz, 4 µl destilliertes Wasser und 1 µl T4-Ligase pipettiert und bei 4 °C über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

Transformation in XL-1-Blue Bakterien

100 µl kompetente XL-1-Blue Bakterien wurden 30 Minuten lang auf Eis aufgetaut. Den Bakterien wurden dann 20 µl des pGEM-T easy-Ligationsansatzes hinzugefügt und sie wurden erneut für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde eine Erhitzung bei 42 °C für eine Minute durchgeführt, die Bakterien danach sofort für eine Minute auf Eis gestellt und 900 µl kaltes LB-Medium hinzugefügt.

Das Gemisch wurde für eine Stunde bei 37 °C und 800 rpm geschüttelt. Nachdem das Gemisch geschüttelt wurde, wurden 100 µl von diesem in 500 µl LB-Medium gegeben und auf einer Ampicillin-Agarplatte verteilt. Auf eine weitere Platte wurden 600 µl des Gemisches ohne zusätzliches Medium gegeben. Beide Platten wurden 30 Minuten zum Trocknen gestellt und über Nacht bei 37 °C in den Inkubator gegeben.

Bakterien-Klon-Expansion

Es wurden sechs Klone gepickt und in unterschiedliche Falcon-Reagenzgefäße mit 6 ml LB-Medium und 6 µl Ampicillin gegeben. Die Klone konnten dann über Nacht im Schüttelinkubator wachsen.

Not 1-Testverdau

Nachdem eine weitere Plasmidpräparation durchgeführt wurde, bei der jedoch die DNA am Ende in 100 µl destilliertem Wasser eluiert wurde, wurde die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop gemessen.

Nach der Messung konnte ein Not-Testverdau mit Not-FD erfolgen. Dafür wurden 17 µl Plasmid-DNA, 1 µl Not1-FD und 2 µl FD-Puffer grün verwendet und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Die Proben wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Sequenzierung

Da die Bande von Klon 5 gut im Agarose-Gel sichtbar war und dort am meisten DNA vorhanden war, wurde dieser Klon für die Sequenzierung genommen.

Für die Sequenzierung wurden 1,2 µg Plasmid-DNA, 3 µl des jeweiligen Primers (1:10 verdünnt, siehe Tabelle 7, Seite 32) in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert und auf 15 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Dies wurde für jeden Primer durchgeführt.

Die Sequenzierproben wurden für die Sequenzierung in das Labor der Firma Seqlab Microsynth geschickt.

Bei der Sequenzierung mit sechs Primern stimmte die Abfolge der Basen innerhalb der DNA des ausgewählten Klons mit der in der Literatur bereits bekannten Basenabfolge der TTLL4-DNA überein. Somit wurde sichergestellt, dass die fehlerfreie TTLL4-DNA in Klon 5 vorhanden war.

Präparativer Verdau

Der präparative Verdau wurde zur Aufreinigung der DNA durchgeführt. 2 µg Plasmid-DNA, 1 µl Restriktionsenzym NotI, 1 µl Restriktionsenzym AseI und 2 µl NEB 3,1-Puffer wurden zusammen pipettiert und auf 20 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde durch NotI aus dem Vektor rausgeschnitten. Der Vektor wurde durch AseI zerschnitten, um im Gel nicht mit 3,0 Kilobasen auf Höhe der DNA zu liegen.

Am nächsten Tag wurde ein 0,8 %iges Agarosegel mit großen Taschen hergestellt und mit 20 µl von dem Verdau vom Vortag und 4 µl 6 x LD beladen. Zusätzlich wurden 10 µl Hyperladder als Größenstandard in eine weitere Geltasche pipettiert.

Gelextraktion / Gel-clean up

Die TTLL4-DNA mit 3600 Kilobasen wurde in dem Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht und dort mit einem Skalpell extrahiert.

Um die DNA aus dem Gel zu entnehmen, wurde ein Gel-clean up nach dem Protokoll des Macherey-Nagel Kit „Nucleospin Gel and PCR clean-up, Gel extraction“ durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 20 µl Elutionspuffer.

Klonierung in den Zielvektor

Zur Klonierung der DNA in den Zielvektor LeGO-iC2-Puro+, wurde ein bereits geschnittener und mit CIP (Calf-Intestine-Phosphatase) behandelter Zielvektor freundlicherweise von Saskia Grüb zur Verfügung gestellt.

Für die Ligation der DNA mit dem Zielvektor LeGO-iC2-Puro+ wurden 1 µl Vektor, 7 µl Insert, 1 µl 10 x Ligationspuffer T4 und 1 µl T4 Ligase zusammenpipettiert und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Transformation in XL-1-Blue-Bakterien

Bei der anschließenden Transformation des Zielvektors mit der TTLL4-DNA in XL-1-Blue-Bakterien, wurden die gleichen Schritte wie bei der bereits weiter oben beschriebenen Transformation in XL-1-Blue-Bakterien durchgeführt, mit dem Unterschied, dass nun einmal 100 µl und einmal 900 µl ausplattiert wurden.

Die Transformation in XL-1-Blue hat dazu gedient, die DNA zu vervielfältigen.

Sequenzierung

Eine weitere Sequenzierung zur Überprüfung der des richtigen Einbaus der DNA in den Zielvektor wurde durchgeführt. Die Durchführung entsprach der bereits weiter oben beschriebenen Sequenzierung. Hier wurde sichtbar, dass die DNA korrekt in den Zielvektor eingebaut wurde.

Plasmidpräparation - Midi-Prep

Nach einer weiteren Vervielfältigung der DNA in XL-1-Blue-Bakterien, konnte eine Plasmid-Aufreinigung durchgeführt werden, um die vorhandene DNA mit dem Zielvektor aus den Bakterien zu extrahieren.

Hierzu wurde das Gemisch mit den Bakterien 10 Minuten lang bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit dem Resuspensions-Puffer RES-EF und der RNase A resuspendiert und vermischt. Es wurden anschließend 8 ml Lysepuffer LYS-EF hinzugefügt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation konnten 8 ml Neutralisationspuffer NEU-EF hinzugefügt und eine weitere Inkubation auf Eis für 5 Minuten durchgeführt werden. Die Suspension wurde daraufhin in eine vorher angefeuchtete NucleoBond xtra-Filtersäule gegeben, die gefilterte Suspension wurde verworfen.

Der Filter wurde zunächst mit 5 ml eines Filter-Waschpuffers FIL-EF, dann mit 35 ml ENDO-EF-Puffer und zum Schluss mit 15 ml Wasch-EF-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde der Filter in ein sauberes Falcon-Röhrchen gestellt und 5 ml Elution ELU-EF Puffer in den Filter gegeben. Der Filter konnte nun verworfen und dem Durchfluss wurden 3,5 ml Isopropanol hinzugefügt werden. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand sorgsam verworfen. Auf die so gewonnene DNA wurden 2 ml 70 %iges Ethanol gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 x g, konnte die DNA in 500 ml TE-EF-Puffer gelöst und anschließend gemessen werden.

Komplettsequenzierung der TTLL4-DNA

Es wurde eine letzte Komplettsequenzierung der gewonnen Plasmid-DNA zur Überprüfung der Richtigkeit der Basenabfolge mit den bereits vorher verwendeten sechs Primern mit dem Ergebnis der korrekten Basenabfolge der TTLL4-DNA durchgeführt. Die gewonnene DNA konnte nun zur Transfektion der MDA-MB-231-Zellen verwendet werden (siehe Anhang, Abbildung 17).

Kultur von Mammakarzinomzellen

Zellkultur

Die gesamten Versuche wurden mit MDA-MB-231-Zellen durchgeführt, welche alle drei bis vier Tage gesplittet und mit DEMEM Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep versorgt wurden. Die MDA-MB-231-Zellen mit einer TTLL4-Überexpression werden als TTLL4^{plus} bezeichnet, die MDA-MB-231-Zellen mit dem LeGO-Vektor und ohne TTLL4-Überexpression sind die Kontrollzellen.

lentivirale Transduktion

Um die TTLL4-DNA in MDA-MB-231-Zellen zu transferieren, mussten zunächst HEK-293-T-Zellen transfiziert werden. 10 µg LeGo-iC2-Puro+ mit TTLL4-DNA, 10 µg Gag-Pol-Verpackungsplasmid, 5 µg pRSVrev-Verpackungsplasmid und 2 µg VSV-G-Vektor wurden mit 750 µl OptiMEM-Medium vermischt.

Gleichzeitig wurden 40 µl Lipofectamine mit 750 µl OptiMEM-Medium vermischt. Beide Mischungen wurden 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, in ein Reagenzgefäß pipettiert und erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die HEK-293-T-Zellen wurden mit PBS gewaschen. 5 ml Medium und eine Mischung aus Plasmid-DNA und Lipofectamine wurden den Zellen hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Hierdurch begann die Produktion des Virus mit LeGo-iC2-Puro+ und der TTL4-DNA.

Am nächsten Tag wurde den Zellen 10 ml Medium hinzugefügt.

5×10^5 MDA-MB-231-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät, welche innerhalb von 8 Stunden adhären sollten.

Die Transduktion der MDA-MB-231-Zellen wurde 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach der Transfektion der HEK-293-T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden 10 ml von dem Virusüberstand der HEK-293-T Zellen mit einem sterilen 0,45 µm-Poren-Filter gefiltert. 8 ml des Überstands wurden aliquotiert und eingefroren, 2 ml wurden auf die MDA-MB-231-Zellen pipettiert.

Nach den 72 Stunden der Transduktion konnte das Medium von den Zellen abgenommen werden. Eine Spülung der Zellen mit 2 ml PBS wurde durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,7 ml Trypsin abgelöst und mit 2 ml puromycinhaltigem Medium gespült. Bei der Überführung der Zellen in eine T75-Kulturflasche wurden weitere 8 ml puromycinhaltiges Vollmedium hinzugefügt und die Kulturflasche in den Inkubator gestellt.

Das puromycinhaltige Vollmedium bestand aus 500 ml DNEM, 50 ml FCS (10 %), 5,5 ml Ampicillin und Puromycin (2 µg/ml).

Lagerung von Mammakarzinomzellen in flüssigem Stickstoff

Zur Aufbewahrung der Zellen konnten ab sofort geringe Mengen der Zellen eingefroren werden. Einen Tag vor diesem Prozess wurden dazu Zellen in einer Petrischale ausgesät. Am nächsten Tag konnten diese mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst und in Medium resuspendiert werden. Die Zellen in dem Medium wurden dann für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und in 1-2 ml Cryosafe gelöst, nachdem der Überstand verworfen wurde. Die Zellen konnten so in einem Cryoröhrchen bei – 80 °C eingefroren werden.

Entnahme von Mammakarzinomzellen aus flüssigem Stickstoff

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurde ein Cryoröhrchen mit den aus dem Stickstofftank entnommenen Zellen in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt. Die Zellen konnten dann mit 12 ml Vollmedium in eine Kulturflasche überführt und in den Inkubator gegeben werden.

Vervielfältigung von Mammakarzinomzellen

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage aufgeteilt, um eine zu hohe Anzahl der Zellen in der Kulturflasche zu vermeiden. Dazu wurde das alte Medium aus der Kulturflasche verworfen und die Zellen mit 10 – 12 ml PBS gespült, wodurch Trypsin-Inhibitoren entfernt wurden. Anschließend wurden 2 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und diese 4 Minuten im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation löste sich der Zellrasen leicht ab, so dass die Zellen durch leichtes Klopfen auf die Kulturflasche von den Wänden der Flasche entfernt werden konnten. Unter dem Mikroskop waren nun abgerundete und freischwimmende Zellen zu erkennen. Um die Zellen zu splitten, konnten 8 ml frisches Medium zu den bereits in der Zellflasche vorhandenen 2 ml Trypsin hinzugefügt werden, 5 ml der Zellsuspension abgenommen und verworfen werden und anschließend wieder 10 ml frisches Medium hinzugefügt werden.

CASY-Zellzählung

Die Zellen wurden mit dem „CASY Cell Counter & Analyzer“ gezählt.

Um die Zellen zu zählen, wurden pro Zellart zwei Behälter mit jeweils 10 ml CASYton, einem isotonischen Messpuffer, verwendet. Es wurde immer doppelt gezählt, um die Genauigkeit der Zählung zu garantieren. In die 10 ml Messpuffer, wurden 50 µl der Zellsuspension gegeben und vorsichtig durch fünfmaliges Invertieren der verschlossenen Behälter durchmischt. Die Lösung wurde anschließend von dem CASY Cell Counter & Analyzer per Sonde aufgenommen und die Zellen wurden gezählt. Pro Zellart bekam man zwei Ergebnisse, hier mussten nun der Mittelwert gebildet und die Zellzahl pro Milliliter ausgerechnet werden.

Proteinlysatpräparation aus Mammakarzinomzellen

Zur Herstellung eines Proteinlysats wurden der Zellkulturflasche trypsinisierten Zellen entnommen und 3 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 2,5 ml PBS gespült und erneut bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen dann in 100 – 400 µl MPER gelöst und in ein Falconröhrchen gegeben, welches bei – 80 °C für 5 Minuten eingefroren und anschließend 20 Minuten auf Eis aufgetaut wurde. Nach erneutem zentrifugieren für 15 Minuten, bei 13000 rcf und 4 °C entstand das Proteinlysat, welches nun abgenommen und in ein neues Falconröhrchen gefüllt werden konnte.

Proteinbestimmung mittels Bradford Assay

Zwei Reihen eines Wells wurden nach Schema (siehe Anhang, Tabelle 11) mit Wasser und BSA befüllt. Zwei Wells wurden mit 50 µl des hergestellten, zuvor in destilliertem Wasser 1:200 verdünnten Lysats befüllt. Allen Wells wurden dann 200 µl Biorad-Reagenz hinzugefügt, welche zuvor im Verhältnis 1:5 in Wasser verdünnt wurde. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, konnte die Proteinbestimmung mittels Messung im Photometer erfolgen. Zur Verwendung des Lysats musste dieses mit Wasser und 4 x Probenpuffer aufgeköcht werden.

SDS-PAGE

Zum Proteinnachweis wurde ein SDS-PAGE-Gel, welches aus einem Trenn- und einem Sammelgel besteht, benötigt. Zur Herstellung des Gels wurden eine Glas- und eine Aluminiumplatte mit Alkohol gereinigt und in einen Gel-Halter eingespannt. Ein Abstandhalter mit einem Durchmesser von 1,5 mm trennte die beiden Platten voneinander. Es war darauf zu achten, dass ein glatter Rand entstand und keine der beiden Platten überstand. Mit Schrauben wurden die Platten sicher befestigt und in eine Gummilippe geschoben, die das Auslaufen des Gels verhinderte. Für das Trenngel wurden die Substanzen Acrylamid, Trenngelpuffer, destilliertes Wasser, Ammoniumpersulfat und Temed verwendet.

Für ein 10 %iges SDS-Gel wurden 4,0 ml Acrylamid, 5,0 ml destilliertes Wasser und 3,0 ml Trenngelpuffer vermischt und auf zwei Falconröhrchen aufgeteilt. Pro Milliliter wurden anschließend 10 µl Ammoniumpersulfat hinzugefügt.

Nach dem darauffolgenden Hinzufügen von insgesamt 5 µl Temed wurde das Gemisch zügig in die zuvor vorbereiteten Platten gegossen. Hierbei wurde das Gel mit einer 1000 µl-Pipette langsam am Rand der Platten eingegossen. Zur Entfernung aller Blasen wurden 1000 µl Isopropanol auf das Gel gegeben. Nach 45 Minuten war das Gel auspolymerisiert und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Nun wurden jeweils 4 ml Sammelgel mit 10 µl Ammoniumpersulfat pro Milliliter und 5 µl Temed vermischt und ebenfalls zwischen die Platten auf das schon vorhandene Trenngel gegossen. Ein 15er-Kamm wurde in das obere Sammelgel gesteckt. Nach 30 Minuten war das Sammelgel ebenfalls auspolymerisiert und das SDS-PAGE-Gel somit für die Verwendung fertiggestellt.

Das SDS-PAGE-Gel wurde nach Entfernung des Kamms in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Es war möglich immer zwei Gele in eine Apparatur einzuspannen. In die Elektrophorese-Apparatur wurde dann ein SDS-Laufpuffer gegossen. In die durch den Kamm entstandenen Taschen wurden die Proteinlysate, die zuvor mit dem 4 x Probenpuffer aufgeköcht wurden, mit langen Gelloader-Pipettenspitzen pipettiert. Zusätzlich wurden 10 µl Spectralmulticolor BR-Marker als Größenstandard in eine weitere Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese-Apparatur wurde verschlossen und eine Spannung von 80 V angelegt. Nach 30 Minuten wurde die Spannung auf 130 V erhöht und nach einer Stunde abgestellt.

Western Blot

Ein Western Blot beinhaltet die Übertragung der Proteine auf eine Membran, die Bindung von spezifischen Antikörpern an die Proteine und das Sichtbarmachen der Proteine im Imager.

Zur Übertragung der Proteine auf eine Membran wurde der Laufpuffer verworfen und die Platte mit dem SDS-PAGE-Gel aus der Elektrophorese-Apparatur genommen. Die Glas- und die Aluplatte wurden mit einem Spatel vorsichtig voneinander getrennt, so dass das Gel frei lag. Das Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstanden. Unter der Membran und auf dem Gel wurden Filterpapiere und Schwämme platziert und alles zusammen in eine Transferkassette gelegt, welche durch einen Blotpuffer feucht gehalten wurde.

Anschließend kam die Transferkassette mit dem einem Transferpuffer und einem Rührfisch in eine geschlossene Transferkammer. Eine Spannung von 30 V wurde angelegt und der Aufbau für 3 Stunden so belassen. Während dieser Zeit wurde der Puffer durch den Rührfisch dauerhaft durchmischt. Durch das elektrische Feld wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen.

Als nächster Schritt wurden die freien Bindungsstellen der Proteine auf der Membran mit 7 ml einer Blocking-Lösung über Nacht blockiert. Anschließend konnte der erste Antikörper GT335-Polyglutamylase 1:4000 mit Böhlinger Blockinglösung verdünnt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben werden. Der Antikörper wurde abgenommen und eine dreimalige und zehnmütige Waschung mit 5 ml TBS-T-Puffer erfolgte. Nach der letzten Waschung wurden 5 ml TBS-T-Puffer und 1 µl des zweiten Maus-Antikörpers, 1:8000 verdünnt, für 60 Minuten auf die Membran gegeben. Eine erneute Waschung mit TSB-T-Puffer wie schon im Text beschrieben, erfolgte. Nach der letzten Waschung wurde die Membran mit 5 ml TSB-T-Puffer benetzt.

Eine weitere Membran wurde zur Kontrolle 30 Minuten mit 2,5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer geblockt und mit dem im Verhältnis 1:1000 in 2,5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer verdünnten Antikörper Anti-β-Tubulin über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine schon oben beschriebene Waschung mit TBS-T-Puffer. Ein zweiter Maus-Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 in TBS-T-Puffer verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nach einer weiteren Waschung konnten die Proteine mit Hilfe des Imagers sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Die Membran mit den Proteinen wurde zwischen zwei Folien gelegt. Eine Entwicklerlösung, bestehend aus 350 µl Luminol-Lösung und 350 µl Peroxid-Lösung, wurde auf die Membran gegeben und für 5 Minuten belassen. Es war darauf zu achten, dass zwischen den Folien keine Luftblasen vorhanden waren. Zur besseren Verteilung der Lösung, wurde die obere Folie fünfmal angehoben. Nach den 5 Minuten wurde die Membran mit den Folien und der Entwicklerlösung mittig im Imager platziert und das Programm gestartet. Die Belichtungszeit im Imager konnte individuell ausgewählt und gesteigert werden. Nach der Belichtungszeit wurden die Proteine sichtbar und konnten auf dem Computer gespeichert werden.

Mittels ImageJ-Software erfolgte die Auswertung. Die Bandenintensität wurde als prozentuale Intensität auf eine Kontrollprobe normiert.

RNA-Extraktion

In ein 1,5 ml Röhrchen wurden 1×10^6 Zellen pipettiert und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurden zur RNA-Extraktion verwendet.

350 μ l RA1 Lysepuffer und 3,5 μ l β -mercaptoethanol aus dem Macherey-Nagel-Kit wurden zu dem Zellpellet gegeben und mit dem Vortex vermischt. Die Lösung wurde auf einen Filter gegeben und 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Zu dem Durchfluss wurden 350 μ l 70 %iges Ethanol pipettiert und durchmischt. Die Lösung wurde in die blaue Säule aus dem Macherey-Nagel-Kit gegeben. 350 μ l MDB (Membran desalting buffer) wurden hinzugefügt und es erfolgte eine Zentrifugierung für 1 Minute bei 11000 x g. Anschließend wurde ein DNase-Mix, bestehend aus 10 μ l DNase und 90 μ l Reaktionspuffer, hergestellt, 95 μ l davon auf die Säule gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem DNA-Verdau erfolgte das Waschen der Säule mit 200 μ l RAW2 Puffer. Die Säule wurde 30 Sekunden bei 11000 x g zentrifugiert. 600 μ l RA3 Puffer wurden auf die Membran gegeben und wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 250 μ l RA3 Puffer und einer zweiminütigen Zentrifugierung wiederholt. Die gewaschene Säule wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß gestellt und die Elution mit 40 μ l RNase-freiem Wasser erfolgte. Es wurde ein letztes Mal bei 11000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte am Thermo Scientific™ NanoDrop™ Spektralphotometer. Die RNA-Konzentration betrug 311,8 ng/ μ l.

Reverse Transkription

12 – 20 μ l RNA und 1 μ l Primer/Oligo dT wurden in ein Gefäß pipettiert, mit Wasser auf 18,5 μ l aufgefüllt und 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Hinzu kamen danach 6 μ l 5 x Puffer, zuvor auf 40 °C erwärmt, 2 μ l DTT, zuvor auf 40 °C erwärmt, 1,5 μ l dNTPs und 2 μ l Superscript. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 42 °C.

RT-PCR

Von der entstandenen cDNA der MDA-MB-231-Zellen wurden 2 µl in eine Reaktionsgefäß pipettiert und folgende Substanzen aus dem Macherey-Nagel-Kit hinzugefügt:

1,5 µl Reverse-Primer GAPDH, 1,5 µl Forward-Primer GAPDH, 5 µl 10 x Puffer, 10 µl Puffer Q, 1 µl dNTPs, 0,5 µl Taq-Polymerase, 30,5 µl destilliertes Wasser.

Die PCR erfolgte mit folgendem Programm:

1. 1 Minute bei 95 °C
2. 30 Sekunden bei 95 °C
3. 30 Sekunden bei 65 °C
4. 15 Sekunden bei 72 °C
5. 29-fache Wiederholung der Schritte 2 – 4
6. 5 Minuten bei 72 °C
7. Anhalten des Programms bei 4 °C

Ein 2 %iges Agarose-Gel wurde verwendet. 40 µl der Probe, 10 µl 6 x DNA-Leiter und 10 µl Hyperladder als Größenstandard wurden in die Geltaschen gegeben und eine Spannung von 100 Volt wurde für 30 Minuten angelegt.

qPCR

Zur Durchführung der qPCR wurde die hergestellte cDNA benötigt. Zunächst wurde ein Mastermix für eine Probe mit 11 µl Wasser, 2 µl Magnesiumchlorid, 2 µl von dem jeweiligen Forward- und Reverse-Primer und 2 µl der 1 a/b Lösung aus dem Taq Roche-Kit hergestellt. Es wurde ein Mastermix mit dem Primer 3089 und einer mit dem Primer für GAPDH benötigt. Der Mastermix wurde mit der Gesamtzahl der Proben multipliziert und die Mengen der benötigten Substrate angepasst. Die verwendete cDNA entstammte aus den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und den MDA-MB-231-Zellen mit dem LeGO-Vektor, den sogenannte Kontrollzellen. Es waren somit unterschiedliche cDNA-Proben vorhanden. Pro 1 µl cDNA wurden 19 µl des Mastermix benötigt und dreifach aufgetragen. Die Proben wurden in Kapillaren pipettiert. Die Kapillaren wurden mit Hilfe von Adaptern in einer Zentrifuge platziert und zentrifugiert.

Anschließend wurden alle Kapillaren in dem LightCycler platziert und folgendes Programm gestartet:

1. 30 Sekunden bei 94 °C
2. 30 Sekunden bei 94 °C
3. 30 Sekunden bei 61 °C
4. 30 Sekunden bei 71 °C
5. Schritt 2 – 4 wiederholen, 40 Zyklen waren nötig
6. 3 Minuten bei 72 °C
7. Das Programm bei 4 °C beenden

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte am Computer.

Transwell

In ein durchlässiges Transwellssystem, welches aus einer 24-Well-Platte mit Boyden-Kammer bestand, wurden 100 µl Zellsuspension mit 3×10^4 Zellen pipettiert. Die 100 µl wurden in der Boyden-Kammer platziert und unter jede Boyden-Kammer wurden 600 µl zellfreies Medium pipettiert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Zellen in Wells ohne Boyden-Kammer ausgesät. Hier wurden 100 µl Zellsuspension mit 3×10^4 Zellen in 500 µl Medium gegeben. Die 24-Well-Platte mit den Zellen wurde 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Fixierung der Zellen auf der Unterseite der Membran der Boyden-Kammern. Zunächst wurden die Boyden-Kammern mit einer Pinzette aus den Wells entfernt und dreimal mit 400 ml PBS gewaschen. Von der Oberseite der Membran wurden verbliebene Zellen mit einem feuchten Wattestäbchen entfernt. Die Boyden-Kammern wurden noch einmal dreifach mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur in ein Well mit 600 µl Paraformaldehyd gestellt. Nach der Inkubation wurden die Kammern dreimal in ein Becherglas mit PBS getaucht und invertiert auf ein Papiertuch gelegt, damit das komplette PBS abtropfen konnte. Die Ränder der Membranen wurden vorsichtig mit einem Skalpell eingeschnitten, so dass diese entfernt und auf einen Objektträger gelegt werden konnten, wobei die Oberseite der Membranen luftblasenfrei auf dem Objektträger zu liegen kommen mussten. Zur Färbung der Zellkerne wurde 1 Tropfen DAPI-Lösung (Vektorshild 4-1200) auf die Membranen gegeben und mit einem Deckgläschen beschichtet.

Über Nacht konnten die Membranen trocknen und anschließend unter dem Keyence Mikroskop ausgewertet werden. Eine Zellzählung und Beurteilung der Lokalisation der Zellen und der Durchwanderung der Membran erfolgte. Die Zellen, die sich in den Wells ohne Boyden-Kammer befanden, wurden mit 400 µl PBS gewaschen, mit 50 µl Trypsin abgelöst, mit 400 µl Medium suspendiert und mit dem CASY Cell Counter & Analyzer gezählt. Sie dienten der Normalisierung.

Sphäroide

Zur Bildung von Sphäroiden wurde 1,5 %iges Agar noble autoklaviert und 100 µl steril in eine 96-Well-Platte pipettiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen. Zusätzlich wurden in jedes Well 50 µl Medium pipettiert und über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde das gesamte Medium abgenommen und in jedes Well 200 µl Medium mit jeweils 5×10^3 Zellen pipettiert. Die Wellplatte wurde nun für 5 Tage in den Inkubator gestellt. Nach 5 Tagen konnten die eventuell gebildeten Sphäroide unterm Mikroskop beurteilt werden.

F-Aktin-Färbung durch Alexa-fluor488-gekoppeltem Phalloidin

Die Phalloidin-Färbung wurde zur Analyse von F-Aktin durchgeführt. Zunächst wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen in ein Chamber-Slide ausgesät. Für jeden Zellklon wurden zwei Kammern verwendet. Das Chamber Slide wurde für 24 Stunden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag sollten die Zellen zu 50 % konfluent sein.

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden dreimal mit 200 µl PBS gewaschen. 250 µl 4 % PFA wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben und anschließen dreimal mit PBS gewaschen. 250 µl 0,3 % Triton-X-100/PBS wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben, anschließend erfolgte erneut eine dreimalige Waschung mit PBS. Für die Phalloidinfärbung wurden 250 µl Phalloidin-iFluor488 grün im Verhältnis 1:2000 auf die Zellen pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließen dreimal mit PBS gespült und die Zellkerne wurden mit 200 µl DAPI im Verhältnis 1:2000 in PBS für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden ein letztes Mal mit PBS gewaschen, beschichtet und mikroskopiert.

VASP-Färbung durch Immunfluoreszenz

1,5 x 10⁴ Zellen wurden wie im vorherigen Absatz beschrieben in ein Chamber-Slide ausgesät.

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 200 µl zuvor erwärmten PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann 15 Minuten lang bei 37 °C mit erwärmten 4 %igem PFA im Medium und 10 %igem FCS fixiert. Mit erwärmten 0,1 % Triton x-100/PBS wurden die Zellen permeabel gemacht. Die Inkubation erfolgte dreimal für 5 Minuten. Eine dreimalige Spülung der Zellen mit erwärmten PBS erfolgte. Ein erster Antikörper Anti-VASP wurde über Nacht in PBS mit 4 % FCS bei 4 °C auf die Zellen gegeben. Am Folgetag erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem zweiten fluoreszierenden Antikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG IF im Verhältnis 1:2000, nachdem die Zellen dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen wurden. Der zweite Antikörper wurde im Verhältnis 1:2000 in PBS mit 4 % FCS verdünnt und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Antikörpers wurden die Zellen abgedeckt. Eine zusätzliche Färbung des Kerns mit DAPI konnte ebenfalls erfolgen. Hierfür wurde DAPI 1:2000 in PBS verdünnt und für 4 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, mit PBS bedeckt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Auswertung erfolgte mit dem Keyence Life Imager.

Scratch Assay

Es wurde eine 96-Well-Platte verwendet und die gesamte Zeit unter einem Abzug gearbeitet. In 6 ml Medium wurden 2 x 10⁶ Zellen pipettiert und mit einer Mehrkanalpipette 100 µl pro Well ausgesät. Für jeden Zellklon wurden je vier Reihen verwendet. Die Platte wurde über Nacht in den Inkubator gestellt, damit die Zellen an die Platte adhären konnten.

Der Wound Maker wurde am nächsten Tag unter dem Abzug in Wasser und 70 % Ethanol gereinigt. Mit dem Wound Maker wurde dann ein Kratzer in den Zellrasen der Zellen, der vorher eher Lückenlos war, gemacht. Unter dem Mikroskop war der Kratzer gut als zellfreie Fläche erkennbar. Das Medium der Zellen wurde gewechselt und die Zellen zwischendurch mit PBS gewaschen. Die Platte wurde für zwei Tage in das IncueCyte-Analysesystem gestellt. Am Computer konnten die passenden Einstellungen vorgenommen und Messungen durchgeführt werden.

Adhäsionsassay

Für den Adhäsionsassay wurden 96-Well-Platten verwendet. Zunächst wurden die Proteine Kollagen IV und Fibronectin auf Eis aufgetaut. Kollagen I befand sich im Kühlschrank. Anschließend wurden die Proteine mit destilliertem Wasser auf folgende Konzentrationen gebracht:

Kollagen I 0,02 µg/µl

Kollagen IV 0,02 µg/µl

Fibronectin 0,2 µg/µl

Die Platte wurde mit 50 µl Proteinlösung pro Well beschichtet. Jede Proteinlösung wurde viermal pro Zellart aufgetragen. Die Platte wurde daraufhin eine Stunde lang bei 37 °C in Trockenschrank angetrocknet und über Nacht unter dem Abzug komplett getrocknet, wobei der Abzug eingeschaltet und geschlossen war.

Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit 100 µl PBS und einem Ionenmix, der aus Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, Manganchlorid und destilliertem Wasser bestand, gewaschen.

Die Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und eine Menge von 100000 Zellen/100 µl wurde abgenommen und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in serumfreiem Medium und einem Ionenmix resuspendiert.

In jedes Well wurden 100 µl Zellsuspension pipettiert und 1,5 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit PBS und dem Ionenmix (100 µl pro Well) gewaschen. 50 µl 4 % Paraformaldehyd wurden in jedes Well gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch die Zellen fixiert wurden. Das Paraformaldehyd konnte dann einfach abgeklopft werden und 50 µl 0,1 % Kristallviolett wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur in jedes Well gegeben und anschließend abgeklopft. Die Zellen waren nun gefärbt und konnten zweimal mit

100 µl destilliertem Wasser gewaschen werden. Das Wasser wurde ebenfalls abgeklopft und die Zellen wurden mit je 100 µl/ Well 5 % Triton X-100 behandelt.

Die Messung wurde bei 540 nm nach 60 Sekunden Schütteln durchgeführt.

Adhäsionsassay auf Endothelzellen

Dieser Versuch wurde mit Blut-Hirn-Schranken-hCMEC/D3-Endothelzellen durchgeführt. Die Endothelzellen, die sich in einer T75-Kulturflasche befanden, wurden mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin abgelöst. In die Kulturflasche wurden 4 ml Medium gegeben und das Gemisch in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, das alte Medium wurde verworfen und das entstandene Zellpellet wurde mit 2 ml frischem Medium suspendiert. Eine Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer erfolgte. In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 460000 Zellen pipettiert, was 350 µl entsprachen. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, das Medium erneut verworfen und das Zellpellet mit 2 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert. Pro Well wurden 100 µl Zellsuspension verwendet. Es wurden 18 Wells befüllt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C in den Inkubator gestellt.

Die MDA-MB-231-Zellen mit TLL4^{plus} und die Kontrollzellen wurden in T25-Kulturflaschen ausgesät und über Nacht bei 37 °C im Inkubator belassen.

Am nächsten Tag wurden 50 µl Cell Tracker Green CMFA mit 5-Chloromethylfluoresceindiacetat in 10 µl DMSO gelöst und 2 µl dieser Lösung in 10 ml serumfreies Medium pipettiert. Das alte Medium der MDA-MB-231-Zellen wurde verworfen und 5 ml frisches Medium mit der vorher angemischten Cell Tracker-Lösung wurden in die Kulturflasche gegeben. Die Zellen wurden für 45 Minuten bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Anschließend konnte das Medium mit dem Cell Tracker abgenommen werden und frisches Medium ohne Cell Tracker auf die MDA-MB-231-Zellen gegeben werden. Eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte. Die Zellen wurden ein letztes Mal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium bedeckt.

4 Stunden vor Versuchsbeginn mit den Endothelzellen wurde auf die Hälfte der Wells, hier also 9 Wells, 0,01 ng/µl TNF-alpha gegeben. Das Medium der anderen Wells, ohne TNF-alpha, wurde gegen frisches Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Eine Stunde vor Ende der Inkubationszeit der Endothelzellen wurden die MDA-MB-231-Zellen mit PBS (+/+) gewaschen und mit Accumax abgelöst. In diesem Versuch wurde Accumax verwendet, da es die Zellen schonender ablöst als Trypsin. Die MDA-MB-231-Zellen wurden 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 2 ml Medium resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer gezählt.

Nach der Inkubation der Endothelzellen wurde das Medium vorsichtig abgenommen. Die MDA-MB-231-Zellen wurden in 3 ml Medium gelöst und in jedes Well 100 µl Zellsuspension mit 72795 Zellen pro Well, auf die Endothelzellen pipettiert.

Die MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} wurden in drei Wells mit Endothelzellen mit TNF-alpha und in drei Wells mit Endothelzellen ohne TNF-alpha pipettiert. Die MDA-MB-231-Zellen ohne TTLL4^{plus} wurden ebenfalls in 6 Wells, drei mit und drei ohne TNF-alpha, pipettiert. In 6 Wells mit Endothelzellen, 3 mit TNF-alpha und drei ohne, wurden keine MDA-MB-231-Zellen pipettiert. Die Platte wurde 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen, um ungebundene Zellen zu entfernen. In jedes Well wurden 100 µl PBS gegeben und eine Mehrfachmessung am Fluoreszenz-Elisa-Reader bei Exc = 485nm und Em = 535nm erfolgte. Die Anzahl adhärierter Zellen konnte über die Fluoreszenz gemessen werden.

MTT Assay

In eine 96-Well Platte wurden pro Well 200 µl Zellsuspension mit 1×10^4 Zellen gegeben. Für den Versuch wurden MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und MDA-MB-231-Kontrollzellen verwendet. Nach 24 Stunden wurden in die ersten 16 Wells beider Zellarten 20 µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) Stocklösung pipettiert und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die gesamte Flüssigkeit der ersten 16 Wells wurde entfernt und 200 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) wurden jedem der 16 Wells der beiden Zellklone hinzugefügt. Eine Inkubation von 5 Minuten bei 37 °C erfolgte. Das DMSO wurde anschließend gut durchmischt und die Absorption wurde in einem Fluoreszenz-Plattenleser bei 350 nm gemessen. Nach der Messung wurde das DMSO verworfen und die Platte wieder bei 37 °C in den Inkubator gestellt.

Nach 48 und 72 Stunden wurde dieser Vorgang wiederholt. Die Auswertung der metabolischen Aktivität der Zellen konnte nun erfolgen.

Bestimmung der F-Aktin-Konzentration

Zellen die zuvor, wie weiter oben beschrieben, mit Phalloidin und DAPI gefärbt wurden, wurden unter einem Mikroskop fotografiert und ein Overlay der Bilder der Zellen und der Zellkerne wurde erstellt. Die nun sichtbare grüne Fläche der Zellen, außerhalb des Zellkerns, wurde mit ImageJ ausgemessen und durch die blaue Fläche der Zellkerne geteilt. So konnte die Menge des F-Aktins in den einzelnen Zellen ermittelt werden.

Vesikeltransport

Zur Analyse des Vesikeltransports erfolgte zunächst eine Biontix-vermittelte Transfektion eines Vektors in die MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und die Kontrollzellen, der für GFP-BDNF kodiert. Da BDNF sezerniert wird, kann deren Transport in Vesikeln per Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

Die Zellen (1×10^5) wurden in ein Chamber-Slide ausgesät. 2,5 μ l Biontix K2 Multiplier wurden auf die Zellen gegeben und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden zwei Lösungen vorbereitet:

Lösung A: 37,5 μ l Optimem, 1,2 μ l K2 Transfektions-Reagenz,

Lösung B: 37,5 μ l Optimem, 0,429 μ l GFP-BDNF-DNA.

Beide Lösungen wurden vermischt, 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben. Pro Slide wurden 38,31 μ l verwendet. Nach 5 Stunden wurde das Zellmedium ausgewechselt.

Die Zellen wurden mit Hilfe des Keyence-Mikroskops BZ-1000 analysiert. Es wurde ein Zellfeld mit gut sichtbaren Vesikeln ausgewählt und dieses alle 5 Sekunden für eine Minute fotografiert. Auf diese Weise konnte die Geschwindigkeit der Vesikel pro Sekunde berechnet werden.

Ergebnisse

Bevor TTLL4 in MDA-MB-231-Zellen überexprimiert werden konnte, musste es in einen geeigneten Vektor kloniert werden. In dieser Arbeit wurde der sogenannte „LeGO-Vektor“ verwendet, welcher eine stabile Expression des Zielgens in eukaryotischen Zellen ermöglicht.

In den Abbildungen werden die MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} als TTLL4 und die Kontrollzellen ohne TTLL4- Überexpression als control bezeichnet.

Klonierung von TTLL4

Zur Gewinnung der TTLL4-DNA erfolgte eine Lyse der Bakterien und eine Vervielfältigung der TTLL4-DNA mittels einer PCR. Es erfolgte ein PA-Tailing zur Stabilisierung und eine pGEM-T Easy Ligation mit anschließender Transformation in XL-1-Blue-Bakterien. Nach einem Testverdau, mit dem Ziel der Erkennung, in welchem der Klone sich die TTLL4-DNA befand, erfolgte die Sequenzierung mit unterschiedlichen Primern des Klons 5, in welchem die meiste TTLL4-DNA vorhanden war. Nach Aufreinigung der DNA erfolgte die Klonierung der DNA in den Zielvektor LeGO-iC2-Puro+ und die erneute Transformation in XL-1-Blue-Bakterien zur Vervielfältigung der DNA mit anschließender Sequenzierung.

Tabelle 9: Gemessene TTLL4- DNA-Konzentrationen

Nach Plasmidpräparation	Nach PCR clean-up	DNA-Konzentration		
		Klone	Not1-Testverdau	Plasmid-DNA
495,9 ng/μl	153,3 ng/μl	1. Klon 116,6 ng/μl	4. Klon 3,6 Kb	1735,3 ng/μl
		2. Klon 117,1 ng/μl	5. Klon 3,6 Kb	
517,5 ng/μl		3. Klon 140,0 ng/μl	6. Klon 3,6 Kb	
		4. Klon 311,7 ng/μl		
		5. Klon 354,5 ng/μl		
		6. Klon 257,9 ng/μl		

In vorhergehender Tabelle 9 ist zu erkennen, dass die jeweilige DNA-Konzentration immer ausreichend für den nächsten Schritt der Klonierung ist. Es zeigt sich in Spalte 3 und 4, in welchem der Klone die TTLL4-DNA vorhanden ist und in welchem Klon die Konzentration der DNA am höchsten ist. In Klon 5 ist am meisten TTLL4-DNA vorhanden.

Zur Kontrolle wurde das Gen sequenziert, die Sequenz ist im Anhang gezeigt.

Bei der Sequenzierung (siehe Anhang, Abbildung 17) ist zu erkennen, dass die TTLL4-DNA richtig in den Zielvektor eingebaut wurde und für die nächsten Schritte wie der Transfektion und der Transduktion verwendet werden kann.

Nachweis der TTLL4-Überexpression mittels Western Blot und qPCR

Um zu überprüfen, ob es durch die Überexpression von TTLL4 zu einer vermehrten Bildung von glutamylierten Mikrotubuli kommt, wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinlysate auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem Antikörper GT335 Polyglutamylase und einem Sekundärantikörper beschichtet. Die Prozentzahl der glutamylierten Mikrotubuli in beiden Zellklonen wurden errechnet und die Prozentzahl der Kontrollzellen auf 100 % gesetzt.

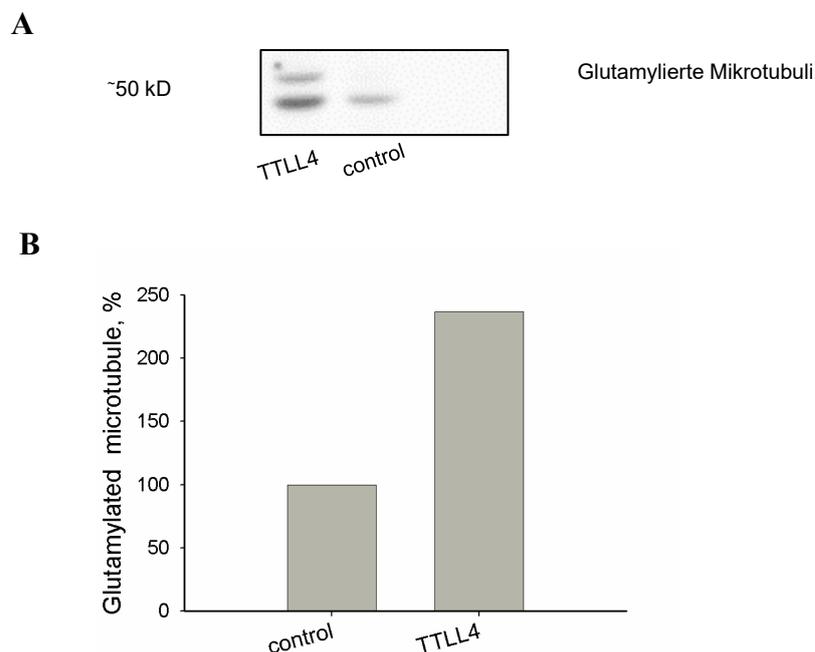


Abbildung 6 Western Blot, welcher zur Quantifizierung der glutamylierten Mikrotubuli verwendet wurde. **(A)** Die unteren Banden der glutamylierten Mikrotubuli sind deutlich sichtbar. **(B)** Säulendiagramm zur Erfassung der Prozentzahl der glutamylierten Mikrotubuli in MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus}, in der Abbildung als TTLL4 bezeichnet, im Vergleich zu den MDA-MB-231-Kontrollzellen, in der Abbildung als control bezeichnet, normalisiert mit Beta-Tubulin. Es erfolgten drei Western Blots, gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot.

In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass bei den MDA-MD-231-Zellen mit TTLL4^{plus} mehr glutamylierte Mikrotubuli als in den Kontrollzellen vorhanden sind. Die Auswertung des Western Blots über ImageJ ergab für die Bande der Kontrollzellen den Zahlenwert von 49069,15 und für die Bande der Zellen mit TTLL4^{plus} den Zahlenwert von 116417,41. In den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} sind insgesamt 237 % glutamylierte Mikrotubuli vorhanden, also 137 % mehr als in den Kontrollzellen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass TTLL4 als glutamyliertes Protein in den Zellen aktiv ist und so zu vermehrtem Vorkommen von glutamylierten Mikrotubuli in den Zellen führt. Die weitere sichtbare Bande in Abbildung 6 (A) zeigt die Tubulin-Expression, welche in Nachfolgeexperimenten noch geprüft und bestätigt werden muss.

Um die TTLL4-mRNA-Konzentration zu prüfen, wurde eine quantitative PCR mit der cDNA der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und der cDNA der MDA-MB-231-Kontrollzellen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde 1 µl cDNA des jeweiligen Zellklons mit einem Mastermix und dem Primer 3089 für TTLL4 vermischt und mit einem LightCycler ausgewertet. Zur Normalisierung wurde der Primer für GAPDH verwendet.

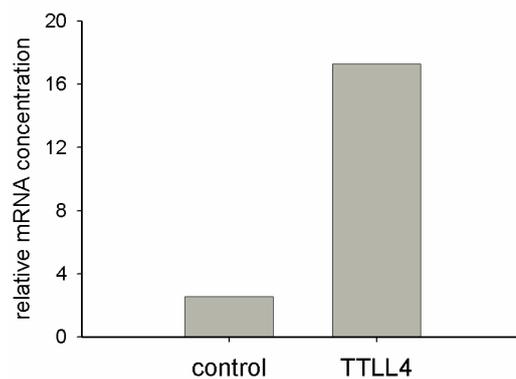


Abbildung 7 Säulendiagramm zur Darstellung der relativen mRNA-Konzentration in den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und den MDA-MB-231-Kontrollzellen. Eine Normalisierung erfolgte mit GAPDH. Es erfolgten drei Versuche, gezeigt ist ein repräsentatives Diagramm.

Die Grafik zeigt, dass die relative mRNA-Konzentration von TTLL4 in den Zellen mit TTLL4^{plus} höher ist als in den Kontrollzellen. Der C_t-Wert, normalisiert durch GAPDH, beträgt 17,35 bei den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und 2,11 bei den Kontrollzellen.

Dies beweist die erfolgreiche Überexpression von TTLL4 in den MDA-MB-231-Zellen.

Effekt von TTLL4 auf die Transmigration und die Migration

Als nächster Schritt wurde der Effekt der Überexpression von TTLL4 auf das metastatische Potential von MDA-MB-231-Zellen *in vitro* analysiert. Begonnen wurde mit dem Transwell Assay, um in Erfahrung zu bringen, ob die TTLL4^{plus} zu einer verbesserten Transmigrationsfähigkeit führt.

Dafür wurden die Zellen in eine Boyden-Kammer auf eine Membran ausgesät und 16 Stunden bei 37° C inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde dann überprüft, wie viele Zellen von der oberen Seite auf die untere Seite der Membran transmigriert sind. Der Wert der gezählten Zellen wurde durch die Fläche der Membran geteilt.

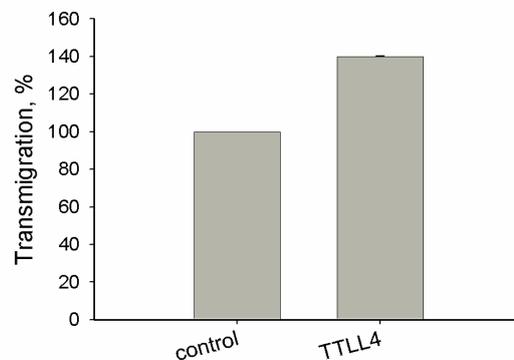


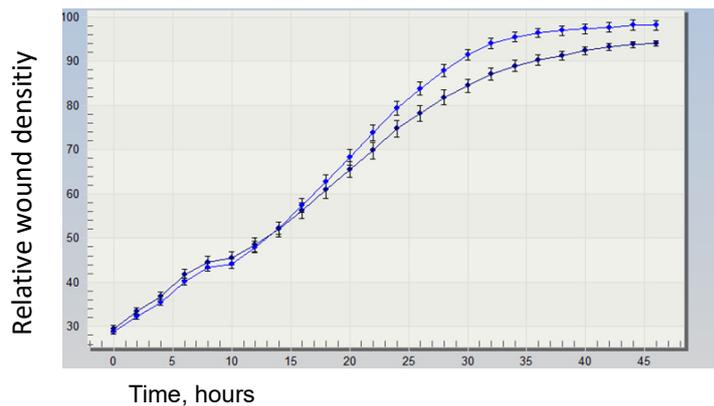
Abbildung 8 Transmigration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und der MDA-MB-231-Kontrollzellen in Prozent. Die Transmigration wurde per Boyden-Kammer untersucht. Gezeigt sind der MW (Mittelwert) und SD (Standardabweichung) aus drei unterschiedlichen Versuchen. N=3.

Die Grafik verdeutlicht, dass im Vergleich zu dem MDA-MB-231-Kontrollzellen, 40 % mehr MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} durch die Membran transmigriert sind. Die berechneten durchschnittlichen Werte ergaben 0,00235 Zellen pro Quadratmikrometer für die Kontrollzellen und 0,00328 Zellen pro Quadratmikrometer für die TTLL4^{plus}-Zellen. Das Ergebnis ist allerdings nicht signifikant. Daraus lässt sich schließen, dass die Fähigkeit der Zellen zur Transmigration durch TTLL4 nicht signifikant verändert wird.

Ein Scratch Assay mit den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und den MDA-MB-231-Kontrollzellen wurde durchgeführt, um die Migrationsfähigkeit und Beweglichkeit der Zellen zu beurteilen.

Hierzu wurden die Zellen auf 96-Well Platten ausgesät und es wurde ein Defekt im Zellrasen erzeugt. Über zwei Tage wurden Aufnahmen der Zellen mit dem IncuCyte-System angefertigt.

A



B

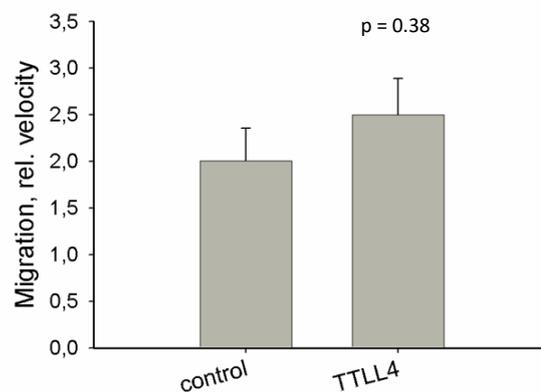


Abbildung 9 Linien- und Säulendiagramm. **(A)** Migration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und der MDA-MD-231-Kontrollzellen innerhalb von 48 Stunden und die errechnete relative Geschwindigkeit. **(B)** Migration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und der MDA-MD-231-Kontrollzellen innerhalb von 48 Stunden mit Auswertung der Steigung aus Grafik (A). N=3.

In den Grafiken ist zu erkennen, dass die Zellen mit TTLL4^{plus} etwas schneller in den erzeugten Spalt wanderten als die Kontrollzellen. Das Ergebnis ist jedoch mit $p = 0,38$ nicht signifikant.

Die Migration der Zellen auf einer ebenen Fläche wird durch die Überexpression von TTLL4 demnach nicht signifikant verändert.

Effekt von TTLL4 auf die Adhäsion

Mehrere Adhäsionsassays mit den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und den MDA-MB-231-Kontrollzellen wurden durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob TTLL4 die Adhäsionsfähigkeit der Zellen auf unterschiedlichen Substraten verändert. Die Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät. Die Beschichtungen der Wells erfolgten mit Kollagen I, Kollagen IV und Fibronectin. Einige Wells blieben unbeschichtet. In einem weiteren Versuch erfolgte die Beschichtung mit hCMEC/D3-Endothelzellen und mit Endothelzellen stimuliert mit TNF-alpha. Zum Abschluss der Versuche wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen

TTLL4				
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Mittelwert in %
Kollagen I	1,56 = 114 %	2,12 = 110 %	2,20 = 115 %	113 %
Kollagen IV	1,58 = 95 %	2,23 = 95 %	1,93 = 88 %	93 %
Fibronectin	1,49 = 85 %	2,34 = 100 %	1,96 = 94 %	93 %
Plastik	1,30 = 87 %	1,33 = 91 %	1,65 = 99 %	92 %
Endothelzellen	6326,33 = 130 %	1697,33 = 192 %	2982,33 = 106 %	143 %
Endothelzellen mit TNF-alpha	6489,67 = 125 %	2510 = 243 %	3999,67 = 108 %	159 %

Kontrollzellen				
	Versuch I	Versuch II	Versuch III	Mittelwert in %
Kollagen I	1,36 = 100 %	1,93 = 100 %	1,91 = 100 %	100 %
Kollagen IV	1,67 = 100 %	2,36 = 100 %	2,20 = 100 %	100 %
Fibronectin	1,75 = 100 %	2,34 = 100 %	2,09 = 100 %	100 %
Plastik	1,49 = 100 %	1,46 = 100 %	1,67 = 100 %	100%
Endothelzellen	4870,67 = 100 %	885 = 100 %	2805,33 = 100 %	100 %
Endothelzellen mit TNF-alpha	5172 = 100 %	1031 = 100 %	3697 = 100 %	100 %

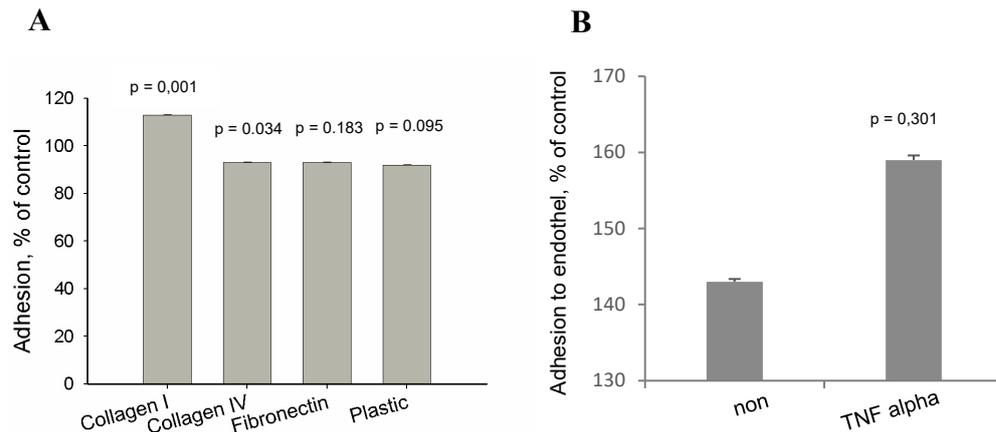


Abbildung 10 Säulendiagramme. **(A)** Adhäsion der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} auf Kollagen I und IV, Fibronectin, unbeschichteten Wells und **(B)** Endothelzellen, mit und ohne TNF alpha, in Prozent. N=3.

In den Grafiken A und B sind signifikante Unterschiede bei der Adhäsion auf Kollagen I und Kollagen IV zu erkennen. Bei der Adhäsion auf Endothelzellen, Fibronectin und Plastik zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Adhäsion der Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen, in diesem Fall Kollagenen durch TTLL4^{plus} verändert wird.

Einfluss von TTLL4 auf das Zellwachstum

Ein Versuch zur Beurteilung der Sphäroidbildung und somit auch der Neigung der Zellen zur Koloniebildung erfolgte.

Für den Versuch wurden die MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und die MDA-MB-231-Kontrollzellen in eine 96-Well Platte mit einer Agarbeschichtung ausgesät und nach fünf Tagen unter einem Mikroskop betrachtet. Hierbei wurde auf die Form der Sphäroide und den Zusammenhalt der Zellen geachtet.

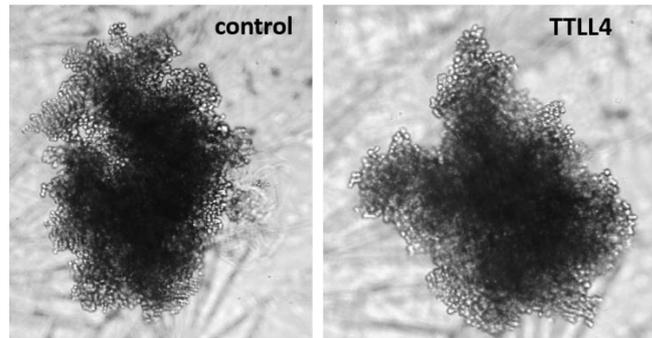


Abbildung 11 Aufnahmen von Sphäroiden der MDA-MB-231-Kontrollzellen und der MDA-MB-231-Zellen mit $TTLL4^{plus}$.

Auf den Aufnahmen sind Sphäroide der Kontrollzellen und der Zellen mit $TTLL4^{plus}$ abgebildet. Es wird sichtbar, dass sich die Sphäroide beider Zellklone nicht stark unterscheiden. MDA-MB-231-Zellen sind grundsätzlich dazu in der Lage Sphäroide zu bilden.

Da sich keine Unterschiede bei der Sphäroidbildung und der Neigung Kolonien zu formen zeigen, ist davon auszugehen, dass $TTLL4$ keinen Einfluss darauf hat. Der Zusammenhalt zwischen den Zellen wird nicht verändert.

Um die Viabilität beider Zelllinien zu vergleichen, wurden die MDA-MB-231-Zellen mit $TTLL4^{plus}$ und die MDA-MB-231-Kontrollzellen mithilfe eines MTT-Assays untersucht.

Die Vitalität wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mittels MTT-Assay gemessen.

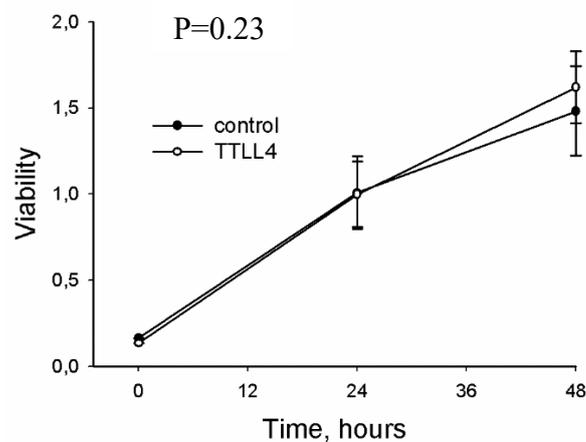


Abbildung 12 Liniendiagramm. Viabilität der MDA-MB-231-Zellen mit $TTLL4^{plus}$ und der MDA-MB-231-Kontrollzellen nach 24, 48 und 72 Stunden. $N=3$. (Arnold et al. 2020).

In dem Diagramm in Abbildung 12 ist zu sehen, dass beide Zellklone nach 24 Stunden eine annähernd gleiche Viabilität zeigen. Nach 48 Stunden ist die Viabilität der TTLL4^{plus}-Zellen etwas höher als die der Kontrollzellen, es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

Eine Veränderung der Viabilität der Zellen durch TTLL4^{plus} ist nicht vorhanden.

Zusammenfassend scheint TTLL4 das Zellwachstum nicht signifikant zu verändern.

Effekt von TTLL4 auf das Aktin-Zytoskelett

Um den Einfluss von TTLL4 auf das Aktinzytoskelett zu untersuchen wurden die Zellen mit Phalloidin gefärbt und das Protein VASP mit Antikörpern markiert. Aktinhaltige Ausläufer wurden unter einem Mikroskop vermessen und gezählt. Ein Vergleich zwischen den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und den Kontrollzellen fand statt.

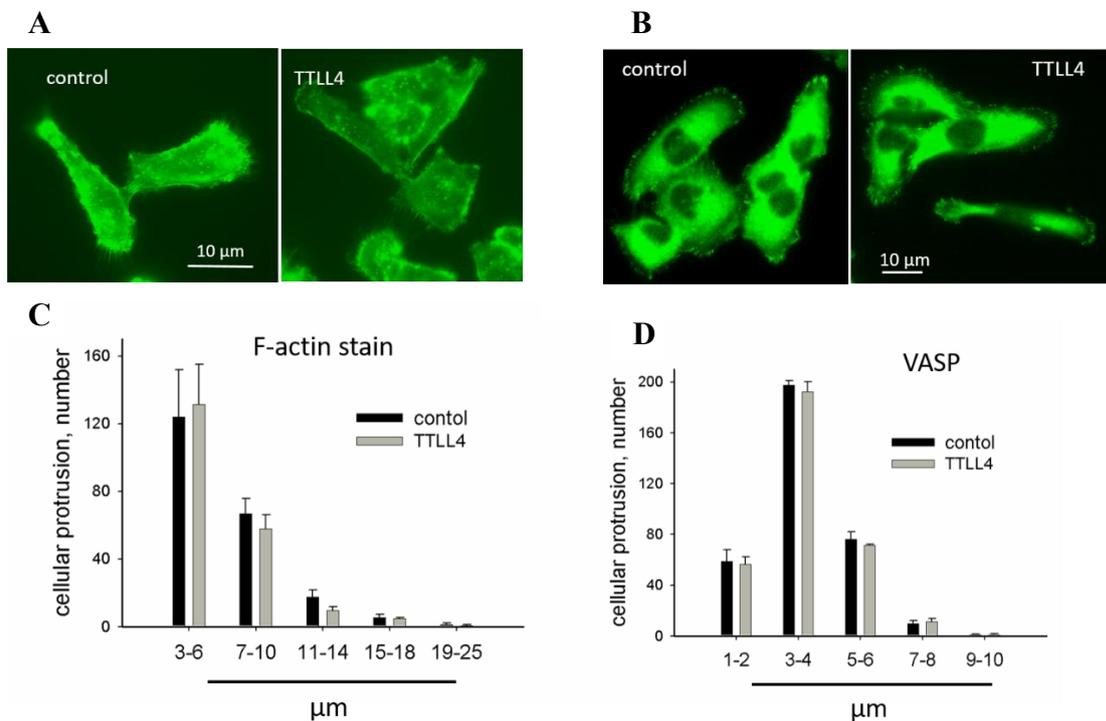


Abbildung 13 Aufnahme der mit (A) Phalloidin und (B) VASP gefärbten Zellen. (C, D) Säulendiagramme mit der Anzahl der unterschiedlich langen aktinhaltigen Zellausläufer der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und der MDA-MB-231-Kontrollzellen. N=3.

Betrachtet man die Länge und die Menge der Aktin-haltigen Zellausläufer, sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zellklonen zu erkennen.

Dieses Ergebnis belegt, dass TTLL4 keinen Einfluss auf die Ausbildung und die Länge der Zellausläufer hat.

Die Zellen wurden mit Phalloidin gefärbt, um die Konzentration von F-Aktin in den TTLL4^{plus}-MDA-MB-231-Zellen mit der Konzentration in den Kontrollzellen zu vergleichen. Es erfolgte eine zusätzliche Färbung der Zellkerne mit DAPI. Die Fluoreszenzintensität von mit Phalloidin gefärbtem Aktin und die Fluoreszenzintensität von den mit DAPI gefärbten Zellkernen wurden gemessen. Es erfolgte eine Division der Fluoreszenzintensität von Aktin durch die Fluoreszenzintensität der Zellkerne.

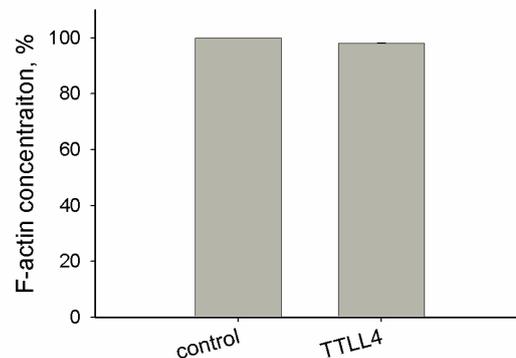


Abbildung 14 Säulendiagramm zur Darstellung der F-Aktin-Konzentration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} und der MDA-MB-231-Kontrollzellen in Prozent. N=3.

Die Grafik stellt das Ergebnis der Messung in Prozent dar. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der F-Aktin-Konzentration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} mit 98 % und der F-Aktin-Konzentration der Kontrollzellen, die auf 100 % gesetzt wurde, vorhanden.

Das Ergebnis zeigt, dass die Konzentration von F-Aktin in den Zellen durch TTLL4^{plus} weder erhöht, noch verringert wird. TTLL4 hat weder einen direkten Einfluss auf den Auf- und Abbau von Aktin-Filamenten, noch beeinflusst es Proteine, die an dem Regulationsmechanismus von F-Aktin beteiligt sind.

Einfluss von TTLL4 auf den Vesikeltransport

Ein Versuch zur Beurteilung der Schnelligkeit des Vesikeltransports folgte als letzter Schritt.

Hierzu wurden die Vesikel mit GFP-BDNF transfiziert und die zurückgelegte Strecke der Vesikel innerhalb von 5 Sekunden unter dem Mikroskop gemessen.

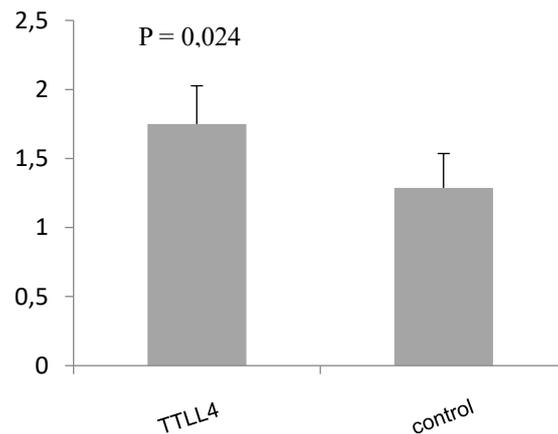


Abbildung 15 Säulendiagramm. Zurückgelegte Strecke der Vesikel in μm innerhalb von 5 Sekunden. Untersucht wurde der Vesikeltransport der MDA-MB-231-Zellen mit $\text{TTLL4}^{\text{plus}}$ und der MDA-MB-231-Kontrollzellen. $N=3$.

In der Grafik ist zu erkennen, dass die Zellen mit $\text{TTLL4}^{\text{plus}}$ durchschnittlich 0,46 Mikrometer mehr innerhalb von 5 Sekunden zurücklegen als die Kontrollzellen. Durch dieses Ergebnis wird erkennbar, dass TTLL4 das Zytoskelett und den Transport der Vesikel signifikant beeinflusst.

Diskussion

Überexpression von TTLL4 in MDA-MB-231-Zellen und daraus folgende Mikrotubuliglutamylierung

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass TTLL4 glutamylierte Mikrotubuli reguliert. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob TTLL4 in MDA-MB-231-Zellen die Glutamylierung von Mikrotubuli beeinflusst und es konnte gezeigt werden, dass TTLL4 einen starken Einfluss auf die Glutamylierung der Mikrotubuli in den MDA-MB-231-Zellen hat. Als glutamylierendes Protein führt TTLL4 in den Zellen bei einer Überexpression zu einer erhöhten Konzentration von glutamylierten Mikrotubuli.

Veränderungen der Stabilität der Mikrotubuli, die Expression von verschiedenen Isotypen von Tubulin und Veränderungen in der posttranslationalen Modifikation an Mikrotubuli konnten bereits bei verschiedenen Karzinomarten beobachtet werden. Diese Veränderungen stehen in Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose und einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Somit könnten Tubulin und mikrotubuliassoziierte Proteine einen Einfluss auf die zelluläre Stressreaktion haben und das Überleben von Karzinomzellen begünstigen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind Mikrotubuli für viele zelluläre Prozesse und für die Stabilität des Zytoskeletts, das Wachstum und die Beweglichkeit der Zellen von Bedeutung (Parker et al. 2014). Bestimmte Therapeutika, die an Tubulin binden, wie z.B. die Taxane, stören die Ausbildung des Spindelapparats und führen somit zu einem mitotischen Arrest und zum Zelltod (Parker et al. 2014; Jordan und Wilson 2004). Es spricht einiges dafür, dass eine vermehrte Stressreaktion in der Interphase der Zellen zu einem häufigeren Zelltod beim Einsatz von an Tubulin bindenden Therapeutika führt. Dies zeigt die Wichtigkeit von Tubulin und Mikrotubuli in der Krebstherapie (Parker et al. 2014; Veldhoen et al. 2013). Es wird vermutet, dass Veränderungen an Mikrotubuli, neben der vermehrten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, zu vermehrtem zellulärem Überleben und zum Tumorwachstum führt. Posttranslationale Modifikationen regulieren zusätzlich die Interaktion zwischen Proteinen im Zytoskelett und beeinflussen die Signale und Funktionen innerhalb der Zellen (Parker et al. 2014).

Die Glutamylierung, eine PTM, findet häufig bei neuronalen Mikrotubuli, bei Mikrotubuli des Spindelapparats, Axonemen, Zilien und Flagellen statt.

Die Ausprägung der Glutamylierung in Zellen wird durch das Gleichgewicht der glutamylierenden und der deglutamylierenden Enzyme bestimmt. Deglutamylasen können der CCP-Familie zugeordnet werden. Durch die Polyglutamylierung wird der Kinesin-1-abhängige Transport postsynaptischer Ladungen in Neuronen und das Dynein in Flagellen, und somit der Zilienschlag, reguliert (Gadadhar et al. 2017; Yu et al. 2015; Kubo et al. 2010; Maas et al. 2009; Janke und Bulinski 2011).

Weiterhin interagieren Mikrotubuli mit unterschiedlichen MAPs, wie den Kinesinen. Kinesine sind in allen eukaryotischen Organismen zu finden und sind ATP-gesteuerte Motorproteine, die an Mikrotubuli binden und Vesikel entlang der Mikrotubuli transportieren. Sie sind außerdem für zelluläre Funktionen, wie der Mitose und Meiose wichtig. Es ist bekannt, dass Veränderungen dieses durch Motorproteine gesteuerten Transports zu unterschiedlichen Erkrankungen führen, zu denen auch Karzinome gehören (Ali und Yang 2020; Yu und Feng 2010).

Die Geschwindigkeit und Prozessivität von Kinesin-1 und -2 werden durch die Polyglutamylierung von Mikrotubuli erhöht. Erfolgte zuvor eine Inhibition des Kinesin-1 durch andere Proteine, konnte diese Inhibition durch eine Polyglutamylierung wieder aufgehoben werden (Roll-Mecak 2020; Sirajuddin et al. 2014).

Besonders Kinesin-1 ist hier von Interesse. Es transportiert Moleküle zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, es reguliert die Mitose, in welcher die Chromosomen entlang des Mikrotubuligerüsts bewegt werden, und es transportiert Vesikel entlang der Mikrotubuli zur Zellperipherie. Hierbei bewegt sich das Kinsein-1 in Richtung der Plusenden der Mikrotubuli und kann sich dabei über mehrere Dimere bewegen, ohne sich von den Mikrotubuli zu lösen (Angerani et al. 2021; Woehlke und Schliwa 2000). In dieser Arbeit wurde zwar nicht untersucht, ob und inwieweit TLL4 die Bindung von Kinesin-1 an Mikrotubuli beeinflusst, für zukünftige Arbeiten wäre dies aber von großem Interesse.

Effekt von TTLL4 auf den Vesikeltransport

Um zu untersuchen, ob TTLL4 auch in MDA-MB-231-Zellen den Vesikeltransport beeinflusst, wurde ein Vektor in den Zellen überexprimiert, der für GFP-BDNF kodiert. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass es zu einer Beschleunigung des Vesikeltransports kam. Durchschnittlich legten die MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4^{plus} 0,46 Mikrometer mehr innerhalb von 5 Sekunden zurück als die Kontrollzellen.

Es ist bereits bekannt und auch in dieser Arbeit beschrieben, dass es in unterschiedlichen Karzinomarten zu einer veränderten Stabilität der Mikrotubuli kommt (Parker et al. 2014). Dies könnte zu einem verbesserten Transport von Vesikeln führen, da es beim Transport bis zur Zellperipherie zu weniger Unterbrechungen des Transportweges kommen könnte.

Ein weiterer wichtiger Punkt sind Kinesine, welche an dem Transport der Vesikel entlang der Mikrotubuli beteiligt sind (Angerani et al. 2021). Durch die Polyglutamylierung kann die Tendenz von Kinesinen an Mikrotubuli zu binden verstärkt werden. Dies könnte ebenfalls zu einem schnelleren Vesikeltransport führen. Wie bereits oben beschrieben, ist hier besonders Kinesin-1 interessant, weil es durch Polyglutamylierung reguliert wird.

Für die betroffenen Tumorzellen kann dies bedeuten, dass es zu einer vermehrten Sekretion von extrazellulären Vesikeln (EVs) wie Exosomen, Mikrovesikeln, sowie Proteinen, wie Adhäsionsproteinen, Wachstumsfaktoren, Lipiden und weiteren kommt. Eine Adhäsion der Karzinomzellen an der Blut-Hirn-Schranke könnte gefördert werden, denn es ist bekannt, dass EVs aus Tumorzellen einen Einfluss auf das umgebene Gewebe haben können, was die Tumorprogression und Metastasenbildung fördern kann. Es wurden bereits EVs aus Tumorzellen gefunden, in denen bestimmte Moleküle wie Fibronectin oder Integrine vermehrt vorhanden waren, wodurch es zu einer veränderten Adhäsion und Invasion der Tumorzellen kam (Becker et al. 2016; Ciardiello et al. 2016; Sung et al. 2015; Keerthikumar et al. 2015).

In zukünftigen Projekten sollte untersucht werden, ob Kinesine vermehrt an glutamylierten Mikrotubuli binden und so der Vesikeltransport beschleunigt wird und ob der beschleunigte Vesikeltransport zu einer stärkeren Adhäsion der Karzinomzellen an der Blut-Hirnschranke führt. Die EVs und deren Inhalt sollten näher betrachtet werden.

Einfluss von TTLL4 auf das metastatische Potential in vitro

Um zu erkennen, ob neben dem Vesikeltransport auch das metastatische Potential von TTLL4 beeinflusst wird, wurde der Einfluss des Proteins auf die Migration, Transmigration und Adhäsion untersucht.

Diese Prozesse wurden in dieser Arbeit genauer betrachtet, da auch hier TTLL4 durch die Stabilisierung der Mikrotubuli darauf hätte Einfluss nehmen können. Neben der Fortbewegung durch Zilien und Flagellen, können sich Zellen auch aktiv von einem Ort zu einem anderen bewegen. Durch die Zellmigration kann neues Gewebe entstehen. Sie hat Einfluss auf die Heilung von Wunden, auf das Immunsystem und kann im Falle von Krebserkrankungen auch Einfluss auf die Ausbreitung der Karzinomzellen haben (Etienne-Manneville 2013; Bravo-Cordero et al. 2012; Friedl und Gilmour 2009). Zellen können entlang einer Zellwand migrieren oder sich innerhalb von Gewebsstrukturen wie dem Nervengewebe bewegen (Etienne-Manneville 2013). Eine Transmigration durch ein Gewebe hindurch ist auch möglich. Während der Migration kommt es zur Protrusion, Adhäsion, Kontraktion und Retraktion. Hierbei, ebenso wie für die Formgebung der Zelle, spielen das Zytoskelett und die Mikrotubuli eine wichtige Rolle (Etienne-Manneville 2013). Wie bereits beschrieben ist der Auf- und Abbau der Mikrotubuli ein dynamischer Prozess. Dieser Prozess unterstützt die Zellmigration und -transmigration. Somit ist es wichtig, die Proteine genauer zu betrachten, die zur Stabilisierung oder Destabilisierung der Mikrotubuli beitragen. Es wurde bereits beobachtet, dass Medikamente, die in den Prozess der Polymerisation und Depolymerisation, bzw. Stabilisierung der Mikrotubuli eingreifen, zu starken Veränderungen der Zellmigration führen (Etienne-Manneville 2013). Da eine Metastasierung von Karzinomen teilweise durch Migration und Transmigration erfolgt, ist die Entwicklung von solchen Medikamenten von großer Bedeutung. Es zeigte sich allerdings, dass TTLL4 keinen signifikanten Einfluss auf die Migration und die Transmigration hat.

Auf der anderen Seite stellen wir fest, dass die Überexpression von TTLL4 zu einer besseren Adhäsion der Zellen auf Kollagen I und Kollagen IV führt.

Die Adhäsion von Karzinomzellen, wie die des Mammakarzinoms an der extrazellulären Matrix, erfolgt durch Integrine an Proteinen, die bei Fibronektin, Laminin, Kollagen, Fibrinogen und Vitronektin zu finden sind.

In Mammakarzinomzellen konnte ein vermehrtes Vorkommen von Untereinheiten des Integrins, wie $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$ und von Heterodimeren, wie $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 6\beta 4$ beobachtet werden und in Verbindung mit der Metastasierung bei Mammakarzinomen gebracht werden (Scully et al. 2012; Li und Feng 2011). Weiterhin wichtig für die Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix sind Adhäsionsmoleküle, welche in der Zellmembran verankert sind, beziehungsweise zum großen Teil zu den Transmembranmolekülen zählen. Zu den Adhäsionsmolekülen gehören die Intergine, Cadherine, Selektine, Proteine der Super-Immunglobulinfamilie und Rezeptoren wie CD44. Bei der Metastasierung von Mammakarzinomen sind Adhäsionsmoleküle von Bedeutung und regulieren die Adhäsion der Karzinomzellen an der extrazellulären Matrix. Es wurde beobachtet, dass die Konzentration der Adhäsionsproteine in Mammakarzinomzellen häufig verändert ist (Li und Feng 2011; Makrilia et al. 2009).

Da bekannt ist, dass Mikrotubuli Adhäsionsproteine in Vesikeln transportieren, gibt es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen dem TLL4-stimulierten Vesikeltransport und der Adhäsion.

Besonders die Integrine sind hier von Interesse, da sie Einfluss auf die Tumorprogression haben und zu Resistenzen gegenüber der Chemotherapie führen können (Li und Feng 2011; Makrilia et al. 2009).

Hierzu sind zukünftig weitere Untersuchungen nötig. Durch Immunzytologie könnte die Lokalisation von Adhäsionsproteinen an der Zelloberfläche analysiert werden. Ebenfalls könnte die Konzentration von Proteinen in der Plasmamembranfraktion durch eine Membranspektrometrie und durch Zellfraktionierung bestimmt werden.

Potentiell durch TLL4 verursachte Veränderung des Aktin-Zytoskeletts

Da die Zell-Adhäsion auch durch Veränderungen der Aktin-Dynamik beeinflusst werden kann, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob TLL4 das Aktin-Zytoskelett beeinflusst. Aktin ist in eukaryotischen Zellen in hohen Konzentrationen vorhanden und liegt als G- und F-Aktin vor. Aktin ist ebenfalls wichtig für die Beweglichkeit und die Form der Zellen, außerdem ist es zusätzlich in viele zelluläre Prozessen involviert.

Durch Polymerisierung von G-Aktin entsteht F-Aktin, welches für den Aufbau von zellulären Protrusionen wichtig ist und damit die Adhäsion und die Migration reguliert (Bisaria et al. 2020; Dominguez und Holmes 2011).

Beide Systeme, das Mikrotubuli- und das Aktin-Zytoskelett, arbeiten bei wichtigen Zellprozessen häufig zusammen. Es wurden vor allem Überschneidungen zwischen dem F-Aktin und den Mikrotubuli beobachtet. Eine Art der Interaktion findet mit Hilfe von Proteinen statt, die Mikrotubuli- und Aktin-Bündel miteinander vernetzen. Einige dieser Proteine können ebenfalls an das Plus-Ende der Mikrotubuli binden und diese mit dem Aktin verbinden, wodurch ein Wachstum der Mikrotubuli entlang der Aktin-Bündel entsteht. Andere Proteine sind dazu im Stande die Enden der Mikrotubuli im Aktin-Zytoskelett zu verankern. Weiterhin kann Aktin selbst als physikalische Barriere dienen und so das Wachstum von Mikrotubuli verhindern und zum Abbau der Mikrotubuli führen. Es wird verhindert, dass die Mikrotubuli die Zellmembran erreichen, was einen Einfluss auf die Form der Zelle hat.

Mikrotubuli und Aktin sind zusätzlich durch RHO GTPasen miteinander gekoppelt und werden durch diese reguliert. Gleichzeitig regulieren auch die Mikrotubuli die RHO GTPasen, wodurch sie indirekt einen Einfluss auch das Aktin haben. Es wird vermutet, dass Mikrotubuli und Aktin ebenfalls durch das Zentrosom reguliert werden.

Eine Veränderung einer der Komponenten des Zytoskeletts oder der Proteine die regulierend involviert sind kann zu Krebserkrankungen führen (Pimm und Henty-Ridilla 2021; Dogterom und Koenderink 2019).

In dieser Arbeit wurde allerdings kein signifikanter Einfluss durch TTLL4 auf das Aktin-Zytoskelett festgestellt. Die gesteigerte Glutamylierung beeinflusst weder die F-Aktin-Konzentration noch die Ausbildung von F-Aktin-haltigen Zellausläufern, was auch erklärt warum die Überexpression von TTLL4 keinen Einfluss auf die Migration und die Transmigration hat.

Zusammenfassende Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TLL4 in Zusammenhang mit dem metastatischen Potential nur die Adhäsion fördert, aber keinen Einfluss auf die Migration, Transmigration oder Viabilität der Zellen hat. Darüber hinaus wurde eine signifikante Beschleunigung des Vesikeltransports gefunden.

Die Polyglutamylierung von Mikrotubuli in Mammakarzinomzellen hat also einen Einfluss auf die Adhäsion der Zellen und den Vesikeltransport.

Dies kann von großer Bedeutung für die Hirnmetastasierung sein, denn Zellen mit TLL4^{plus} haften vermehrt an den Zellen der Bluthirnschranke an. Hierdurch wird die Ausbreitung der Mammakarzinomzellen in das Gehirn erleichtert.

Weiterhin kommt es durch den gesteigerten Vesikeltransport möglicherweise zum vermehrten Transport von Adhäsionsmolekülen an die Oberfläche von Zellen, was die Hirnmetastasierung ebenfalls begünstigen könnte.

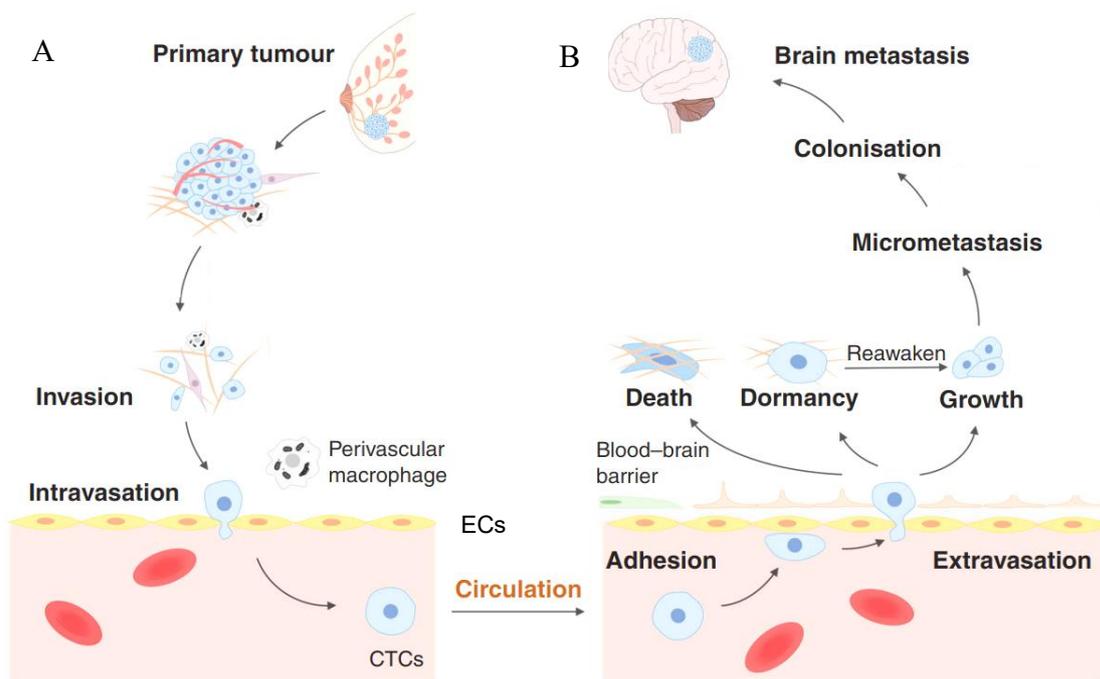


Abbildung 16 Hirnmetastasierung des Mammakarzinoms. **(A)** Lösung einzelner Zellen aus dem Primärtumor und Invasion in das umgebende Gewebe, sowie Intravasation in Blutgefäße. Zu sehen sind CTCs (circulating tumor cells), Tumorzellen, die im Körper über den Blutstrom zirkulieren.

(B) Zellen gelangen zur Blut-Hirn-Schranke. Es kommt zur Adhäsion an Endothelzellen, hier als ECs (endothelial cells) beschrieben und zur Extravasation, wodurch die Bluthirnschranke überwunden und eine Metastasierung in das Gehirn möglich wird. Einige der Zellen sterben ab oder verfallen in einen Ruhezustand, welcher jedoch aufgehoben werden und so zu weiteren Metastasen führen kann. In Anlehnung an (Wang et al. 2021).

Ausblick

In dieser Arbeit erhobene Befunde sollten an weiteren Zelllinien validiert werden, um zu zeigen, ob der Effekt einer Überexpression von TLL4 allgemein ist oder nur bei der Zelllinie der MDA-MB-231-Zellen zutrifft. Von Interesse wären auch weitere Versuche, um zu beobachten, welche Adhäsionsmoleküle in der Plasmamembran der Zellen zu finden sind. Der Vesikeltransport sollte ebenfalls weiter untersucht werden. Hier wäre es besonders interessant zu untersuchen, ob die Prozessivität bestimmter Kinesine durch TLL4-vermittelte Glutamylierung beeinflusst wird.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
A. dest.	Aqua destillata/ destilliertes Wasser
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AseI	Restriktionsenzym, spaltet DNA der Sequenz: ATTAAT
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BRCA-Gen	Breast Cancer – Gen
BSA	Bovines Serumalbumin
° C	Grad Celsius
CCP	Cytosolic carboxypeptidases
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid/ Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CTCs	circulating tumor cells/ zirkulierende Tumorzellen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECs	Endothelial cells/ Endothelzellen
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fetal calf serum/ fötales Kälberserum
FD	Fast Digest
FW-Primer	Forward primer/ vorwärts Primer
HCl	Hydrogenchlorid/ Chlorwasserstoff
hCMEC	Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line
HEK-T293	Human embryonic kidney/ humane embryonale Nieren-Zelllinie
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2/ Transmembranöser Wachstumsfaktorrezeptors 2
HRP	Horseradish Peroxidase

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
M	Mol
mM	Millimol
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MDA-MB-231	M.D. Anderson, Metastasic Breast cancer
MDR-GEN	Multidrug Resistance Gen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger-ribonucleic acid/ Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NotI	Restriktionsenzym, spaltet DNA der Sequenz: GCGGCCGC
P	Signifikanz
PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/ Streptokinase
PFA	Paraformaldehyd PMSF
PTMs	Post-translational modifications/posttranslationale Modifikationen
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction/ quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute/ Umdrehungen pro minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RV-Primer	Reverse primer/ rückwärts Primer
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris buffered saline/ Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamine/ Tetramethylendiamin
TNBC	Triple-negative breast cancer/ Dreifach-negativer Brustkrebst
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTL4	Tubulin Tyrosine Ligase Like 4

TTL4^{plus}

TTL4-Überexpression

VASP

Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein

VEGF

Vascular endothelial growth factor/ vaskulärer endothelialer
Wachstumsfaktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Metastasierung des Mammakarzinoms	11
Abbildung 2 Blut-Hirn-Schranke	13
Abbildung 3 Auf- und Abbau, bzw. Polymerisation und Depolymerisation der Mikrotubuli.....	18
Abbildung 4 Spindelapparat	20
Abbildung 5 (A)Modell eines „Residue conservation profile“ von TTLL4, 5, 6 und 7; (B) Modell eines elektrostatischen Profils von TTLL4, 5, 6 und 7.....	21
Abbildung 6 Western Blot	56
Abbildung 7 Säulendiagramm zur Darstellung der relativen mRNA-Konzentration in den MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4 ^{plus} und den MDA-MB-231-Kontrollzellen.	57
Abbildung 8 Transmigration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4 ^{plus} und der MDA-MB-231-Kontrollzellen in Prozent.....	58
Abbildung 9 Linien- und Säulendiagramm. (A, B) Migration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4 ^{plus} und der MDA-MD-231-Kontrollzellen innerhalb von 48 Stunden und die errechnete relative Geschwindigkeit.	59
Abbildung 10 Säulendiagramme. Adhäsion der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4 ^{plus} auf Kollagen I und IV, Fibronektin, unbeschichteten Wells (A) und Endothelzellen, mit und ohne TNF alpha (B).....	61
Abbildung 11 Aufnahmen von Sphäroiden der MDA-MB-231-Kontrollzellen und der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4 ^{plus}	62
Abbildung 12 Liniendiagramm. Viabilität der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4 ^{plus} und der MDA-MB-231-Kontrollzellen nach 24, 48 und 72 Stunden.....	62
Abbildung 13 Aufnahme der mit Phalloidin (A) und VASP (B) gefärbten Zellen.....	63
Abbildung 14 Säulendiagramm zur Darstellung der F-Aktin-Konzentration der MDA-MB-231-Zellen mit TTLL4 ^{plus} und der MDA-MB-231-Kontrollzellen.....	64
Abbildung 15 Säulendiagramm. Vesikeltransport der MDA-MB-231-Zellen	65
Abbildung 16 Hirnmetastasierung des Mammakarzinoms.	73
Abbildung 17 Komplettssequenzierung der gewonnen Plasmid-TTLL4-DNA	85
Abbildung 18 Vektor LeGO-iC2-Puro+.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien, Kits.....	26
Tabelle 2: Laborgeräte und Materialien.....	28
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	29
Tabelle 4: Antikörper	30
Tabelle 5: Zellen und Bakterienstämme	30
Tabelle 6: Enzyme	30
Tabelle 7: Vektoren und PRIMER	31
Tabelle 8: TTLL4.....	32
Tabelle 9: Gemessene DNA-Konzentrationen TTLL4.....	55
Tabelle 10: Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen.....	60
Tabelle 11: Bradford-Pipettierschema zur Proteinbestimmung.....	91

Literaturverzeichnis

- Abbott, N. Joan; Patabendige, Adjanie A. K.; Dolman, Diana E. M.; Yusof, Siti R.; Begley, David J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*. Vol. 37 (1), 13–25.
- Abbott, N. Joan; Rönnbäck, Lars; Hansson, Elisabeth (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*. Vol. 7 (1), 41–53.
- Akhmanova, Anna; Steinmetz, Michel O. (2015) Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Vol. 16 (12), 711–726.
- Ali, Iftikhar; Yang, Wei-Cai (2020) The functions of kinesin and kinesin-related proteins in eukaryotes. *Cell adhesion & migration*. Vol. 14 (1), 139–152.
- Anastasiadi, Zoi; Lianos, Georgios D.; Ignatiadou, Eleftheria; Harissis, Haralampos V.; Mitsis, Michail (2017) Breast cancer in young women: an overview. *Updates in surgery*. Vol. 69 (3), 313–317.
- Angerani, Simona; Lindberg, Eric; Klena, Nikolai; Bleck, Christopher K. E.; Aumeier, Charlotte; Winssinger, Nicolas (2021) Kinesin-1 activity recorded in living cells with a precipitating dye. *Nature communications*. Vol. 12 (1), 1463.
- Arnold, Julia; Schattschneider, Juliana; Blechner, Christine; Krisp, Christoph; Schlüter, Hartmut; Schweizer, Michaela; Nalaskowski, Marcus; Oliveira-Ferrer, Leticia; Windhorst, Sabine (2020) Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTLL4) overexpression in breast cancer cells is associated with brain metastasis and alters exosome biogenesis. *Journal of experimental & clinical cancer research*. Vol. 39 (1), 205.
- Audebert, Stephane; Desbruyeres, Elisabeth; Gruszczynski, Carole; Koulakoff, Annette; Gros, Franpois; Denoulet, Philippe; Edde, Bernard (1993) Reversible Polyglutamylation of α - and β -Tubulin and Microtubule Dynamics in Mouse Brain Neurons. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 4, 615–626
- Balabanian, Linda; Chaudhary, Abdullah R.; Hendricks, Adam G. (2018) Traffic control inside the cell: microtubule-based regulation of cargo transport. *Biochemical Society*. Vol. 40, 14–17.
- Bálint, Štefan; Verdeny Vilanova, Ione; Sandoval Álvarez, Ángel; Lakadamyali, Melike (2013) Correlative live-cell and superresolution microscopy reveals cargo transport dynamics at microtubule intersections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 110 (9), 3375–3380.
- Becker, Annette; Thakur, Basant Kumar; Weiss, Joshua Mitchell; Kim, Han Sang; Peinado, Hector; Lyden, David (2016) Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer cell*. Vol. 30 (6), 836–848.

- Bisaria, Anjali; Hayer, Arnold; Garbett, Damien; Cohen, Daniel; Meyer, Tobias (2020) Membrane-proximal F-actin restricts local membrane protrusions and directs cell migration. *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 368 (6496), 1205–1210.
- Bobinsec, Y.; Moudjou, M. Fouquet, J. P.; Desbruyères, E.; Eddé, B.; Bornens, M. (1998) Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Vol. 39, 223–232.
- Bravo-Cordero, Jose Javier; Hodgson, Louis; Condeelis, John (2012) Directed cell invasion and migration during metastasis. *Current opinion in cell biology*. Vol. 24 (2), 277–283.
- Brouhard, Gary J.; Rice, Luke M. (2014) The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. *The Journal of cell biology*. Vol. 207 (3), 323–334.
- Bublak, Robert (2019) Mammakarzinom: Prognose nach Hirnmetastasen hängt vom Tumortyp ab. *Im Fokus Onkologie* Vol. (22), 1.
- Ciardiello, Chiara; Cavallini, Lorenzo; Spinelli, Cristiana; Yang, Julie; Reis-Sobreiro, Mariana; Candia, Paola de et al. (2016) Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *International journal of molecular sciences*. Vol. 17 (2), 175.
- Cleveland, Don W.; Mao, Yinghui; Sullivan, Kevin F. (2003) Centromeres and Kinetochores: From Epigenetics to Mitotic Checkpoint Signaling. *Cell*. Vol. 112, 407–421.
- Desai, Arshad; Mitchison, Timothy J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Cell Dev. Biol*. Vol. 13, 83–117
- Deutsche Krebsgesellschaft (2017) Kurzversion S3-Leitlinie Mammakarzinom.
- DiMagno, Eugene P.; Reber, Howard A.; Tempero, Margaret A. (1999) AGA Technical Review on the Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *GASTROENTEROLOGY*. Vol. 117 (6), 1464–1484.
- Dogterom, Marileen; Koenderink, Gijssje H. (2019) Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Vol. 20 (1), 38–54.
- Dominguez, Roberto; Holmes, Kenneth C. (2011) Actin structure and function. *Annual review of biophysics*. Vol. 40, 169–186.
- Eddé, B.; Rossier, J.; Le Caer, J. P.; Desbruyères, E.; Gros, F.; Denoulet, P. (1990) Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 247 (4938), 83–85.
- Etienne-Manneville, Sandrine (2013) Microtubules in cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. Vol. 29, 471–499.
- Forges, Hélène de; Bouissou, Anaïs; Perez, Franck (2012) Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *The international journal of biochemistry & cell biology*. Vol. 44 (2), 266–274.

- Friedl, Peter; Gilmour, Darren (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Vol. 10 (7), 445–457.
- Gadadhar, Sudarshan; Bodakuntla, Satish; Natarajan, Kathiresan; Janke, Carsten (2017) The tubulin code at a glance. *Journal of cell science*. Vol. 130 (8), 1347–1353.
- Garnham, Christopher P.; Roll-Mecak, Antonina (2012) The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*. Vol. 69 (7), 442–463.
- Garnham, Christopher P.; Vemu, Annapurna; Wilson-Kubalek, Elizabeth M.; Yu, Ian; Szyk, Agnieszka; Lander, Gabriel C. et al. (2015) Multivalent Microtubule Recognition by Tubulin Tyrosine Ligase-like Family Glutamylases. *Cell*. Vol. 161 (5), 1112–1123.
- Hallmann, Rupert; Horn, Nathalie; Selg, Manuel; Wendler, Olaf; Pausch, Friederike; Sorokin, Lydia M. (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiological reviews*. Vol. 85 (3), 979–1000.
- Janke, Carsten; Bulinski, Jeannette Chloë (2011) Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. Vol. 12 (12), 773–786.
- Janke, Carsten; Rogowski, Krzysztof; Wloga, Dorota; Regnard, Catherine; Kajava, Andrey V.; Strub, Jean-Marc et al. (2005) Tubulin Polyglutamylase Enzymes Are Members of the TTL Domain Protein Family. *Science (New York, N.Y.)*. Vol. 308 (5729), 1756–1758.
- Jordan, Mary Ann; Wilson, Leslie (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews. Cancer*. Vol. 4, 253-265.
- Kashiwaya, Kotoe; Nakagawa, Hidewaki; Hosokawa, Masayo; Mochizuki, Yasuo; Ueda, Koji; Piao, Lianhua et al. (2010) Involvement of the tubulin tyrosine ligase-like family member 4 polyglutamylase in PELP1 polyglutamylation and chromatin remodeling in pancreatic cancer cells. *Cancer research*. Vol. 70 (10), 4024–4033.
- Keerthikumar, Shivakumar; Gangoda, Lahiru; Liem, Michael; Fonseka, Pamali (2015) Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*. Vol. 6 (17), 15375-15396.
- Kiechle, Marion, Holtermann, Helmut (2011) *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2. Auflage: Urban & Fischer. Berlin.
- Kline-Smith, Susan L.; Walczak, Claire E. (2004) Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Molecular cell*. Vol. 15 (3), 317–327.
- Kozłowski, Jarosław; Kozłowska, Aleksandra; Kocki, Janusz (2015) Breast cancer metastasis – insight into selected molecular mechanisms of the phenomeno. *Postepy Hig Med Dosw*. Vol. 69, 447-451

- Kreienberg, Rolf; Alt, Dieter; Jonat, Walter; Möbus, Volker; Volm, Tanja (2006) Management des Mammakarzinoms. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg (Onkologie aktuell).
- Kubo, Tomohiro; Yanagisawa, Haru-aki; Yagi, Toshiki; Hirono, Masafumi; Kamiya, Ritsu (2010) Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins. *Current biology*. Vol. 20 (5), 441–445.
- Li, Dong-Mei; Feng, Yu-Mei (2011) Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast cancer research and treatment*. Vol. 128 (1), 7–21.
- Liu, Benyu; Ye, Buqing; Zhu, Xiaoxiao; Huang, Guanling; Yang, Liuliu; Zhu, Pingping et al. (2017) IL-7R α glutamylation and activation of transcription factor Sall3 promote group 3 ILC development. *Nature communications*. Vol. 8 (1), 231.
- Maas, Christoph; Belgardt, Dorte; Lee, Han Kyu; Heisler, Frank F.; Lappe-Siefke, Corinna; Magiera, Maria M. et al. (2009) Synaptic activation modifies microtubules underlying transport of postsynaptic cargo. *PNAS*. Vol. 106 (21), 8731– 8736.
- Makrilia, Nektaria; Kollias, Anastasios; Manolopoulos, Leonidas; Syrigos, Kostas (2009) Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer investigation*. Vol. 27 (10), 1023–1037.
- Mathiisen, Thomas Misje; Lehre, Knut Petter; Danbolt, Niels Christian; Ottersen, Ole Petter (2010) The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. Vol. 58 (9), 1094-1103.
- Natarajan, Kathiresan; Gadadhar, Sudarshan; Souphron, Judith; Magiera, Maria M.; Janke, Carsten (2017) Molecular interactions between tubulin tails and glutamylases reveal determinants of glutamylation patterns. *EMBO reports*. Vol. 18 (6), 1013–1026.
- Noma, Naruto; Simizu, Siro; Kambayashi, Yusuke; Kabe, Yasuaki; Suematsu, Makoto; Umezawa, Kazuo (2012) Involvement of NF- κ B-mediated expression of galectin-3-binding protein in TNF- α -induced breast cancer cell adhesion. *Oncology reports*. Vol. 27 (6), 2080–2084.
- Obermeier, Birgit; Daneman, Richard; Ransohoff, Richard M. (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*. Vol. 19 (12), 1584–1596.
- Obermeier, Birgit; Verma, Ajay; Ransohoff, Richard M. (2016) The blood-brain barrier. *Handbook of clinical neurology*. Vol. 133, 39–59.
- Parker, Amelia L.; Kavallaris, Maria; McCarroll, Joshua A. (2014) Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in oncology*. Vol. 4, 153.
- Patt, Debra; Gauthier, Michelle; Giordano, Sharon (2006) Paclitaxel in breast cancer. *Women's health (London, England)*. Vol. 2 (1), 11–21.

- Petry, Sabine (2016) Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly. Annual review of biochemistry. Vol. 85, 659–683.
- Pimm, Morgan L.; Henty-Ridilla, Jessica L. (2021) New twists in actin-microtubule interactions. Molecular biology of the cell. Vol. 32 (3), 211–217.
- Prosser, Suzanna L.; Pelletier, Laurence (2017) Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. Nature reviews. Molecular cell biology. Vol. 18 (3), 187–201.
- Regnard, C.; Desbruyères, E.; Denoulet, P.; Eddé, B. (1999) Tubulin polyglutamylase activity in HeLa cells. Journal of cell science. Vol. 112, 4281–4289.
- Roll-Mecak, Antonina (2020) The Tubulin Code in Microtubule Dynamics and Information Encoding. Developmental cell. Vol. 54 (1), 7–20.
- Scully, Olivia Jane; Bay, Boon-Huat; Yip, George; Yu, Yingnan (2012) Breast Cancer Metastasis. Cancer Genomics & Proteomics. Vol. 9, 311–320.
- Sirajuddin, Minhajuddin; Rice, Luke M.; Vale, Ronald D. (2014) Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. Nature cell biology. Vol. 16 (4), 335–344.
- Spiliotis, Elias T.; Hunt, Stephen J.; Hu, Qicong; Kinoshita, Makoto; Nelson, W. James (2008) Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. The Journal of cell biology. Vol. 180 (2), 295–303.
- Sung, Bong Hwan; Ketova, Tatiana; Hoshino, Daisuke; Zijlstra, Andries; Weaver, Alissa M. (2015) Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. Nature communications. Vol. 6, 7164.
- The Human Protein Atlas (o. J.): Tissue expression of TTLL4 - Summary. [Online im Internet.] URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135912-TTLL4/tissue> [Stand 05.02.2023.16:29].
- Vale, R. D. (2003) The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. Cell. Vol. 112, 467–480.
- van Dijk, Juliette; Miro, Julie; Strub, Jean-Marc; Lacroix, Benjamin; van Dorsselaer, Alain; Edde, Bernard; Janke, Carsten (2008) Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates. The Journal of biological chemistry. Vol. 283 (7), 3915–3922.
- Veldhoen, R. A.; Banman, S. L.; Hemmerling, D. R.; Odsen, R.; Simmen, T.; Simmonds, A. J. et al. (2013) The chemotherapeutic agent paclitaxel inhibits autophagy through two distinct mechanisms that regulate apoptosis. Oncogene. Vol. 32 (6), 736–746.
- Verdeny-Vilanova, Ione; Wehnekamp, Fabian; Mohan, Nitin; Sandoval Álvarez, Ángel; Borbely, Joseph Steven; Otterstrom, Jason John et al. (2017) 3D motion of vesicles along microtubules helps them to circumvent obstacles in cells. Journal of cell science. Vol. 130 (11), 1904–1916.

- Waks, Adrienne G.; Winer, Eric P. (2019) Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. Vol. 321 (3), 288–300.
- Wang, Yajie; Ye, Fangzhou; Liang, Yiran; Yang, Qifeng (2021) Breast cancer brain metastasis: insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies. *British journal of cancer*. Vol. 125 (8), 1056–1067.
- Weaver, Beth A. (2014) How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*. Vol. 25 (18), 2677–2681.
- Weigelt, Britta; Peterse, Johannes L.; van 't Veer, Laura J. (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews. Cancer*. Vol. 5 (8), 591–602.
- Woehlke, Gunther; Schliwa, Manfred (2000) Directional motility of kinesin motor proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1496, 117-127
- Yu, Ian; Garnham, Christopher P.; Roll-Mecak, Antonina (2015) Writing and Reading the Tubulin Code. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 290 (28), 17163–17172.
- Yu, Yue; Feng, Yu-Mei (2010) The role of kinesin family proteins in tumorigenesis and progression: potential biomarkers and molecular targets for cancer therapy. *Cancer*. Vol. 116 (22), 5150–5160.
- Zajac, Allison L.; Goldman, Yale E.; Holzbaur, Erika L. F.; Ostap, E. Michael (2013) Local cytoskeletal and organelle interactions impact molecular-motor- driven early endosomal trafficking. *Current biology*. Vol. 23 (13), 1173–1180.

Anhang

Komplettsequenzierung der gewonnen Plasmid-TTLL4-DNA

Primer p07

Range 1: 1 to 1200 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2082 bits(1127)	0.0	1177/1200(98%)	16/1200(1%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCCTCAGCAGGAACACAGCACTATAAGTATTGGCCTCCGCCAGAAAAGCAGCTTCAAG	60		
Sbjct 1	ATGGCCTCAGCAGGAACACAGCACTATAAGTATTGGCCTCCGCCAGAAAAGCAGCTTCAAG	60		
Query 61	CAGAGTGGTCCCTCAGGCACAGTACCTGCCACGCCACCTGAGAAAACCTCGGAGGGCAGA	120		
Sbjct 61	CAGAGTGGTCCCTCAGGCACAGTACCTGCCACGCCACCTGAGAAAACCTCGGAGGGCAGA	120		
Query 121	GTCTGGCCTCAGGCCCATCAGCAAGTGAAGCCAATCTGGAAGCTGAAAAGAAGCAAGTG	180		
Sbjct 121	GTCTGGCCTCAGGCCCATCAGCAAGTGAAGCCAATCTGGAAGCTGAAAAGAAGCAAGTG	180		
Query 181	GAGACACTGTGACAGGGTTGGGCCAGGCCCTCTTGGGCGTCCCACCCAGCCAGCATAT	240		
Sbjct 181	GAGACACTGTGACAGGGTTGGGCCAGGCCCTCTTGGGCGTCCCACCCAGCCAGCATAT	240		
Query 241	TTCTTTTGCCCCAGCACTTTATGTAGCTCTGGGACCACGGCTGTCATTGCAGGCCACAGC	300		
Sbjct 241	TTCTTTTGCCCCAGCACTTTATGTAGCTCTGGGACCACGGCTGTCATTGCAGGCCACAGC	300		
Query 301	AGTTCCTGTTACCTACACTCTCTCCCGACTTGTTCAACAGCACCCCTGCTATACCGCCGC	360		
Sbjct 301	AGTTCCTGTTACCTACACTCTCTCCCGACTTGTTCAACAGCACCCCTGCTATACCGCCGC	360		
Query 361	TCCAGCTATAGGCAAAAACCGTACCAGCAACTGGAGTCTTTCTGCTTGCCTTCGAGCCCG	420		
Sbjct 361	TCCAGCTATAGGCAAAAACCGTACCAGCAACTGGAGTCTTTCTGCTTGCCTTCGAGCCCG	420		
Query 421	TCAGAAAAAGCCCTTTTTCTCTCCCTCAAAAAGAGCCTCCCTGTCAGTCTCACTGCCAAC	480		
Sbjct 421	TCAGAAAAAGCCCTTTTTCTCTCCCTCAAAAAGAGCCTCCCTGTCAGTCTCACTGCCAAC	480		
Query 481	AAGGCCACTTCTTCCATGGTCTTCTCCATGGCCAGCCCATGGCCTCCTCATCCACAGAA	540		
Sbjct 481	AAGGCCACTTCTTCCATGGTCTTCTCCATGGCCAGCCCATGGCCTCCTCATCCACAGAA	540		
Query 541	CCATACCTCTGCTTGGCAGCGGCTGGGGAAAAACCTTCAGGGAAAGAGCCTGGCCTCTGCC	600		
Sbjct 541	CCATACCTCTGCTTGGCAGCGGCTGGGGAAAAACCTTCAGGGAAAGAGCCTGGCCTCTGCC	600		
Query 601	ATCTCAGGGAAGATCCCATCTCCACTCTCTTCTCCTATAAGCCCATGCTGAATAATAAT	660		
Sbjct 601	ATCTCAGGGAAGATCCCATCTCCACTCTCTTCTCCTATAAGCCCATGCTGAATAATAAT	660		
Query 661	TCCTTCATGTGGCCAAATAGCACGCCAGTGCCTTTATTGCAGACCACACAGGGCCTGAAG	720		
Sbjct 661	TCCTTCATGTGGCCAAATAGCACGCCAGTGCCTTTATTGCAGACCACACAGGGCCTGAAG	720		
Query 721	CCAGTATCGCCACCCAAAGATCCAGCCTGTCTCCTGGCATCATTAGGGGGTACTGGAGAC	780		
Sbjct 721	CCAGTATCGCCACCCAAAGATCCAGCCTGTCTCCTGGCATCATTAGGGGGTACTGGAGAC	780		
Query 781	TGTGCACCGCAGCCTGTTGACCATAAGGTGCCAAAAGCATTGGCACTGTCCCAGCTGAT	840		
Sbjct 781	TGTGCACCGCAGCCTGTTGACCATAAGGTGCCAAAAGCATTGGCACTGTCCCAGCTGAT	840		
Query 841	GCCAGTGCCCATATCGCCTTGTCTACCGTAGCTCCCACGACACATCCACCACCAAGTGT	900		
Sbjct 841	GCCAGTGCCCATATCGCCTTGTCTACCGTAGCTCCCACGACACATCCACCACCAAGTGT	900		
Query 901	GCCTCTTCTGGTATAACCGGAATAACTTAGCCATGAGGGCAGAGCCACTTTCCTGTGCT	960		
Sbjct 901	GCCTCTTCTGGTATAACCGGAATAACTTAGCCATGAGGGCAGAGCCACTTTCCTGTGCT	960		
Query 961	CTGGATGACAGCTCTGATTCCCAGGATCCAACCTAA-GGAGATTCGGTTCACAG-AGGCCG	1018		
Sbjct 961	CTGGATGACAGCTCTGATTCCCAGGATCCAACCTAAAGGGAGATTTCGGTTCACAGAGGCCG	1020		
Query 1019	TGAGGAAATTGACCGCAAGAGGCTTTGAGAAGATGCCAGGCAAGGCTGCCAGCTTGAAC	1078		
Sbjct 1021	TGAGGAAATTGACCGCAAGAGGCTTTGAAAAAATGCCAAGGCAAGGCTGCCAGCTTGAAC	1080		
Query 1079	AGTCTAGTTTCTGAACCCAGCTTCCAG-----TGGAAATGTCCTCAACAG	1124		
Sbjct 1081	AGTCTAGTTTCTGAACCCAGCTTCCAGTGGAAATGTCCTCAATGGAATGTCCTCAACAG	1140		
Query 1125	GAGCAGGCGGTGGAAAACCTCCTGCGGTAATCAGCAGTTTCTCAGGAGGATGCTGGATC	1184		
Sbjct 1141	GAGCAGGCGGTGGAAAACCTCCTGCGGTAATCAGCAGTTTCTCAGGAGGATGCTGGATC	1200		

Primer 670 (600 forward)

Sequence ID: Query_163589 Length: 1132 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1132 Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2082 bits(1127)	0.0	1130/1132(99%)	0/1132(0%)	Plus/Plus	
Query	653	ATAATAATTCCTTCATGTGGCCAAATAGCACGCCAGTGCCTTTATTGCAGACCACACAGG			712
Sbjct	1	ATAATAATTCCTTCATGTGGCCAAATAGCACGCCAGTGCCTTTATTGCAGACCACACAGG			60
Query	713	GCCTGAAGCCAGTATCGCCACCCAAAGATCCAGCCTGTCTCCTGGCATCATTAGGGGGTA			772
Sbjct	61	GCCTGAAGCCAGTATCGCCACCCAAAGATCCAGCCTGTCTCCTGGCATCATTAGGGGGTA			120
Query	773	CTGGAGACTGTGCACCGCAGCCTGTTGACCATAAGGTGCCCAAAGCATTGGCACTGTCC			832
Sbjct	121	CTGGAGACTGTGCACCGCAGCCTGTTGACCATAAGGTGCCCAAAGCATTGGCACTGTCC			180
Query	833	CAGCTGATGCCAGTGCCCATATCGCCTTGTCTACCGTAGCTCCACGACACATCCACCA			892
Sbjct	181	CAGCTGATGCCAGTGCCCATATCGCCTTGTCTACCGTAGCTCCACGACACATCCACCA			240
Query	893	CCAGTGTTCCTCTTCCTGGTATAACCGGAATAACTTAGCCATGAGGGCAGAGCCACTTT			952
Sbjct	241	CCAGTGTTCCTCTTCCTGGTATAACCGGAATAACTTAGCCATGAGGGCAGAGCCACTTT			300
Query	953	CCTGTGCTCTGGATGACAGCTCTGATTCCCAGGATCCAACCTAAGGAGATTCGGTTCACCTG			1012
Sbjct	301	CCTGTGCTCTGGATGACAGCTCTGATTCCCAGGATCCAACCTAAGGAGATTCGGTTCACCTG			360
Query	1013	AGGCCGTGAGGAAATTGACCGCAAGAGGCTTTGAGAAGATGCCGAGGCAAGGCTGCCAGC			1072
Sbjct	361	AGGCCGTGAGGAAATTGACCGCAAGAGGCTTTGAGAAGATGCCGAGGCAAGGCTGCCAGC			420
Query	1073	TTGAACAGTCTAGTTTCTGAACCCAGCTTCCAGTGAATGTCCCTCAACAGGAGCAGGC			1132
Sbjct	421	TTGAACAGTCTAGTTTCTGAACCCAGCTTCCAGTGAATGTCCCTCAACAGGAGCAGGC			480
Query	1133	GGTGGAAACCTCCTGCGGTAATCAGCAGTTTCTCAGGAGGATGCTGGATCGGTGAGGC			1192
Sbjct	481	GGTGGAAACCTCCTGCGGTAATCAGCAGTTTCTCAGGAGGATGCTGGATCGGTGAGGC			540
Query	1193	GGGTCTCCCTGGTGCCTCAGATACCTTGGGGTTGGACAATACAGTCTTCTGTACCAAGC			1252
Sbjct	541	GGGTCTCCCTGGTGCCTCAGATACCTTGGGGTTGGACAATACAGTCTTCTGTACCAAGC			600
Query	1253	GTATCAGCATTACCTCCTTGCCTCACATGCCAGTGGGCTCAATCACAACCTGCCTGTG			1312
Sbjct	601	GTATCAGCATTACCTCCTTGCCTCACATGCCAGTGGGCTCAATCACAACCTGCCTGTG			660
Query	1313	AATCTGTAATTGACTCCTCAGCATTGGAGAAGGCAAAGCTCCAGGTCCCCCTTTTCCTC			1372
Sbjct	661	AATCTGTAATTGACTCCTCAGCATTGGAGAAGGCAAAGCTCCAGGTCCCCCTTTTCCTC			720
Query	1373	AAACTCTTGGCATAGCCAACGTGGCCACCCGCTCTCTTCCATCCAGCTGGGCCAGTCTG			1432
Sbjct	721	AAACTCTTGGCATAGCCAACGTGGCCACCCGCTCTCTTCCATCCAGCTGGGCCAGTCTG			780
Query	1433	AGAAGGAGAGACCTGAGGAGGCCAGGGAGCTGGACTCATCTGATAGGGATATTAGTTGAG			1492
Sbjct	781	AGAAGGAGAGACCTGAGGAGGCCAGGGAGCTGGACTCATCTGATAGGGATATTAGTTGAG			840
Query	1493	CTACTGACCTCCAGCCAGATCAGGCTGAGACTGAAGATACAGAAGAAGAACTAGTAGATA			1552
Sbjct	841	CTACTGACCTCCAGCCAGATCAGGCTGAGACTGAAGATACAGAAGAAGAACTAGTAGATA			900
Query	1553	GTTTGGAAAGACTGTTGTGGCCGTGATGAGAATGAAGAGGAGGAGGAGACTCAGAGTGCT			1612
Sbjct	901	GTTTGGAAAGACTGTTGTGGCCGTGATGAGAATGAAGAGGAGGAGGAGACTCAGAGTGCT			960
Query	1613	CCTCATTAAAGTGTCTCTCCCCAGCGAATCGGTGGCCATGATCTCTAGAAGCTGTATGG			1672
Sbjct	961	CCTCATTAAAGTGTCTCTCCCCAGCGAATCGGTGGCCATGATCTCTAGAAGCTGTATGG			1020
Query	1673	AAATTCTGACCAAAACCCCTTTCCAATCATGAGAAAAGTTGTCCGACCAGCCCTCATCTACA			1732
Sbjct	1021	AAATTCTGACCAAAACCCCTTTCCAATCATGAGAAAAGTTGTCCGACCAGCCCTCATCTACA			1080
Query	1733	GTCTCTTTCCCAACGTTCCCCCTACCATCTATTTGGCACTCGGGATGAGAG			1784
Sbjct	1081	GTCTCTTTCCCAACGTTCCCCCTACCATCTATTTGGCACTCGGGATGAGAG			1132

Primer 671 (800 reverse)

Sequence ID: Query_225857 Length: 1251 Number of Matches: 1

Range 1: 495 to 1251 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1399 bits(757)	0.0	757/757(100%)	0/757(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCCTCAGCAGGAACACAGCACTATAGTATTGGCCTCCGCCAGAAAAGCAGCTTCAAG			60
Sbjct 495	ATGGCCTCAGCAGGAACACAGCACTATAGTATTGGCCTCCGCCAGAAAAGCAGCTTCAAG			554
Query 61	CAGAGTGGTCCCTCAGGCACAGTACCTGCCACGCCACCTGAGAAAACCTCGGAGGGCAGA			120
Sbjct 555	CAGAGTGGTCCCTCAGGCACAGTACCTGCCACGCCACCTGAGAAAACCTCGGAGGGCAGA			614
Query 121	GTCCTGGCCTCAGGCCCATCAGCAAGTGAAGCCAATCTGGAAGCTGGAAAAGAAGCAAGTG			180
Sbjct 615	GTCCTGGCCTCAGGCCCATCAGCAAGTGAAGCCAATCTGGAAGCTGGAAAAGAAGCAAGTG			674
Query 181	GAGACACTGTCAGCAGGGTTGGGCCAGGCCTCTTGGGCGTCCCACCCAGCCAGCATAT			240
Sbjct 675	GAGACACTGTCAGCAGGGTTGGGCCAGGCCTCTTGGGCGTCCCACCCAGCCAGCATAT			734
Query 241	TTCTTTTGCCCCAGCACTTTATGTAGCTCTGGGACCACGGCTGTCATTGCAGGCCACAGC			300
Sbjct 735	TTCTTTTGCCCCAGCACTTTATGTAGCTCTGGGACCACGGCTGTCATTGCAGGCCACAGC			794
Query 301	AGTTCCTGTTACCTACACTCTCTCCCGACTTGTTC AACAGCACCCCTGCTATAACGCCGC			360
Sbjct 795	AGTTCCTGTTACCTACACTCTCTCCCGACTTGTTC AACAGCACCCCTGCTATAACGCCGC			854
Query 361	TCCAGCTATAGGCAAAAACCGTACCAGCAACTGGAGTCTTTCTGCTTGCCTTCGAGCCCG			420
Sbjct 855	TCCAGCTATAGGCAAAAACCGTACCAGCAACTGGAGTCTTTCTGCTTGCCTTCGAGCCCG			914
Query 421	TCAGAAAAAGCCCTTTTTCTCTCCCTCAAAGAGCCTCCCTGTCAGTCTCACTGCCAAC			480
Sbjct 915	TCAGAAAAAGCCCTTTTTCTCTCCCTCAAAGAGCCTCCCTGTCAGTCTCACTGCCAAC			974
Query 481	AAGGCCACTTCTTCCATGGTCTTCTCCATGGCCAGCCCATGGCCTCCTCATCCACAGAA			540
Sbjct 975	AAGGCCACTTCTTCCATGGTCTTCTCCATGGCCAGCCCATGGCCTCCTCATCCACAGAA			1034
Query 541	CCATACTCTGCTTGGCAGCGGCTGGGGAAAACCTTCAGGGAAGAGCCTGGCCTCTGCC			600
Sbjct 1035	CCATACTCTGCTTGGCAGCGGCTGGGGAAAACCTTCAGGGAAGAGCCTGGCCTCTGCC			1094
Query 601	ATCTCAGGGAAGATCCCATCTCCACTCTCTTCTCCTATAAGCCCATGCTGAATAATAAT			660
Sbjct 1095	ATCTCAGGGAAGATCCCATCTCCACTCTCTTCTCCTATAAGCCCATGCTGAATAATAAT			1154
Query 661	TCCTTCATGTGGCCAAATAGCACGCCAGTGCCTTTATTGCAGACCACACAGGGCCTGAAG			720
Sbjct 1155	TCCTTCATGTGGCCAAATAGCACGCCAGTGCCTTTATTGCAGACCACACAGGGCCTGAAG			1214
Query 721	CCAGTATCGCCACCCAAGATCCAGCCTGTCTCCTGGC		757	
Sbjct 1215	CCAGTATCGCCACCCAAGATCCAGCCTGTCTCCTGGC		1251	

Primer 672 (1400 forward)

Range 1: 1 to 1153 Graphics				▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2126 bits(1151)	0.0	1152/1153(99%)	0/1153(0%)	Plus/Plus	
Query 1454	CCAGGGAGCTGGACTCATCTGATAGGGATATTAGTTTCAGCTACTGACCTCCAGCCAGATC			1513	
Sbjct 1	CCAGGGAGCTGGACTCATCTGATAGGGATATTAGTTTCAGCTACTGACCTCCAGCCAGATC			60	
Query 1514	AGGCTGAGACTGAAGATACAGAAGAAGAACTAGTAGATAGTTTGGAAAGACTGTTGTGGCC			1573	
Sbjct 61	AGGCTGAGACTGAAGATACAGAAGAAGAACTAGTAGATAGTTTGGAAAGACTGTTGTGGCC			120	
Query 1574	GTGATGAGAATGAAGAGGAGGGAGGAGACTCAGAGTGTCTCCTCATTAAAGTGTCTCTCCC			1633	
Sbjct 121	GTGATGAGAATGAAGAGGAGGGAGGAGACTCAGAGTGTCTCCTCATTAAAGTGTCTCTCCC			180	
Query 1634	CCAGCGAATCGGTGGCCATGATCTCTAGAAGCTGTATGGAAATTCTGACCAAACCCCTTT			1693	
Sbjct 181	CCAGCGAATCGGTGGCCATGATCTCTAGAAGCTGTATGGAAATTCTGACCAAACCCCTTT			240	
Query 1694	CCAATCATGAGAAAAGTTGTCCGACCAAGCCCTCATCTACAGTCTCTTTCCCAACGTTCCCC			1753	
Sbjct 241	CCAATCATGAGAAAAGTTGTCCGACCAAGCCCTCATCTACAGTCTCTTTCCCAACGTTCCCC			300	
Query 1754	CTACCATCTATTTTGGCACTCGGGATGAGAGAGTGGAGAAAACCTCCCTGGGAACAGAGGA			1813	
Sbjct 301	CTACCATCTATTTTGGCACTCGGGATGAGAGAGTGGAGAAAACCTCCCTGGGAACAGAGGA			360	
Query 1814	AGTTGCTCCGATGGAAGATGAGCACAGTGACCCCAACATTGTCAAGCAGACCATTGGAC			1873	
Sbjct 361	AGTTGCTCCGATGGAAGATGAGCACAGTGACCCCAACATTGTCAAGCAGACCATTGGAC			420	
Query 1874	GGTCCCCTTCAAATCAGCAAAGAAACGATGACTGGCTGGGCTGCTGGGGTCACCACA			1933	
Sbjct 421	GGTCCCCTTCAAATCAGCAAAGAAACGATGACTGGCTGGGCTGCTGGGGTCACCACA			480	
Query 1934	TGAAGTCTCCTAGTTTCCGATCCATTTCGAGAGCATCAGAAGCTAAACCATTCCCAAGGCT			1993	
Sbjct 481	TGAAGTCTCCTAGTTTCCGATCCATTTCGAGAGCATCAGAAGCTAAACCATTCCCAAGGCT			540	
Query 1994	CATTCCAGATTGGGAGGAAGGACCCGCTATGGCGGAACCTGTCACGTATGAGAGCCGCT			2053	
Sbjct 541	CATTCCAGATTGGGAGGAAGGACCCGCTATGGCGGAACCTGTCACGTATGAGAGCCGCT			600	
Query 2054	TTGGCAAGAAGGAGTTTCAGTTTCTTCCCCAGTCTTTATCCTGCCCCAGGACGCCAAGC			2113	
Sbjct 601	TTGGCAAGAAGGAGTTTCAGTTTCTTCCCCAGTCTTTATCCTGCCCCAGGACGCCAAGC			660	
Query 2114	TCCTGCGCAAAGCGTGGGAGAGCAGCAGCCGCCAAAAGTGGATTGTGAAGCCACCAGCAT			2173	
Sbjct 661	TCCTGCGCAAAGCGTGGGAGAGCAGCAGCCGCCAAAAGTGGATTGTGAAGCCACCAGCAT			720	
Query 2174	CAGCTCGAGGCATTGGCATCCAGGTTATTACAAAGTGGAGTCAAGTCCCAAGCGAAGGC			2233	
Sbjct 721	CAGCTCGAGGCATTGGCATCCAGGTTATTACAAAGTGGAGTCAAGTCCCAAGCGAAGGC			780	
Query 2234	CCCTCCTGGTACAGAGGTATCTACACAAACCTACCTCATCAGCGGCAGCAAGTTTGACC			2293	
Sbjct 781	CCCTCCTGGTACAGAGGTATCTACACAAACCTACCTCATCAGCGGCAGCAAGTTTGACC			840	
Query 2294	TGCGGATCTATGTTTATGTCACTTCTACGATCCTCTGCGGATTTACCTCTTTTCAGATG			2353	
Sbjct 841	TGCGGATCTATGTTTATGTCACTTCTACGATCCTCTGCGGATTTACCTCTTTTCAGATG			900	
Query 2354	GACTGGTCCGCTTTGCCAGTTGCAAGTATTCGCCTTCCATGAAGAGCCTTGGCAATAAGT			2413	
Sbjct 901	GACTGGTCCGCTTTGCCAGTTGCAAGTATTCGCCTTCCATGAAGAGCCTTGGCAATAAGT			960	
Query 2414	TCATGCACCTGACCAACTACAGTGTCAATAAAAAAGAAATGCCGAGTACCAGGCCAATGCAG			2473	
Sbjct 961	TCATGCACCTGACCAACTACAGTGTCAATAAAAAAGAAATGCCGAGTACCAGGCCAATGCAG			1020	
Query 2474	ATGAAATGGCTTGCCAGGGCCACAAATGGGCACCTGAAGGCTTTGTGGAACTACCTGAGCC			2533	
Sbjct 1021	ATGAAATGGCTTGCCAGGGCCACAAATGGGCACCTGAAGGCTTTGTGGAACTACCTGAGCC			1080	
Query 2534	AGAAGGGAGTCAATAGCGACTCCATCTGGGAGAAGATAAAGGATGTTGTTGTCAAAACTA			2593	
Sbjct 1081	AGAAGGGAGTCAATAGCGACTCCATCTGGGAGAAGATAAAGGATGTTGTTGTCAAAACTA			1140	
Query 2594	TCATCTCGTCAGA	2606			
Sbjct 1141	TCATCTCGTCAGA	1153			

Primer 673 (2200 forward)

Range 1: 1 to 1108 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2039 bits(1104)	0.0	1107/1108(99%)	1/1108(0%)	Plus/Plus
Query 2253	TCTACACAAACCCCTACCTCATCAGCGGCAGCAAGTTTGACCTGCGGATCTATGTTTATGT			2312
Sbjct 1	TCTACACAAACCCCTACCTCATCAGCGGCAGCAAGTTTGACCTGCGGATCTATGTTTATGT			60
Query 2313	CACTTCCTACGATCCTCTGCGGATTTACCTCTTTTCAGATGGACTGGTCCGCTTTGCCAG			2372
Sbjct 61	CACTTCCTACGATCCTCTGCGGATTTACCTCTTTTCAGATGGACTGGTCCGCTTTGCCAG			120
Query 2373	TTGCAAGTATTCGCCCTCCATGAAGAGCCTTGGCAATAAGTTTCATGCACCTGACCAACTA			2432
Sbjct 121	TTGCAAGTATTCGCCCTCCATGAAGAGCCTTGGCAATAAGTTTCATGCACCTGACCAACTA			180
Query 2433	CAGTGTCAATAAAAAGAATGCCGAGTACCAGGCCAATGCAGATGAAATGGCTTGCCAGGG			2492
Sbjct 181	CAGTGTCAATAAAAAGAATGCCGAGTACCAGGCCAATGCAGATGAAATGGCTTGCCAGGG			240
Query 2493	CCACAAATGGGCACTGAAGGCTTTGTGGAACCTGAGCCAGAGGGAGTCAATAGCGA			2552
Sbjct 241	CCACAAATGGGCACTGAAGGCTTTGTGGAACCTGAGCCAGAGGGAGTCAATAGCGA			300
Query 2553	CTCCATCTGGGAGAAGATAAAGGATGTTGTTGTCAAACTATCATCTCGTCAGAGCCCTA			2612
Sbjct 301	CTCCATCTGGGAGAAGATAAAGGATGTTGTTGTCAAACTATCATCTCGTCAGAGCCCTA			360
Query 2613	TGTGACCAGCCTGCTCAAGATGTATGTGCGACGGCCCTATAGCTGCCATGAACTCTTTGG			2672
Sbjct 361	TGTGACCAGCCTGCTCAAGATGTATGTGCGACGGCCCTATAGCTGCCATGAACTCTTTGG			420
Query 2673	TTTTGACATCATGCTAGACGAAAACCTCAAGCCCTGGGTCTGGAAGTCAACATTTCCCC			2732
Sbjct 421	TTTTGACATCATGCTAGACGAAAACCTCAAGCCCTGGGTCTGGAAGTCAACATTTCCCC			480
Query 2733	AAGCCTCCACTCCAGCTCTCCACTGGATATCAGCATCAAAGGCCAGATGATTCGTGACCT			2792
Sbjct 481	AAGCCTCCACTCCAGCTCTCCACTGGATATCAGCATCAAAGGCCAGATGATTCGTGACCT			540
Query 2793	TCTGAATCTGGCAGGTTTTGTCTGCCCCAATGCAGAGGATATCATTTCCAGCCCCAGCAG			2852
Sbjct 541	TCTGAATCTGGCAGGTTTTGTCTGCCCCAATGCAGAGGATATCATTTCCAGCCCCAGCAG			600
Query 2853	CTGCAGCAGCTCCACCACCAGCCTGCCACCTCCCCTGGGGACAAATGTCGAATGGCTCC			2912
Sbjct 601	CTGCAGCAGCTCCACCACCAGCCTGCCACCTCCCCTGGGGACAAATGTCGAATGGCTCC			660
Query 2913	AGAGCATGTCACTGCACAGAAGATGAAGAAAGCCTATTATCTGACCCAGAAAATTCCTGA			2972
Sbjct 661	AGAGCATGTCACTGCACAGAAGATGAAGAAAGCCTATTATCTGACCCAGAAAATTCCTGA			720
Query 2973	TCAGGACTTCTATGCATCTGTGCTGGATGTCCTGACACCAGATGATGTTCCGGATTCTGGT			3032
Sbjct 721	TCAGGACTTCTATGCATCTGTGCTGGATGTCCTGACACCAGATGATGTTCCGGATTCTGGT			780
Query 3033	TGAGATGGAAGATGAGTTTTCTCGCCGTGGTCAGTTTGAACGAATTTTCTTCTCATAT			3092
Sbjct 781	TGAGATGGAAGATGAGTTTTCTCGCCGTGGTCAGTTTGAACGAATTTTCTTCTCATAT			840
Query 3093	CTCCTCTCGCTATCTCCGCTTTTTTGAGCAGCCACGATATTTCAACATTCTCACCACCA			3152
Sbjct 841	CTCCTCTCGCTATCTCCGCTTTTTTGAGCAGCCACGATATTTCAACATTCTCACCACCA			900
Query 3153	ATGGGAACAGAAATACCATGGCAACAAGCTTAAAGGAGTAGATCTGCTCCGGAGTTGGTG			3212
Sbjct 901	ATGGGAACAGAAATACCATGGCAACAAGCTTAAAGGAGTAGATCTGCTCCGGAGTTGGTG			960
Query 3213	CTACAAAGGGTTCCACAT-GGGAGTTGCTCTGATTCTGCTCCAGTGTGGTCTCTCCCGA			3271
Sbjct 961	CTACAAAGGGTTCCACATGGGGAGTTGCTCTGATTCTGCTCCAGTGTGGTCTCTCCCGA			1020
Query 3272	CATCACTTCTGACTATCTCAAAGGATGACGTGATACTCAATGCCTTCAGCAAATCAGAGA			3331
Sbjct 1021	CATCACTTCTGACTATCTCAAAGGATGACGTGATACTCAATGCCTTCAGCAAATCAGAGA			1080
Query 3332	CTAGCAAGCTGGGAAAACAAAGCTCCTG 3359			
Sbjct 1081	CTAGCAAGCTGGGAAAACAAAGCTCCTG 1108			

Primer p16 reverse

Sequence ID: Query_222953 Length: 1158 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1158 Graphics				▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1877 bits(1016)	0.0	1116/1158(96%)	34/1158(2%)	Plus/Plus	
Query 2477	AAATGGCTTG-CCAGGG-CCAC-AAATGGGCACTG-AAGGCTTTGTGGAACTACCT-GAG	2531			
Sbjct 1	AAATGGCTTGCCCAGGGCCACAAAATGGGCCATGAAAGGTTTTGTGGAAATACCTNNGG	60			
Query 2532	CCAG-AAGGGAGT-CAATA-GCGACTCCA-TCTGGGAGAAGAT-AAAGGATGTTGTTGTC	2586			
Sbjct 61	CCAGAAAGGGAGTNCATAGGGGACTCCATTCTGGGAGAAGATAAAAAGGATGTTGTTGTC	120			
Query 2587	AAAAC-TATCATC----T-----C-----G--TCAGAGCCC-TATGTGACCAGCCTG	2625			
Sbjct 121	AAAACTTTTTTCATCTTGNTCAGAGCCCTTATGTGANTCAGAGCCCTTATGTGACCAGCCTG	180			
Query 2626	CT-CAAGATGTATGTGCGAGCGGCC--TATAGCTG-CCATGAACTCTTTGGTTTTGACATC	2682			
Sbjct 181	CTCCAAGATGTATGTGCGAGCGGCCCTATAGCTGCCCATGAACTCTTTGGTTTTGACATC	240			
Query 2683	ATGCTAGACGAAAACCTCAAGCCCTGGGTCTGGAACTCAACATTTCCCCAAAGCCTCCAC	2742			
Sbjct 241	ATGCTAGACGAAAACCTCAAGCCCTGGGTCTGGAACTCAACATTTCCCCAAAGCCTCCAC	300			
Query 2743	TCCAGCTCTCCACTGGATATCAGCATCAAAGGCCAGATGATTCGTGACCTTCTGAATCTG	2802			
Sbjct 301	TCCAGCTCTCCACTGGATATCAGCATCAAAGGCCAGATGATTCGTGACCTTCTGAATCTG	360			
Query 2803	GCAGTTTTTGTCTGCCAATGCAGAGGATATCATTCCAGCCCCAGCAGCTGCAGCAGC	2862			
Sbjct 361	GCAGTTTTTGTCTGCCAATGCAGAGGATATCATTCCAGCCCCAGCAGCTGCAGCAGC	420			
Query 2863	TCCACCACCAGCCTGCCACCTCCCTGGGGACAAAATGTCGAATGGCTCCAGAGCATGTC	2922			
Sbjct 421	TCCACCACCAGCCTGCCACCTCCCTGGGGACAAAATGTCGAATGGCTCCAGAGCATGTC	480			
Query 2923	ACTGCACAGAAGATGAAGAAAGCCTATTATCTGACCCAGAAAATTCCTGATCAGGACTTC	2982			
Sbjct 481	ACTGCACAGAAGATGAAGAAAGCCTATTATCTGACCCAGAAAATTCCTGATCAGGACTTC	540			
Query 2983	TATGCATCTGTGCTGGATGTCCTGACACCAGATGATGTTCCGGATTCTGGTTGAGATGGAA	3042			
Sbjct 541	TATGCATCTGTGCTGGATGTCCTGACACCAGATGATGTTCCGGATTCTGGTTGAGATGGAA	600			
Query 3043	GATGAGTTTTCTCGCCGTGGTCAGTTTGAACGAATTTTTCTTCTCATATCTCCTCTCGC	3102			
Sbjct 601	GATGAGTTTTCTCGCCGTGGTCAGTTTGAACGAATTTTTCTTCTCATATCTCCTCTCGC	660			
Query 3103	TATCTCCGCTTTTTTGTGAGCAGCCACGATATTTCAACATTCACCACCCAATGGGAACAG	3162			
Sbjct 661	TATCTCCGCTTTTTTGTGAGCAGCCACGATATTTCAACATTCACCACCCAATGGGAACAG	720			
Query 3163	AAATACCATGGCAACAAGCTTAAAGGAGTAGATCTGCTCCGGAGTTGGTGCTACAAAGGG	3222			
Sbjct 721	AAATACCATGGCAACAAGCTTAAAGGAGTAGATCTGCTCCGGAGTTGGTGCTACAAAGGG	780			
Query 3223	TTCCACATGGGAGTTGTCTCTGATTCTGCTCCAGTGTGGTCTCTCCCGACATCACTTCTG	3282			
Sbjct 781	TTCCACATGGGAGTTGTCTCTGATTCTGCTCCAGTGTGGTCTCTCCCGACATCACTTCTG	840			
Query 3283	ACTATCTCAAAGGATGACGTGATACTCAATGCCTTCAGCAAATCAGAGACTAGCAAGCTG	3342			
Sbjct 841	ACTATCTCAAAGGATGACGTGATACTCAATGCCTTCAGCAAATCAGAGACTAGCAAGCTG	900			
Query 3343	GGAAAACAAAGCTCCTGTGAGGTTAGCCTACTACTCTCTGAAGACGGGACCACGCCAAA	3402			
Sbjct 901	GGAAAACAAAGCTCCTGTGAGGTTAGCCTACTACTCTCTGAAGACGGGACCACGCCAAA	960			
Query 3403	TCCAAGAAGACTCAAGCTGGCCTCTCCCTTATCCCCAGAAACCCAGTTCCTCAAAGGAC	3462			
Sbjct 961	TCCAAGAAGACTCAAGCTGGCCTCTCCCTTATCCCCAGAAACCCAGTTCCTCAAAGGAC	1020			
Query 3463	AGTGAGGACACCAGCAAAGAGCCAGCCTTTCTACCCAGACGTTACCTGTGATCAAGTGC	3522			
Sbjct 1021	AGTGAGGACACCAGCAAAGAGCCAGCCTTTCTACCCAGACGTTACCTGTGATCAAGTGC	1080			
Query 3523	TCTGGGCAGACTTCAAGACTTTCTGCTTCTCCACTTTCCAGTCAATCAGTGACTCCCTC	3582			
Sbjct 1081	TCTGGGCAGACTTCAAGACTTTCTGCTTCTCCACTTTCCAGTCAATCAGTGACTCCCTC	1140			
Query 3583	CTGGCTGTGAGCCATAA 3600				
Sbjct 1141	CTGGCTGTGAGCCATAA 1158				

Abbildung 18 Kompletsequenzierung der gewonnen Plasmid-TLL4-DNA

Tabelle 11: Bradford-Pipettierschema zur Proteinbestimmung

Konzentration Referenzprotein: BSA	Volumen Stocklösung, BSA- Standard (1 mg/ml) [μ l] + H ₂ O	Kontrolle
A Leerwert	50 μ l H ₂ O	50 μ l H ₂ O
B Leerwert	50 μ l H ₂ O	50 μ l H ₂ O
C 0,25 μ g BSA	2,5 BSA-Standard+ 47,5 μ l H ₂ O	2,5 BSA-Standard+ 47,5 μ l H ₂ O
D 0,5 μ g BSA	5 BSA-Standard + 45 μ l H ₂ O	5 BSA-Standard + 45 μ l H ₂ O
E 1 μ g BSA	10 BSA-Standard + 40 μ l H ₂ O	10 BSA-Standard + 40 μ l H ₂ O
F 1,5 μ g BSA	15 BSA-Standard + 35 μ l H ₂ O	15 BSA-Standard + 35 μ l H ₂ O
G 2 μ g BSA	20 BSA-Standard + 30 μ l H ₂ O	20 BSA-Standard + 30 μ l H ₂ O
H 3 μ g BSA	30 BSA-Standard + 20 μ l H ₂ O	30 BSA-Standard + 20 μ l H ₂ O

Zu jedem Wert wurden 200 μ l Biorad-Reagenz (1 ml + 4 ml H₂O) gegeben.

Es erfolgte eine Inkubation über 5 Minuten bei Raumtemperatur und eine Messung bei 595 nm.

Vektor LeGO-iC2-Puro+

Created with SnapGene®

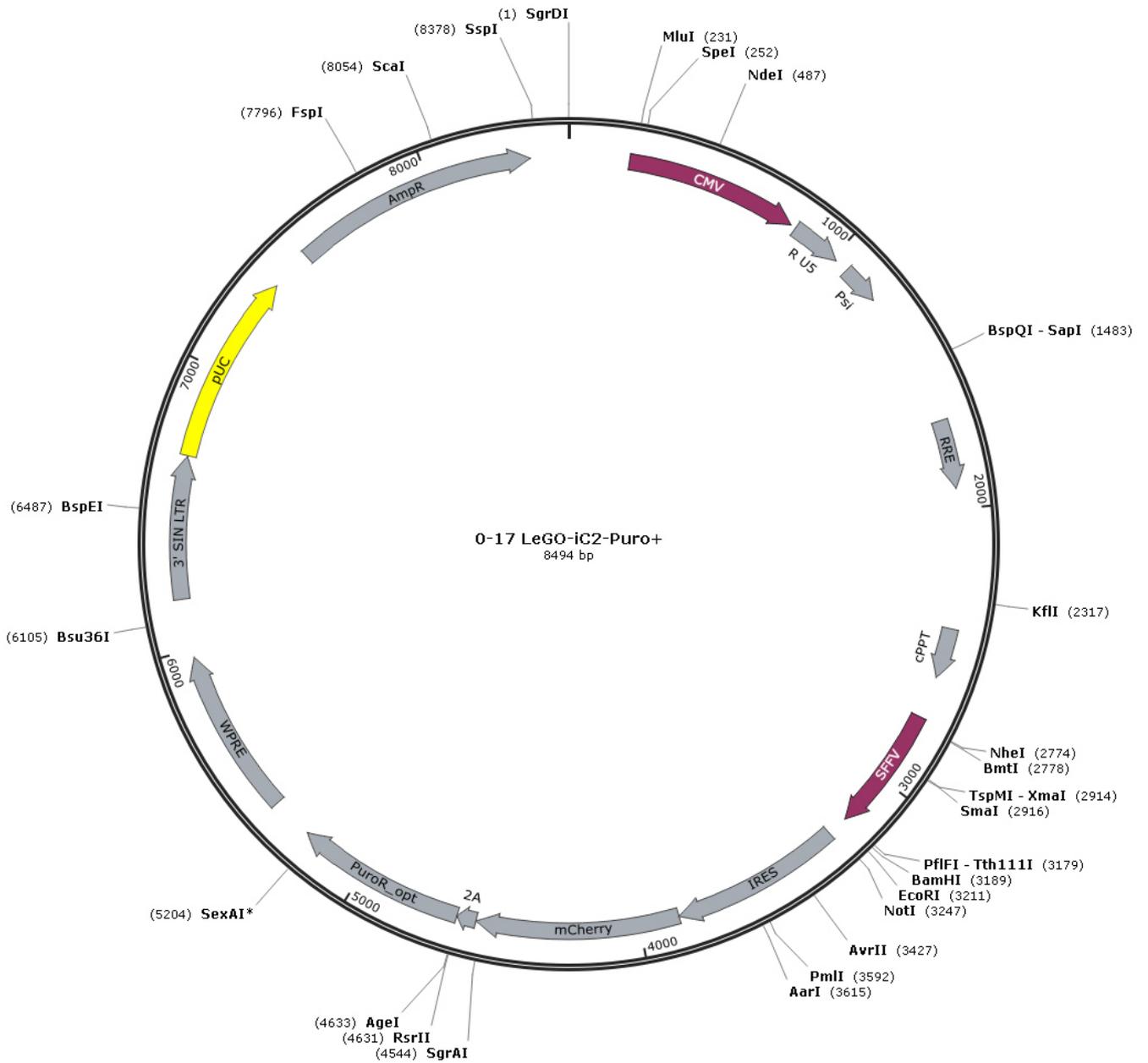


Abbildung 19 Vektor LeGO-iC2-Puro+. Die Gestaltung der Abbildung erfolgte in Snapgene.

Danksagung

Ich bedanke mich insbesondere herzlich bei PD. Dr. Sabine Windhorst für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Beratung und Begleitung während der gesamten Promotion. Danke an Christine Blechner für die Hilfe und Mitwirkung an dieser Arbeit. Mein Dank gilt auch PD. Dr. Leticia Oliveira-Ferrer für die Mitarbeit an diesem Projekt, sowie für die Zurverfügungstellung von Materialien und Räumlichkeiten. Weiterhin bedanke ich mich bei PD Dr. Markus Nalaskowski für das Erläutern von Arbeitsabläufen und die Bereitstellung von Arbeitsmaterialien. Ebenfalls bedanke ich mich bei Stefanie Muhs und Saskia Grüb für die Erklärung von Arbeitsschritten und Beantwortung meiner Fragen.

Danke an Laura Christoph und Deirdre Vincent für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ein großer Dank geht an meinen Bruder Thomas Schattschneider, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und eine große Unterstützung war, an meine Mutter für die Unterstützung während des gesamten Studiums, sowie meinen Vater, ohne den ich nicht an diesem Punkt stünde. Ich danke ebenfalls meinem Freund Alexander Rehr für seine Geduld und den Rückhalt und seiner Familie, die ebenfalls immer für mich da war.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Schattschneider

Vorname: Juliana

Anschrift:

Mobil:

Email:

Geburtstag: 21.08.1987

Geburtsort: Hamburg

Werdegang:

Bildungsweg: 2006 Abitur, Albert – Schweitzer – Gymnasium, Hamburg

01.02.2008-31.01.2011 Ausbildung zur
Gesundheits- und Krankenpflegerin

01.04.20011-01.03.20014 Gesundheits- und Krankenpflegerin
bei Nephrocare Hamburg- Barmbek GmbH

01.10.2012 – 07.06.2019 Medizinstudium an der
Universität Hamburg/ Universitätsklinikum Eppendorf

27.11.2019 Approbation als Ärztin

2019-2023 Promotionsstudentin (Medizin) an der Universität Hamburg

01.06.2020 – aktuell
Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe

Publikation: Arnold, Julia; Schattschneider, Juliana; Blechner, Christine;
Krisp, Christoph; Schlüter, Hartmut; Schweizer, Michaela;
Nalaskowski, Marcus; Oliveira-Ferrer, Leticia; Windhorst, Sabine
(2020)
Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTLL4) overexpression in breast
cancer cells is associated with brain metastasis and alters exosome
biogenesis. Journal of experimental & clinical cancer research.
Vol. 39 (1), 205.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: