

**Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
(Direktorin: Prof. Dr. Claudia Wickenhauser)

**Beeinflussung von Migration und Invasion von  
Ovarialkarzinomzellen durch den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Gunnar Müller  
geboren am 08.12.1982 in Wolfen

Betreuer: PD Dr. rer. nat. Frank Bartel

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Frank Bartel  
Prof. Dr. Wolfgang Ballhausen  
Prof. Dr. Alexander Marx (Mannheim)  
15.12.2014  
16.11.2015

## **Referat**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Beeinflussung von Migration und Invasion von Ovarialkarzinomzelllinien (ES2, SKOV3, OVCAR3, OAW42 und CAOV3) durch direkte Modulation des CD44-ERM-Komplexes untersucht werden. Die Zellen wurden mit Y27632, einem Rho-Kinase-Inhibitor, inkubiert und somit die Aktivierung des Rho-Kinase-ERM-CD44-Komplexes verhindert. Bei der Einzelzellanalyse der Ovarialkarzinomzelllinien ES2 und SKOV3 zeigte sich nach Inkubation mit Y27632 eine signifikante Verringerung der Migrationsstrecken und -geschwindigkeiten. Parallel dazu ließen sich in Immunfluoreszenzversuchen zur Ezrin-Membran-Expression und dem Zusammenhang hinsichtlich migrationspezifischer Abhängigkeiten feststellen, dass eine Dislokation der membranständigen Ezrin-Komponente sowie deren zytoplasmatischer Anreicherung bei Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 erfolgt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei OVCAR3, OAW42 und CAOV3 eine Y27632-induzierte Stimulation der Migration, welche mit einer membranären Ezrin-Akkumulation unter Inhibitor-Zugabe einherging. Das mit dem ERM-Komplex verbundene, transmembranäre CD44-Molekül zeigte nach Y27632-Zugabe keine Konversionsänderung. Somit ist eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens primär auf die Aktivierung der Rho-Kinase und der konsekutiv verbundenen Phosphorylierung des ERM-Komplexes zurückzuführen.

Ferner wurden Sphäroidversuche mit der Zelllinie SKOV3 zur Untersuchung der Tumordinvasion im Verband durchgeführt. Hierbei wurde die Hemmung des invasiven Wachstums mittels Y27632 an einer SKOV3-Tumorzellkolonie festgestellt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Migrations- und Metastasierungsaktivität in Ovarialkarzinomzelllinien durch die Phosphorylierung des CD44-ERM-Komplexes und dessen Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett gesteuert wird.

Weiterführende Versuchsansätze könnten die quantitative Erforschung der spezifischen Migrationshemmung sein, um Metastasierung und systemische Streuung von Ovarialkarzinomen zu stoppen respektive primär zu verhindern. Gegebenenfalls ist durch die Inhibition des ERM-Komplexes nicht nur in Ovarialkarzinomen eine Verhinderung der Metastasierung möglich, sondern auch die Tumorzellausbreitung in anderen Organen, wie ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Zellmigration bei hepatozellulären und kolorektalen Karzinomen zeigen.

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Entstehung von Ovarialkarzinomen	1
1.2 Epidemiologie und Therapie des Ovarialkarzinoms	1
1.3 ERM(Ezrin/Radixin/Moesin)-Komplex: Aufbau und Wirkungsweise	3
1.4 CD44: Aufbau und Wirkungsweise	5
1.5 G-Proteine, Heterotrimere G-Proteine und kleine GTP-asen	6
1.6 Rho-GTPase: Struktur und Funktion	7
1.7 Rho-Kinase: Struktur und Funktion	9
1.8 Reaktionskaskade und Wechselwirkung zwischen CD44, ERM-Komplex und Rho-Kinase	11
1.9 Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632	12
<b>2 Ziele der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>15</b>
3.1 Methoden	15
3.1.1 Herkunft der Zelllinien	15
3.1.2 Sterilisation von Lösungen und Geräten	16
3.1.3 Medien und Kultivierung	17
3.1.4 Zellpassagierung/Zellernte	17
3.1.5 Zellzählung	18
3.2. Motilitätsassay/Einzelzellmigration	18
3.2.1 Vorbemerkungen/Vorbereitungen	18
3.2.2 Versuchsdurchführung	18
3.2.3 Qualitätskontrolle	21
3.3 Motilitätsassay/Sphäroidzellmigration	22
3.4 Immunfluoreszenz	23
3.4.1 Herkunft der Präparateschnitte	23
3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung - Vorgang	24
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>26</b>
4.1 SKOV3: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe	26
4.2 OVCAR3: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe	32
4.3 ES2: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe	37
4.4 OAW42: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe	39
4.5 CAO3: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe	42
4.6 Migrationsverhalten der Tumorzelllinien im Überblick	43
4.7 IF-Nachweis der Proteine und deren Spleißvarianten nach Y27632-Inkubation	47

4.8	Sphäroidzellmigration der Zelllinie SKOV3	48
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
5.1	Ovarielle Karzinogenese und extrazelluläre Matrix: <i>in-vivo</i> -Situation	49
5.2	Neuanordnung („Remodelling“) der Ezrin-Molekül-Lokalisation nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 und dessen Bedeutung für die Zelllinien ES2 und SKOV3	50
5.3	Nachweis und Lokalisationsänderung des Ezrin-Moleküls unter Y27632-Zugabe bei ES2 und SKOV3-Zellen in der IF	52
5.4	Steigerung der Migrationsaktivität von OVCAR3, CAOV3 und OAW42 durch Y27632	53
5.5	Reduktion und Inhibition der Tumorzellmigration	55
5.6	Ausblick	56
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Anlagen/ Anhang</b>	<b>75</b>
9.1	Eingesetzte Chemikalien	75
9.2	Gebrauchswaren und Geräte	76
9.3	Tabellenanhang	77
9.4	Abbildungsverzeichnis	79
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	

## **Abkürzungsverzeichnis**

AFP	Alpha-Feto-Protein
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
Beta-HCG	Beta-Humanes Chorio-Gonadotropin
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
CA-125	Cancer Antigen 125, Carbohydrate Antigen 125
CAOV3	Zelllinie eines Adenokarzinoms des Ovars
CD44s	Cluster of differentiation 44 gesamt
CD44v3	Cluster of differentiation 44, Untereinheit v3
CD44v6	Cluster of differentiation 44, Untereinheit v6
Cdc42	Zellteilungszyklus-Protein 42
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CT	Computertomografie
Cy3	Cyanin 3
DAG	Diacylglycerol/Phorbol ester Bindedomäne
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal-Growth-Factor
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin-Komplex
ES2	Zelllinie eines klarzelliges Ovariakarzinoms des Ovars
Ezrin (H)	Ezrin-Molekül gesamt
Ezrin 353	Ezrin-Molekül, Untereinheit 353
Ezrin 566	Ezrin-Molekül, Untereinheit 566
F-ERM	F-Proteinbande des ERM
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FS	Fat Standard
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor

GRKs	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hyaluronsäure
hASCs	mesenchymale Stammzellen
HCl	Salzsäure
HOSE	Human Ovarian Surface Epithelium
IF	Immunfluoreszenz
Konz	Konzentration (in %)
LIMK	LIM-Kinase
LP	leader peptide
LPA	Lysophosphatidessigsäure
MEM	Modified Eagle Medium
MgCl	Magnesiumchlorid
MLC	Myosin light chain
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Medium Standard
NaOH	Natronlauge
OAW42	Zelllinie eines Zystadenokarzinoms des Ovars
OVCAR3	Zelllinie eines gering differenzierten Adenokarzinoms des Ovars
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
p53	Tumorsuppressorprotein p53
Rac	kleine Untereinheit der Rho-Proteinkinase zur Signaltransduktion
Rho	kleine Untereinheit der Rho-Proteinkinase zur Signaltransduktion
RhoBTB	zwei Rho-Proteine „body-to-body“ durch C-terminale Enden verbunden
Rho-GTPase	Rho-Guanosintriphosphat
Rnd	Rho-Proteinkinase zur Signaltransduktion
ROCK	Rho-Kinase
s	Standardabweichung
S	Sedimentationskoeffizient
Ser	Serin
SKOV3	Zelllinie eines Adenokarzinoms des Ovars
SS	Slim Standard
TBS	Trisgepufferte Saline

TLR	Toll-Like-Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNM	Stadieneinteilung von Karzinomen (T = Tumor, N = Nodulus, M = Metastase)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamine-Iso-Thiocyanate
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Units
uv	ultraviolett
v	Migrationsgeschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$
v'	Mittelwert der Migrationsgeschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$
VEGF	vascular-endothelial-growth-factor
Verd	Verdünnung
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Y27632	Rho-Kinase-Inhibitor Y27632, Synonym: Y 27632 (R)-(+)- <i>trans</i> -N-(4-Pyridyl)-4-(1-aminoethyl) cyclohexanecarboxamide (2HCl)

# **1 Einleitung**

## **1.1 Entstehung von Ovarialkarzinomen**

Es gibt verschiedene Theorien über die Entstehung von Ovarialkarzinomen. Schon 1872 wurden Vermutungen, dass Ovarialkarzinome von der Serosa des Ovars abzuleiten wären, aufgestellt (Ahmed et al., 2012). Daraufhin wurde die Bildung von Epithelinklusionszysten durch Einstülpung des Oberflächenepithels in das ovarielle Stroma als erster Schritt zur Malignomentwicklung postuliert (Cramer et al., 1982, 1983). Weitere Schritte sind die direkte und indirekte Stimulation des eingeschlossenen Epithels durch Gonadotropine sowie durch extra- oder intraglanduläre Östrogene. Im Verlauf kommt es zur Differenzierung, Proliferation sowie mitunter zur malignen Transformation. Verursachende exogene Faktoren, mögliche Defekte in Gensequenzen oder repetitive Störungen in der Epithelproliferation sind bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig identifiziert (Glasspool und McNeish, 2013).

Eine weitere Theorie stützt sich auf das Differenzierungsspektrum des Müller'schen Epithels. Durch häufige Rupturen des ovariellen Oberflächenepithels und sich anschließende, teils überschießende, entzündliche Reparatur- und Regenerationsmechanismen, entstehen vermehrt Defekte in den Differenzierungskaskaden. Hierdurch wird letztendlich auch die Tumorgenese gefördert (Scott und McCluggage, 2006). Ebenfalls denkbar ist die Bildung von Inklusionszysten, dem sogenannten „tissue remodeling“, oder dem aufgehobenen Schutz der Tunica albuginea. Das mit dem Epithel in Kontakt tretende Steroid-produzierende Stroma ist nun vermehrt, teils mutagenen Reizen durch erhöhte Hormonsensibilität ausgesetzt (Feeley und Wells, 2001). Ferner werden Metaplasien des Müller'schen Epithels häufiger in Inklusionszysten als in den ovariellen Oberflächenepithelien angetroffen (Gallion et al. 1990). Im speziellen Fall des serösen Ovarialkarzinoms geht man hierbei von einer *de novo* Entstehung aus. Für die übrigen Ovarialkarzinomunterarten ist derzeit der Entwicklungsprozess noch weitestgehend unklar. Primär heterogene molekulargenetische Ursachen werden ebenfalls postuliert. So spielen einerseits chromosomale Depletionsvorgänge, andererseits hereditäre und erworbene funktionelle Gendefekte eine Rolle (Abdou et al., 2013).

## **1.2 Epidemiologie und Therapie des Ovarialkarzinoms**

Das Ovarialkarzinom stellt die maligne Tumorerkrankung des weiblichen Genitals mit der höchsten Letalitätsrate und einer Inzidenz von etwa 10.000 Erkrankungen pro Jahr in Deutschland dar. Damit nimmt es einen Anteil von 5,4% unter den weiblichen malignen Erkrankungen ein (Pecorelli et al., 2002; Pfisterer et al., 2004). Das Risiko an einem ovariellen Karzinom zu erkranken, steigt mit höherem Lebensalter, insbesondere ab dem



40. Lebensjahr, signifikant an (Böcker et al., 2004; Pignata, 2004; Nik et al., 2013). Pro Jahr sterben ca. 6.700 Frauen an Ovarialkarzinomen in Deutschland aufgrund des meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostizierten Tumors (Nahhas, 1997; Batzler et al., 2002; Tingulstad und Skjeldestad, 2003). Die optimale Therapie ist vornehmlich aufgrund des bestehenden FIGO-Stadiums zu wählen und basiert auf der operativen Resektion und anschließender Chemotherapie. Ziel des operativen Vorgehens ist die komplette oder zumindest weitestgehende Tumorresektion, da der postoperativ verbleibende Tumorrest für die Patientin den entscheidenden Prognosefaktor darstellt (Kaufmann et al., 1995; Engel et al., 2004). Bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen spielt die Tumorreduktion bzw. die komplette Tumorresektion mit adjuvanter Polychemotherapie die größte Rolle für die Prognoseverbesserung der Patientinnen. Hierbei haben Betroffene mit kompletter Tumorresektion und gut ansprechender Chemotherapie ein signifikant längeres Überleben (60% versus 25% nach drei Jahren) als Patientinnen mit Tumorrest oder schlecht ansprechender Chemotherapie. Bei früh erkannten Ovarialkarzinomen ist die Entfernung des Primärtumors mitsamt aller makroskopisch erkennbaren Tumormanifestationen sowie ein sorgfältiges Staging der gesamten Abdominalhöhle erforderlich. Die Primäroperation sollte als „Staging-Laparotomie“ vorgenommen werden und umfasst zumindest Hysterektomie, Adnektomie beidseits, Omentektomie, Appendektomie, pelvine und paraaortale Lymphektomie, Peritonealbiopsie und peritoneale Spülzytologie. Eine anschließende platinhaltige Chemotherapie ist zumeist indiziert. Diese wird häufig mit einer Kombination aus Platin-basierten Substanzen und Taxol durchgeführt. Bisher wird bei nur 15-20% der Patientinnen eine Langzeitremission nach Chemotherapie erreicht (Bakrin et al., 2013). Neueren Studien zufolge ist die intraperitoneale Platingabe der intravasalen Polychemotherapie überlegen und führt demnach zu einem Überlebensvorteil (Burges und Schmalfeldt, 2011). Das Hauptproblem der i.p.-Therapie liegt allerdings in der ausgeprägten Toxizität. Die primäre Ansprechrate ist zwar hoch, jedoch entwickeln sich im Verlauf häufig Resistenzen gegenüber den eingesetzten Substanzen, wie Carboplatin und Paclitaxel (Richardson et al., 2005). Eine zusätzliche Therapieoption bei peritonealen Metastasen könnte sich in der Interaktion der Tumorzellen mit dem Mesothel der Bauchhöhle ergeben. Hierbei ist die Migration der Tumorzellen und deren Invasion ins Peritoneum zu betrachten und eine Inhibition dieser Kaskade anzustreben. Um die Penetration des Endothels zu erreichen, benötigt die Karzinomzelle dabei bestimmte „Konnektionsproteine“ wie G-Proteine, Rho-Kinasen, Phosphorylierungsgrad und Hyaluronsäure (speziell im desmoplastischen Stroma) zur Aktivierung ihres Aktin-Zytoskeletts. Neben Kalziummembranmolekülen erfolgt die CD44-Stimulation durch das intrazelluläre, selbst phosphorylierbare und aktivierbare Ezrin-Radixin-Moesin-Molekül (Bretscher, 1986). Das Protein Ezrin wird in

epithelialen Geweben (Darm, Lunge, Endometrium und Mamma) exprimiert und wurde durch Bretscher als Substrat der Tyrosinkinase entdeckt. Der Zusammenhang zwischen dem ERM-Komplex und dessen Aktivierung durch die Rho-Kinase bzw. die Inhibition der Phosphorylierung durch einen Rho-Kinase-Inhibitor sind weitgehend unerforscht (Bretscher, 1999).

### **1.3 ERM (Ezrin/Radixin/Moesin)-Komplex: Aufbau und Wirkungsweise**

Der ERM-Komplex reguliert das submembranäre Aktin-Zytoskelett und verankert es an verschiedenen Rezeptoren der Plasmamembran. Er besteht aus den drei Eiweißen Ezrin, Radixin und Moesin (siehe Tab. 1). Diese besitzen jeweils drei Hauptdomänen: Erstens die N-terminale F-ERM-Domäne (F - homolog für Protein 4.1), welche die Plasmamembranbindungsstelle darstellt. Zweitens die zentrale  $\alpha$ -helicale Domäne in Form von „coiled coils“ sowie drittens eine C-terminale Aktin-bindende Domäne. In inaktiver, nicht phosphorylierter Form ist der ERM-Komplex in einer geschlossenen Konformation (sog. „gecoilte“ Variante) zytoplasmatisch gelagert, was durch eine starke intramolekulare Assoziation zwischen dem N-terminalen F-ERM-Ende und dem C-terminalen ERM-Anteil bewirkt wird. Dabei ist der C-ERM-Abschnitt in „gecoiltem“ Zustand nicht für eine Interaktion mit dem Aktinmolekül zugänglich (Bretscher, 1999). Eine Möglichkeit zur Aktivierung des ERM-Komplexes ist die Phosphorylierung durch Serin- bzw. Threonin- oder Tyrosinkinasen über die Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Die Phosphorylierungsstellen befinden sich am C-terminalen ERM-Komplex in einem konservierten Threoninrest (Thr566 = Ezrin566). Dieser wird zum Beispiel durch die Rho-Kinase  $\alpha$  oder die Proteinkinase-C phosphoryliert. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung besteht durch Bindung von PIP2 an die „coiled coils“-Domäne (Thr353 = Ezrin353) von Ezrin. Andere Möglichkeiten sind die Aktivierung des Ezrin-Proteins mittels Thrombin, VEGF oder EGF. Somit entstehen durch unterschiedliche Aktivierungsmechanismen verschiedene Molekülmodifikationen mit daraus resultierenden verschiedenen Eigenschaften (Bretscher, 1999; Ivetic und Ridley, 2004; Minase et al., 2010).

Eine gesteigerte Ezrin-Aktivität wurde in kolorektalen Karzinomen, Melanomen, Endometriumkarzinomen und Osteosarkomen beschrieben (Geiger und Stoldt, 2000; Makitie und Carpen, 2001; Ohtani und Sakamoto, 2002). Im Gegensatz zu Radixin und Moesin kann Ezrin durch die calciumabhängige Protease Calpatin von Plasmamembranproteinen (z. Bsp.: CD44) abgespalten werden. Das heißt, dass es neben dem ROCK-ERM-modulierten Migrationsweg auch noch die Möglichkeit einer protease-gesteuerten, Kalziumkanal-induzierten Fortbewegung der Tumorzellen gibt.

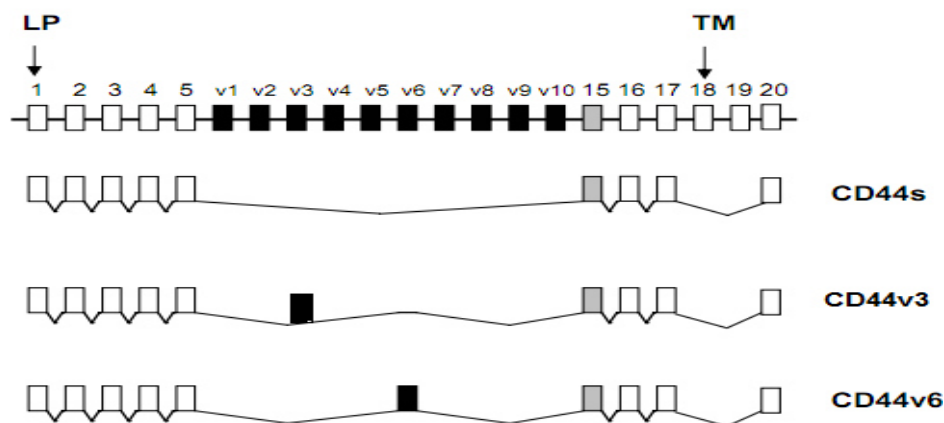
Tab. 1: Vergleich der einzelnen Komponenten des ERM-Komplexes

	<b>Ezrin</b>	<b>Radixin</b>	<b>Moesin</b>
<b>Synonym</b>	Cytovillin, Villin2	-----	MSN (Membrane-organizing-extension-spike-protein)
<b>Chromosom</b>	6q25,2-26	11q23	Xq11.2-q12
<b>Aminosäuren</b>	586 (NCBI-A-Nr: NP_003370)	583 (NCBI-A-Nr: NP_002897)	577 (NCBI-A-Nr: NP_002435)
<b>zelluläre Lokalisation</b>	Zytoplasma Zellmembran	Zytoplasma Zellmembran	Zytoplasma, Zellmembran, Nukleus
<b>Expression im Gewebe</b>	Epithelien, Astrozyten, Basalganglien	natürliche Killerzellen Astrozyten	in allen Geweben
<b>Phosphorylierungsstellen</b>	<b>Tyr 146</b> durch EGF-Rezeptor Lck <b>Thr 235</b> durch Cdk 5 <b>Tyr 353</b> durch EGF Rezeptor <b>Thr 567</b> durch PKC, ROCK1	<b>Thr 564</b> durch ROCK1 <b>Thr 573</b> durch ROCK1	<b>Thr 558</b> durch PKC, ROCK1

In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass Radixin und Moesin eine große Rolle bei der Ausbildung respektive Stabilisierung von Axonen und Dendriten zugesprochen werden kann. Paglini und Castelo zeigten, dass Moesin und Radixin vor allem in Filopodien exprimiert werden (Berrymann und Franck, 1993; Paglini und Kunda, 1998; Castelo und Jay, 1999). Nach Phosphorylierung der Proteine werden verschiedene Zell-Zell-Kontakte ermöglicht, eine Signaltransduktion in Gang gesetzt und somit die Migration der Zellen angestoßen. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch wenige Arbeiten über Moesin und Radixin in ovariellen Tumoren. Bisher gelang der Nachweis von Moesin in einer Mammakarzinomzelllinie sowie beim verhornenden Plattenepithelkarzinom des Pharynx (Chen und Mandel, 1997; Carmeci und Thompson, 1998; Kobayaschi und Sagara, 2003; Kitajiri und Fukumoto, 2004). Im Rahmen der hämatogenen bzw. lymphogenen Metastasierung einer Tumorzelllinie stellt die Penetration von Karzinomzellen durch die Endothelzellschicht einen wesentlichen Faktor dar. Hierbei spielt neben dem intrazellulären ERM-Komplex das transmembranäre CD44 bei der Interaktion der Karzinomzelle mit der Mesothelzelloberfläche eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Tumorinvasion (Bretscher, 1986).

#### 1.4 CD44: Aufbau und Wirkungseise

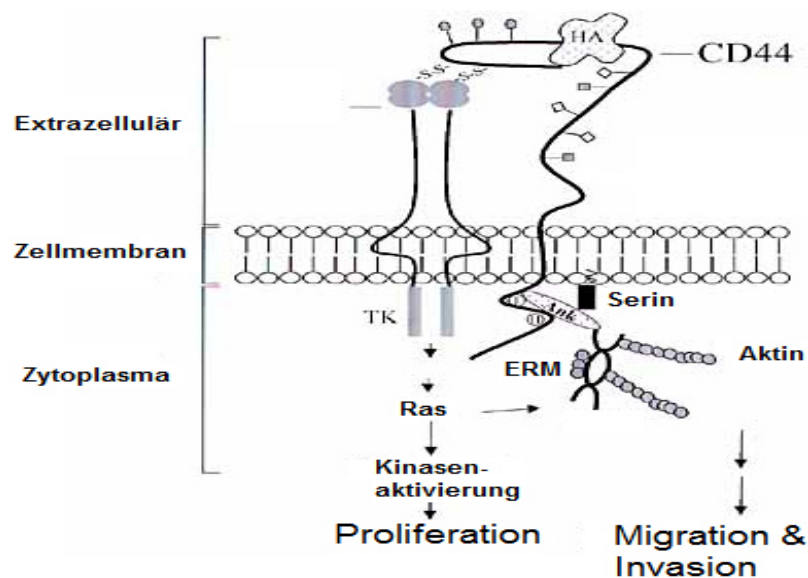
Die Familie der CD44-Moleküle gehört zu den Typ-I-Transmembranglykoproteinen, die auf einer Vielzahl von epithelialen, mesenchymalen und hämatopoetischen Zellen vorkommen. CD44 besitzt eine extrazelluläre Funktionseinheit mit Unterteilung in eine aminoternale, eine variable und eine Stammregion. Dabei fungiert die aminoternale Domäne als LINK-Region für die Bindung an Hyaluronsäure und andere Liganden (Banerji et al., 1998). Durch Glykosylierung wird die extrazelluläre Domäne von CD44 zelltypspezifisch modifiziert (Goodfellow et al., 1982; Greenfield et al., 1999). Die Transmembrandomäne sowie der zytoplasmatische Anteil umfassen 23 bzw. 70 Aminosäuren, welche durch O-Glykosylierungen und Methylierungen an der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den CD44-Molekülen und an der Organisation und Signalweiterleitung im Bereich des Zytoskeletts beteiligt sind. Die zytoplasmatische Region setzt sich aus sechs verschiedenen Serin-Molekülen zusammen, welche teils *in vivo*, teils *in vitro*, durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden können (Lesley et al., 1993; Sheikh et al., 1998; Legg et al., 2002). Alle CD44 Proteine werden durch ein Gen kodiert, welches sich beim Menschen auf dem Chromosom 11p13 befindet (Goodfellow et al., 1982). Die insgesamt 20 Exons bestehen aus Standardexons und variablen Exons. Die Exons 1-5 und 16-20 sind Standardexons, welche, wenn zusammen gefügt, die kleinste und ubiquitär verbreitete Standardisoform (CD44s) kodieren (siehe Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Exonstruktur von CD44 und dessen Transkripten/Spleißvarianten CD44s, CD44v3 und CD44v6:** Die variable extrazelluläre Region entspricht Exon 6 - 15, hier v1 - v10, LP = Leader-Peptid auf Exon 1 befindlich, TM = Transmembrandomäne auf Exon 18, Variante CD44s enthält keine variablen Exons, Spleißvarianten CD44v3 und v6 enthalten je ein unterschiedliches Exon an verschiedenen Lokalisationen. Die Introns werden mittels einer durchgezogenen Linie dargestellt.

Das Transkript CD44s stellt in der Familie der CD44-Moleküle die hämatopoetische und ursprüngliche Form dar (Hofmann et al., 1991). Zwischen den Standardexons 5 und 16 können durch alternatives Spleißen bis zu zehn variable Exons (Exons 6-15, V1-V10) eingebaut werden (Jackson et al., 1992; Sreaton et al., 1993; Tolg et al., 1993). Dabei kommen v3 und v6 auf Keratinozyten vor und sind an der Zellbewegung beteiligt. So

wurde CD44v6 auch als Ursache für die Entwicklung von Metastasen, verbunden mit einer schlechteren Prognose in verschiedenen Tumoren (insbesondere bei Ovarialkarzinomen), identifiziert (Matzke und Puchta, 2005; Shiozaki et al., 2011). Die Untereinheit Ser<sup>291</sup> reguliert die zytoplasmatische Bindung von Ezrin des ERM-Komplexes an das CD44-Molekül (siehe Abb. 2.). Es konnte gezeigt werden, dass CD44s sowie unterschiedliche Varianten des CD44-Moleküls vermehrt auf metastasierenden Tumorzellen exprimiert werden (Dalchau et al., 1980; Fraser et al., 1983). Diese erhöhte Expression korreliert mit einer Stimulation durch vermehrt intrazellulär phosphorylierte G-Proteine, im Falle der Ovarialkarzinome speziell Rho-Kinasen sowie Hyaluronsäure, welche eine Aktivierung des Aktin-Zytoskeletts bedingen und somit zu einer vermehrten Migrationsaktivität und damit verbundenen Metastasierung führen.

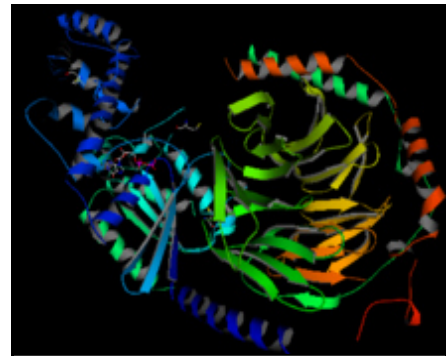


**Abb. 2: Schematische Darstellung des CD44-Moleküls und dessen Interaktion mit dem ERM-Komplex:** Extrazelluläre Konnektion mit HA, submembranäre Serin-Komponente zur Verankerung, intrazelluläre Bindung des ERM-Komplexes mit dem Aktin-Zytoskelett zur Migration, links der Tyrosinkinase-Rezeptor mit extrazell. Bindung über Disulfidbrücken und intrazell. Ras-Aktivierung zur Proliferation.

### 1.5 G-Proteine, Heterotrimerer G-Proteine und kleine GTP-asen

G-Proteine (synonym: Guaninnucleotid-bindende Proteine oder GTP-bindende Proteine) sind kleinste Aminosäureeinheiten und spielen eine Schlüsselrolle hinsichtlich Zellmotilität, Zellproliferation, Zellmigration, Apoptose, Signaltransduktion und Zell-Zell-Interaktion. Sie kommen in allen Säugetieren, Amphibien sowie Hefen vor. Dabei kann zwischen membranständigen, heterotrimeren und zytoplasmatischen G-Proteinen differenziert werden. Durch ihre Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett und die Mikrotubuli regulieren sie eine Vielzahl an physiologischen Prozessen (Aspenström et al., 2004). Heterotrimerer G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit (siehe Abb. 3.) (Vetter und Wittinghofer, 2001). Derzeit sind 20 unterschiedliche  $\alpha$ - G-Proteinuntereinheiten sowie

mehrere  $\beta$ - und  $\gamma$ - Untereinheiten bekannt. Sie stellen eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion von physiologischen Vorgängen (Sehen, Riechen, Blutdruckregulation, etc.) dar (Hamm, 1998). Zudem sind sie aufgrund gestörter Signalwege an pathophysiologischen Effekten (Arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, etc.) beteiligt. Die  $\alpha$ -Untereinheit mit ihrer GDP/GTP-Bindungsdomäne spielt hierbei die regulative Rolle. Sie liegt in inaktiver Form mit der  $\beta\gamma$ -



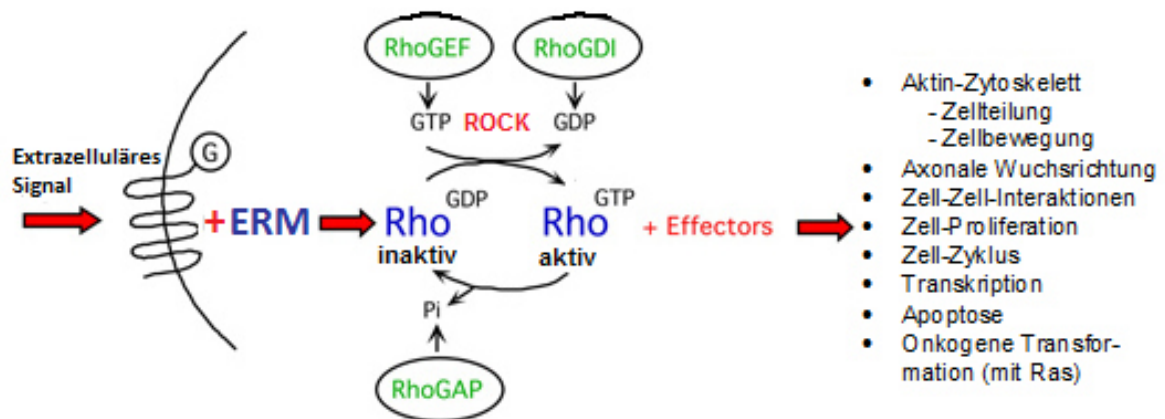
**Abb. 3:** Dreidimensionale Struktur eines heterotrimeren G-Proteins

Untereinheit gekoppelt vor und ist an GDP gebunden. Bei Kontakt mit einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der entweder selbst ein GTP-Austauschfaktor ist oder einen solchen bindet, wird sie aktiviert. Nach Austausch von GDP durch GTP kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass GTP-gebundenes Rho an seine nachgeschalteten Effektoren binden kann. GEFs sind hierbei Aktivatoren dieser nachgeschalteten Signalwege, da sie den Austausch von GDP gegen GTP katalysieren. GTPase activating proteins dagegen stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität, sodass eine Hydrolyse des GTP zu GDP und somit ihre Inaktivierung erfolgt (Schmandke et al., 2007). Bei der Umwandlung von GDP in GTP dissoziiert die  $\alpha$ -Untereinheit von den  $\beta\gamma$ - Untereinheiten. Die beiden freigesetzten G-Proteinuntereinheiten  $\alpha$  und  $\beta\gamma$  können nun als Signalmoleküle mit unterschiedlichen Effektoren kommunizieren. Bindungspartner sind z. Bsp. Adenylylcyclase, Rho-Kinase, Proteinkinase N, Citronkinase, G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen und Phospholipasen (Jeong et al., 2013). Derzeit sind mehr als 100 verschiedene G-Proteine bekannt, welche in fünf kleine, phylogenetisch ähnliche Familien eingeteilt werden: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf und Ran. Sie sind an der Regulation des Zellzyklus (Ras und Rho), des Zytoskeletts (Rho), des Vesikeltransports (Rab und Sar1/Arf) oder des Transmitter-Transports zwischen Zytoplasma und Zellkern (Ran) beteiligt. Dabei unterscheidet man eine aktive, zellmembranständige, GTP-gebundene Form der kleinen GTPasen und eine inaktive, zytoplasmatische GDP-gebundene Form (Wang et al., 2013).

### 1.6 Rho-GTPase: Struktur und Funktion

Die Aktivierung der Rho-GTPase erfolgt über eine GTP-Bindung, während aus einer intrinsischen GTPase vermittelten Hydrolyse des GTP's zu GDP eine Inaktivierung der Rho-Kinase resultiert. An diesem Prozess sind auch Guaninnukleotidaustauschfaktoren und GTPase aktivierende Proteine beteiligt. Daneben spielen organische Moleküle wie das Y27632 bei der ROCK-Inhibition eine wesentliche Rolle. Die Rho-GTPasen gehören zur Familie der kleinen GTPasen und besitzen eine molekulare Masse von 20-45 kDa.

Klassifiziert werden fünf Unterfamilien mit den verschiedenen Proteinen: Rho, Rac, Cdc42, Rnd und RhoBTB (Raftopoulou und Hall, 2004). Weiterhin gibt es einzelne Rho-GTPasen, die derzeit keiner Unterfamilie zugeordnet werden können. Rho-GTPasen zeigen sich als wichtige Zellregulatoren und Marker, auch im Bereich von Ovarialkarzinomen (Zhao et al., 2010; Lu et al., 2013). Derzeit sind mehr als 20 Gene identifiziert, welche Proteine dieser Familie kodieren. Rho-GTPasen sind eine Schnittstelle bei der Signaltransduktion und interagieren mit Rezeptoren und deren Effektoren. Diese Proteinfamilie spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Enzymen wie ROCK, welches seinerseits weitere Proteine in der Migrationssignalkaskade phosphoryliert und aktiviert (siehe Abb. 4).



**Abb. 4:** Wirkungsweise der Rho-GTPasen, Signalweg von extrazellulär bis zur genetischen Modifikation

Drei gut untersuchte Unterfamilien sind Rho, Cdc42 und Rac. Rho spielt eine Rolle bei der Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten und der Formierung von Stressfasern. Dies sind Stellen, an denen Stressfasern mittels Integrinen an die extrazelluläre Matrix gekoppelt werden. Rho ist für Konformation und Kontraktion dieser sogenannten „stress fibers“ verantwortlich, welche zytoplasmatisch, teils fokal konzentriert, in der gesamten Zelle zu finden sind. Sie dienen außerdem im Rahmen der Mitose zur Abschnürung der Zellen. Cdc42 reguliert die Ausbildung von Zellfortsätzen, sog. Filopodien. Sie sind Bündel aus Aktinfilamenten, die durch Aktin-bindende Proteine vernetzt werden. Bei Rac handelt es sich um eine Rho-GTPase, die das Ausbilden von Lamellopodien, flachen Ausstülpungen der Zellmembran, begünstigt. Lamellopodien finden sich am Leitsaum der Membran und bestehen aus netzwerkartig polymerisiertem Aktin. Sie sind in der Lage, neue adhäsive Kontakte auszubilden und treiben die Zelle bei der Zellmigration voran (Takai et al., 2001; Burrige und Wenneberg, 2004; Jaffe und Hall, 2005). Allerdings wirkt dies, aufgrund der vielen regulatorischen Querverbindungen zwischen den Rho-Signalwegen, das Problem der differenzierten Zuordnung zwischen der einzelnen Kinase und der damit verbundenen Aktivierung bzw. dem erzeugten Effekt auf. So kann z.B.

LIMK (LIM Kinase I und II), ein nachgeschalteter Effektor von ROCK, auch durch die Serin/Threoninkinase PAK nach deren Aktivierung durch die GTPase Rac aktiviert werden. Hierdurch können die Phosphorylierung von LIMK und die nachfolgende Inaktivierung von Cofilin sowohl nach Aktivierung von Rho als auch von Rac erfolgen, sodass die Zuordnung einzelner Effekte nicht immer auf eine einzelne Kinase zurückführbar sein kann (Ridley, 2006).

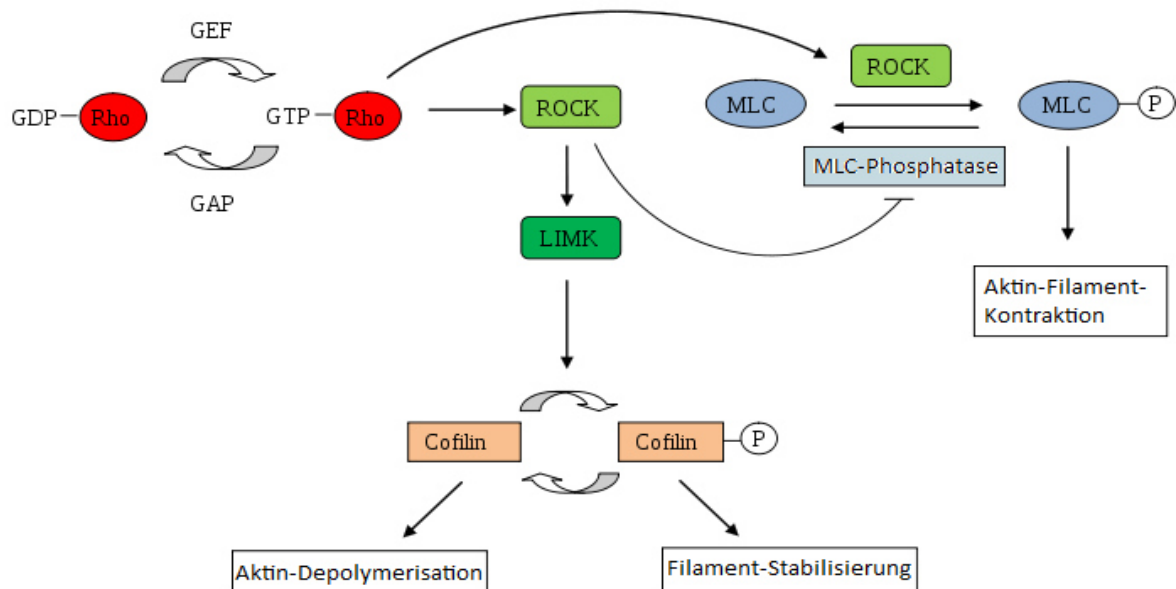
### **1.7 Rho-Kinase: Struktur und Funktion**

Die seit den 1990er Jahren bekannte Rho-Kinase ist ein Enzym, das aus 1354 Aminosäuren besteht, durch GTP-gebundenes Rho aktiviert wird und verschiedene Zielproteine phosphoryliert. Strukturell ist ROCK eine Serin/Threonin-Kinase, wobei sich zwei Isoformen abgrenzen lassen. Diese weisen eine hohe sequentielle Ähnlichkeit in ihrer allgemeinen Aminosäurestruktur und in ihrer Kinasedomäne auf (Riento et al., 2003). Jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Verteilung und daher auch in ihren Funktionen *in vivo* (Yoneda et al., 2005). Wird ROCK-I vorwiegend in nicht neuronalen Geweben wie Herz, Lunge oder Skelettmuskel gebildet (Leung et al., 1996), so zeigt sich ROCK-II hauptsächlich im Gehirn wie z.B. im Hippocampus und im Kleinhirn (Hashimoto et al., 1999). So soll ROCK-I eher für die Ausbildung von Stressfasern verantwortlich sein, während ROCK-II eine wichtige Rolle bei der Regulation von Mikrofilamenten spielt (Yoneda et al., 2005). Beim Menschen findet es sich vorwiegend in den Thrombozyten, weiterhin im Zellzytoplasma, in der Membran des Golgi-Apparates und während der S-Phase in den Zentriolen (Zhao et al., 2010). Innerhalb der Zelle weisen aber beide Isoformen ein zumeist zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf, welches nach Bindung von aktiviertem RhoA ebenfalls verstärkt membranär nachweisbar ist. Diese Lokalisationsänderung bedingt eine vermehrte Interaktion mit dem transmembranären CD44-Molekül und eine Aktivierung des Aktin-Zytoskeletts. Durch Interaktion mit kleinen G-Proteinen aus der Familie der Rho-GTPasen und weiteren Enzymen, z.B. LIMK, hat die Rho-Kinase Einfluss auf das Zytoskelett, der damit verbundenen Zellmigration und besitzt eine wesentliche Funktion bei der Signaltransduktion. Sie spielt eine Rolle bei Kontraktionen glatter Muskelzellen, Zelladhäsionsprozessen, der Zytokinese und der Zellvermehrung (Aktories und Barbieri, 2005; Koyanagi et al., 2008; Zhao et al., 2010).

Darüber hinaus kann die Aktivität von ROCK auch durch verschiedene Mechanismen inhibiert werden. Dies sind einerseits Vorgänge, die durch Bindung an die N-terminale Kinase-Region deren eigene Aktivität hemmen kann. Andererseits zeigen sich Zellmechanismen welche eine Zellfunktionsinhibition durch andere kleine GTP-bindende Proteine wie Gem oder Rad hervorruft (Mor et al., 2005; Schmandke et al., 2007). Zur Organisation des Aktin-Myosin-Zytoskeletts sowie zur Zellmigration erfolgt die Phospho-



rylierung/Aktivierung der Rho-Bindungssequenz am C-terminalen Abschnitt des ERM-Komplexes, der sogenannten „coiled-coil“-Domäne. Bei Interaktion mit dem RhoA-Protein erfolgt die Aktivierung der beiden ROCK-Isoformen. Hierbei wird das GTP-gebundene RhoA an die entsprechende Rho-Bindungsstelle in der „coiled-coil“-Domäne verbracht und der inaktive Zustand kurzfristig reversibel gelöst. Somit wird eine Reaktion bzw. Phosphorylierung mit beispielsweise MLC oder LIM-Kinase angestoßen (siehe Abb. 5).



**Abb. 5: Funktionsmechanismus der ROCK's:** GAP führt zur Abspaltung eines Phosphatrestes von Rho-GTP, Ausbildung von Rho-GDP und Aktivierung der Rho-Kinase. GEF führt im Gegensatz dazu zur erneuten Phosphorylierung des inaktiven Rho-GDP-Komplexes. Die phosphorylierte ROCK kann zur Aktivierung des MLC-Komplexes oder der LIM-Kinase mit anschließender Phosphorylierung von Cofilin genutzt werden. Dadurch erfolgt die direkte Stimulation des Zytoskeletts.

Eine irreversible Hemmung von ROCK erfolgt durch Verlust des C-terminalen Endes und der damit verbundenen Phosphorylierungseinheit. Dies wurde speziell bei der Interaktion mit Caspase 3 und der dadurch folgenden Apoptose beobachtet (Spencer et al., 2011). Der Rho-Kinase-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei onkogenen Prozessen, vor allem durch seine Regulierung von F-Aktin. Eine Hemmung dieses Signalweges führt zur Reduktion des Tumolvolumens und der Metastasierung in einer Reihe von Tumorarten (Melanome, Nierenzellkarzinome, etc.) (Spencer et al., 2011).

Hauptsächliche Zielproteine von ROCK sind die leichten Myosinketten und die MLC-Phosphatase, durch welche sie die Anordnung des Zytoskeletts beeinflussen können und eine gesteigerte Aktin-Myosin-Kontraktibilität in nicht muskulären Zellen herbeiführen. Darüber hinaus kann ROCK auch indirekt die Menge der phosphorylierten MLC durch die Hemmung der MLC-Phosphatase erhöhen und so die Formation von Stressfasern und

fokalen Adhäsionskontakten steigern. Zudem können Kontraktionsvorgänge der zytoplasmatisch gelegenen Aktinfilamente ermöglicht werden, bei denen die LIMK und MLC als weitere Mediatoren bei der Phosphorylierung von Proteinen bis hin zur Aktivierung von Cofilin und der Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts fungieren. Die folglich gerichtete Kontraktion der Zelle führt zu einer Migration, welche aufgrund weiterer Signalmoleküle in eine gerichtete Fortbewegung spezifiziert werden kann (Hiraoka et al., 1996; Smolich et al., 1997). Dabei stellen die LIM-Kinasen wichtige Zielproteine der Rho-Kinasen dar, welche auch bei der Aktin-Myosin-Regulation mitwirken. Durch die Phosphorylierung der LIMKs wird der durch Cofilin vermittelte Abbau der Aktinfilamente gehemmt, wodurch die Anzahl der bestehenden Aktinfilamente ansteigt. Ferner existieren weitere nachgeschaltete Effektoren der ROCK, hier bereits dargestellt der ERM-Komplex, welcher auch an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt ist (Riento et al., 2003; Schmandke et al., 2007).

### **1.8 Reaktionskaskade und Wechselwirkung zwischen CD44, ERM-Komplex und Rho-Kinase**

Die für die Migration verantwortliche Signaltransduktion zur Aktin-Myosin-Aktivierung erfolgt über das transmembranale CD44 sowie das intrazellulär in inaktiver, „gecoilter“ Form vorliegender ERM-Moleküls. Vor Stimulation des ERM-Komplexes erfolgt mittels Phosphorylierung der Rho-Kinase die Aktivierung einer intrazellulären Rho-GDPase. Dabei kommt es durch Anlagerung der ROCK an die Rho-GDPase zur Abspaltung des Phosphatrestes von der Rho-Kinase. Simultan wird die Rho-GDPase zur Rho-GTPase umgewandelt (Heider et al., 1993; Mulder et al., 1994; Tanabe et al., 1995). Dieses nun energetisch höherwertige Enzym führt zur Aktivierung des ERM-Komplexes. Dazu erfolgt die Anlagerung der Rho-GTPase an das C-terminale Ende des Ezrin-Moleküls des ERM-Komplexes und bewirkt durch Übertragung des Phosphatrestes eine Streckung des Moleküls (Tsukita et al., 1994; Hirao et al., 1996). Nach erfolgter Konformationsänderung lagert sich nun das phosphorylierte und somit aktivierte Protein an das transmembranäre CD44-Molekül an. Durch feste Bindung an Selbiges und Konnektion zum nahegelegenen Zytoskelett gelingt die Aktivierung des Aktin-Moleküls und somit eine Erhöhung der Kontraktilität der Zytoskelettfasern. Unter Zugabe eines ROCK-Inhibitors (Y27632) kommt es dagegen zur Blockierung einer möglichen Phosphorylierung der Rho-GDPase und fehlender Aktivierung des Ezrin-Moleküls. Daraus ergibt sich ein Verbleib des ERM-Komplexes in der ungestreckten, inaktiven Form und keine Konformationsänderung in die gestreckte, aktivierte Molekülausrichtung. Dadurch ist eine Interaktion zwischen CD44 und ERM-Komplex nicht gegeben und eine Phosphorylierung, sprich Aktivierung des Aktin-Zytoskeletts, ist nicht möglich. Im Rahmen einer vermehrten Hemmung der

Phosphorylierung der intrazellulär vorhandenen Rho-Kinasen kann somit eine Blockierung der Rho-GDPasen und des darauf folgenden ERM-Komplexes erfolgen, was mit einem Verlust der Migrationsfähigkeit einhergeht (siehe Abb. 6).

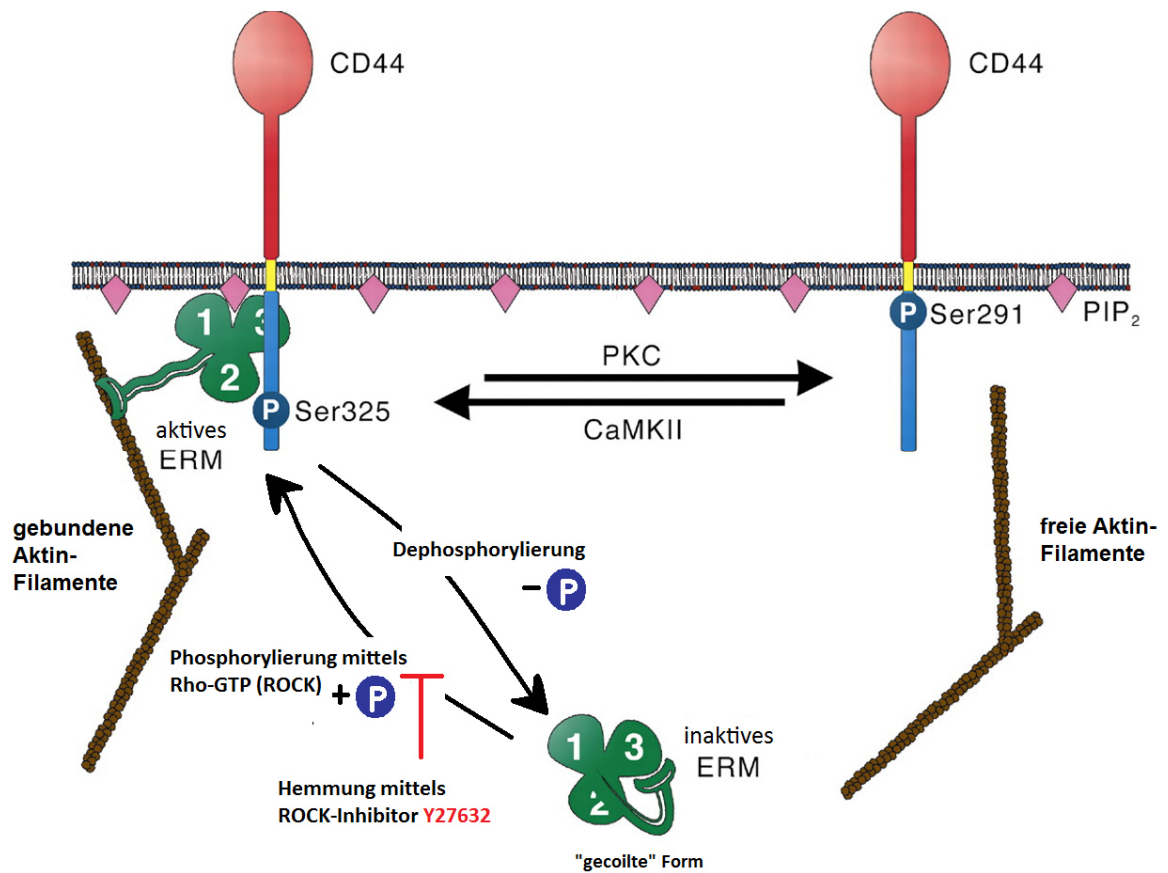


Abb. 6: CD44 und ERM-Komplex in phosphorylierter und dephosphorylierter Form durch ROCK sowie Hemmung der Phosphorylierung von ROCK durch Y27632

### 1.9 Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632

Y27632 [(R)-(+)-*trans*-N-(4-Pyridyl)-4-(1-aminoethyl) cyclohexanecarboxamide, 2HCl] (siehe Abb. 7) ist ein spezifischer Hemmstoff der Rho-

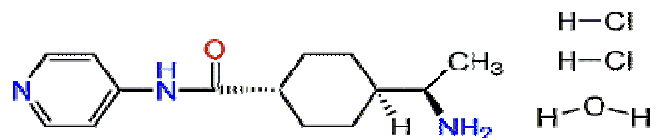


Abb. 7: Strukturformel des ROCK-Inhibitors Y27632

Kinase und bei einer Zielkonzentration von 140nM am effektivsten (Fu et al., 1998). Y27632 ist ein hoch wirksamer, membranpermeabler und selektiver Inhibitor der Rho-assoziierten Protein-Kinase I und zeigt eine reversible Bindungsaffinität im Bereich der Phosphorylierungsstelle (Fu et al., 1998). Y27632 wurde in einigen Organen (Magen, Mamma, Haut) schon weitgehend erforscht. Durch Inhibition mittels Y27632 erfolgt eine Reduktion der ROCK-Aktivität und somit der Tumorentstehung und -progression. Hier zeigt sich zusätzlich, dass Y27632 nicht nur primär an der Regulierung der Tumorentstehung durch Modulation des Phospho-Proteoms beteiligt ist, sondern auch an dem Signalweg

der Rho-Kinase und somit sekundär an einer Veränderung des Tumortranskriptoms (Spencer et al., 2011). So wurde bei Einbringen von Y27632 in Lebergewebe eine Akkumulation in den hepatischen Sternzellen und die Reduktion einer vorzeitigen Fibrogenese der Leber festgestellt (van Beuge et al., 2011). Des Weiteren weisen mehrere Versuche bei der Y27632-getriggerten ROCK-Inhibition in Leberkarzinomzellen eine Reduktion der Metastasierung durch eine Blockade der Rho-Kinase-vermittelten Phosphorylierung von Ezrin nach (Chen et al., 2011). Bei der Hemmung der Rho-Kinase-Aktivität in Melanomen ergibt sich eine statistisch signifikante Veränderung in der Transkription von 94 Genen. Die Stärke der Hemmung ist vergleichbar mit der ATP-Affinität bei Phosphorylierung. Außerdem hemmt es die Proteinkinase C-verwandten Proteinkinasen und führt so ebenfalls zu einer Verminderung der Zellmembranaktivität (Uehata et al., 1997). Y27632 inaktiviert wie andere ROCK-Inhibitoren Rho-A durch Verhinderung der Phosphorylierung des Proteins. In der vorliegenden Arbeit soll nun der Reaktionsweg zwischen den Rho-GTPasen, dem ERM-Komplex, deren Stimulation mittels ROCK und dessen Inhibition mittels Y27632 als Rho-Kinase-Inhibitor in Ovarialkarzinomzellen genauer untersucht werden (siehe Abb. 8).

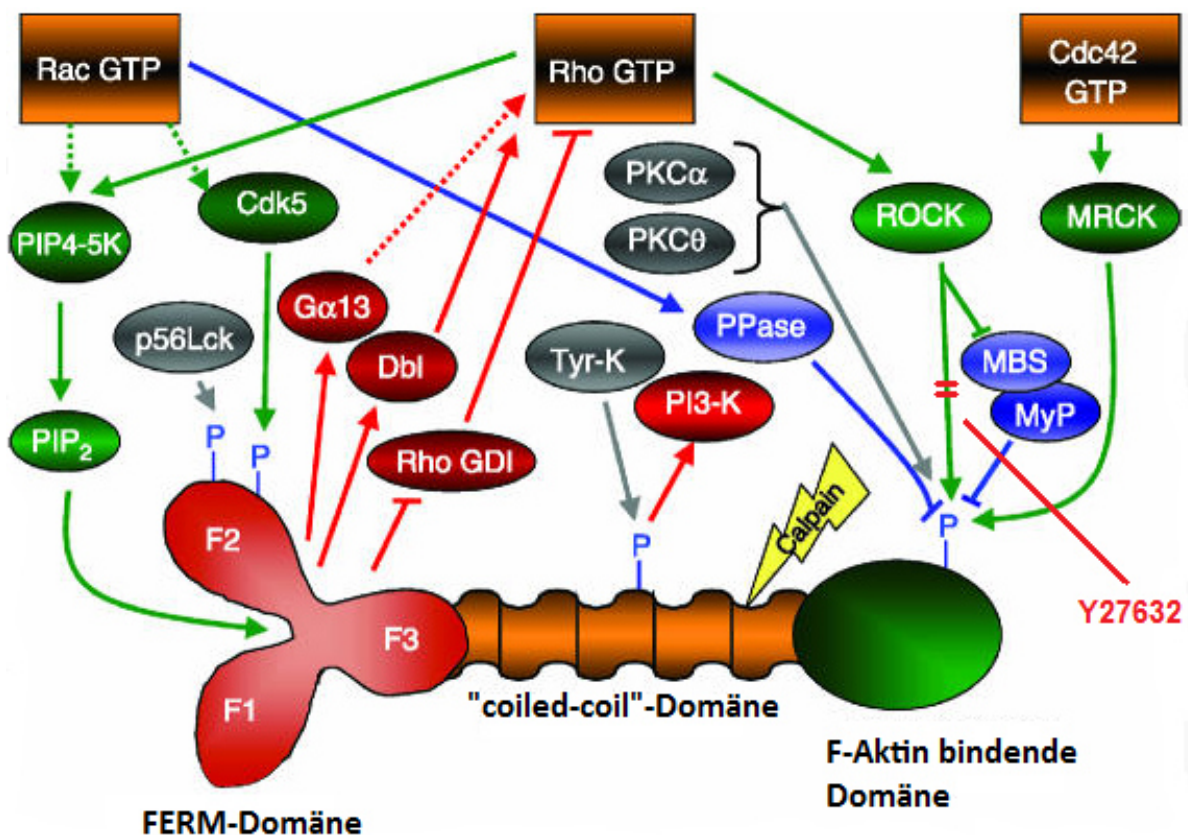


Abb. 8: Interaktion der Rho-GTPase, ROCK, des ERM-Komplexes und deren spezifische Inhibition mittels Y27632

## **2 Ziele der Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen folgende Fragen und Themenkomplexe beantwortet werden:

- 1.) Welche CD44/Ezrin-Expression und welches Migrationsverhalten finden sich zur Charakterisierung der fünf Ovarialkarzinomzelllinien?
- 2.) Welchen Einfluss besitzt Hyaluronsäure auf die Migrationseigenschaften der Tumorzellen?
- 3.) Welchen Effekt der ROCK-Hemmung zeigt Y27632 auf die Tumorzellmigration, die CD44-Verteilung und die ERM-Lokalisation? Führt die ROCK-Inhibition zu einer Lokalisationsänderung im Sinne einer Aktivierung respektive Inaktivierung des CD44- bzw. ERM-Moleküls?
- 4.) Welche Auswirkungen zeigen die Kombination von ROCK-Inhibitor Y27632 und Hyaluronsäure hinsichtlich der Migration von Ovarialkarzinomzelllinien?
- 5.) Zeigen sich nach Zugabe von Y27632 am Tumorverband aktivierende oder inhibierende Effekte bezüglich des Migrationsverhaltens?

## **3 Material und Methodik**

### **3.1 Methoden/Zellkultur**

#### **3.1.1 Herkunft der Zelllinien**

Im Rahmen dieser Dissertation werden fünf verschiedene Zelllinien auf ihre Migrations-eigenschaften in Beziehung zur ROCK und deren Inhibitor Y27632 untersucht (siehe Tab. 2). Zum Einen ist dies die direkt kultivierte Klarzellkarzinomzelllinie ES2. Neben einer hohen Teilungsrates zeigt sie zum Beispiel unter Stimulation des PI3-Kinase-Weges eine Überexpression der Aktin-Komponente mit konsekutiv erhöhter Tumorzellaktivität (Wang et al., 2006). Zum Anderen handelt es sich um die Adenokarzinomzelllinien SKOV3, OVCAR3, CAO3 und OAW42. Die Zelllinie OVCAR3 stammt aus dem malignen Aszites eines peritoneal disseminierten Ovarialkarzinoms und wurde 1982 von Hamilton et al. etabliert. Sie stellt eine mäßig aggressive Ovarialkarzinomzelllinie mit pflastersteinartigem Monolayerwachstumsmuster dar. Zudem besitzt OVCAR3 eine erhöhte Selbsterneuerung, Differenzierung und Tumor-initiiierende Kapazität. Eine gesteigerte Proliferationsrate (ca. 20mal höher als SKOV3) ist ebenso wie eine fehlende Hemmung gegenüber TGF- $\beta$ -1 für diese Ovarialkarzinomzelllinie spezifisch. Das Integrinspektrum zeichnet sich durch Vielgestaltigkeit aus: alpha2, 3, 5, 6, v, beta1, beta3. Zudem fehlt neben CXCR4 auch Caveolin-1, welches für die Regulation des Zellstoffwechsels, im Apoptosevorgang sowie einer Hemmung des EGF-Rezeptors zuständig ist. Sie zeigt eine erhöhte Interleukin-6-Produktion (fünffach mehr als SKOV3), lässt sich aber simultan nur gering durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimulieren. Untersuchungen zeigten, dass bei dieser Zelllinie das Vorkommen von zytoplasmatischen, aktivierten Androgen- und Östrogen-bindenden Makromolekülen eine Bedeutung im ovariellen Tumormodell in Beziehung zur zytotoxischen Medikamenten- und Chemotherapeutikaresistenz besitzt. Zudem ist OVCAR3 resistent gegen Adriamycin, Melphalan und Cisplatin (Hamilton et al., 2005). SKOV3 dagegen ist eine hoch aggressive ovarielle Tumorzelllinie, primär gewonnen aus dem Aszites einer Patientin mit Stadium FIGO IV (Wilson, 1984). Hierbei zeigt SKOV3 aufgrund des hohen tumorigenen Potentials eine stärkere Invasion durch verschiedenste Medien (beispielsweise Matrigel) sowie eine vermehrte vaskuläre Affinität und Penetration. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimulieren die Proliferation der Ovarialkarzinomzelllinie, wohingegen Follistatin die Proliferation nur gering hemmt. SKOV3 produziert neben IL-6 auch Aktivin und Caveolin-1. Sie besitzt selbst Aktivinrezeptoren sowie schwach ausgebildetes  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin. E-Cadherin und CXCR4 fehlen gänzlich. Das Integrinspektrum besteht aus alpha2-6, v, beta1, 3 und 5. In verschiedenen experimentellen Untersuchungen wurde eine Inhibition der Aggressivität von SKOV3 bei Inhibitoren von Stat3, IGF-IR und Rho-GTPase festgestellt (Gest et al., 2011). Zudem wurde bei SKOV3

eine Resistenz gegenüber Cisplatin und Taxol nachgewiesen. SKOV3 zeichnet sich durch eine schnelle und vor allem intakte Sphäroidbildung aus.

Die Zelllinien CAOV3 und OAW42 stellen Primärtumorverbände *in situ* dar (Tsao et al., 1995). Hierbei besitzt OAW42 kein BARX2. Bei CAOV3 handelt es sich um eine migrationsschwache, weniger aggressive Tumorzelllinie, welche bei Apoptose ein braun-gelbes Granulat im Zellkern aufweist. Im Hinblick auf die Zellmorphologie, ist das Fehlen der Mikrovilli auf der Oberfläche und das zytoplasmatische Vorkommen von Apoptosekörperchen zu beobachten. In der Ovarialkarzinomzelllinie ist eine hohe CXCR4-Expression nachzuweisen. Bei CAOV3 wird zudem das COX-2-Protein stark exprimiert. Somit ist bei selektiver Hemmung der COX-2-Rezeptoren ein Einsatz wirksamer Chemotherapeutika zur Reduktion der Tumorlast möglich (Wang et al., 2006). Des Weiteren zeigte sich in den vorgestellten ovariellen Karzinomzelllinien eine erhöhte Expression von RhoC, ROCK-I, VEGF und MMP9-Proteinen. Eine Inhibition der RhoC-, ROCK-I-, VEGF- und MMP9-Expression ist Ausdruck einer verminderten Fähigkeit zur Invasion und Migration (Zhao et al., 2010). Die HOSE-Zelllinie ist eine nicht tumorigene, immortale Linie und fungiert als ein Modell des physiologischen ovariellen Oberflächenepithels (Zeuthen et al., 1980).

**Tab. 2:** Herkunft der Ovarialtumor-Zelllinien, unterschieden in Primärtumor und Aszites-Punktat

Name	Herkunft	ATCC-Nummer	Referenzen
SKOV3	Adenokarzinom, Aszites	HTB-77	[Fogh et al., 1977]
OVCAR3	Adenokarzinom, gering differenziert, Aszites	HTB-161	[Hamilton et al., 1983]
ES2	Klarzelliges Ovarialkarzinom	CRL-1978	[Lau et al., 1991]
OAW42	Cystadenokarzinom	n. bek.	[Wilson, 1984]
CAOV3	Adenokarzinom	HTB-75	[Karlán et al., 1994]
HOSE	Ovarialepithel, HPV- immortalisiert	n. bek.	[Tsao et al., 1995]

### 3.1.2 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Das Autoklavieren hitzeunempfindlicher Chemikalien, Lösungen und weiterer Gebrauchsgüter erfolgt für 30 Minuten bei 120°C und 10<sup>5</sup> Pascal. Thermolabile Lösungen werden über einen Sterilfilter mit 0,22µm Porengröße gereinigt, sodass Verschmutzungen als Dekantat zurückbleiben.

### **3.1.3 Medien und Kultivierung**

Die Befüllung der Zellkulturflaschen erfolgt mit 5ml Zellkultur inkl. DMEM+FKS und anschließender Inkubation im Brutschrank bei 37°C und einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Begasung bei 18% O<sub>2</sub>-Luftgehalt. Vor Versuchsbeginn werden nach erneuter Passagierung je zwei Zellkulturproben für mindestens 48h bebrütet und mikroskopisch kontrolliert, um eine bakterielle respektive fungizide Kontamination auszuschließen. Basismedium für das Arbeiten in der Zellkultur ist DMEM mit einem Zusatz von 10% FKS. Als Wasch- und Stimulationsmedium kommt bei den Versuchen ausschließlich FKS-freies Kulturmedium zum Einsatz, um Nebenwirkungen des FKS zu vermeiden. Für die Spülvorgänge wird sterile PBS und zum Ablösen der am Flaschenboden adhärenen Zellen eine 0,25%-ige Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Beim Ansetzen der Versuche wird Accutase-Lösung zur Mobilisation der Zellverbände aus den Kulturflaschen benutzt. Dies führt zu einer schonenderen Ablösung bei anschließender schnellerer Revitalisierung der Zellen.

### **3.1.4 Zellpassagierung/Zellernte**

Die Anzucht der Zelllinien erfolgt in DMEM-Medium und 15% FKS bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in 25ml Zellkulturflaschen. Zum Passagieren wird der Zeitpunkt der 80%-igen Konfluenz gewählt. Dafür wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gespült. Nach Inkubation mit 2ml 0,25% Trypsin für fünf Minuten bei 37°C stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 4ml DMEM, überführt die Zellsuspension in ein 10ml Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert die Zellen für fünf Minuten bei 1200U/min. Das so entstandene Zellpellet wird in 1ml Zellkulturmedium resuspendiert und je 0,2ml in eine neue Zellkulturflasche überführt. Zur Kryokonservierung werden die nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets in 1,8ml Gefriermedium aufgenommen (DMEM mit 20% DMSO), in 2ml Einfrierröhrchen verbracht und langsam eingefroren. Die Lagerung erfolgt für 24h bei -20°C und weitere 24h bei -80°C oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff. Bei erneutem Gebrauch der kryokonservierten Zellen wird der Inhalt der Eppendorf-Tubes rasch bei 37°C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit 4ml DMEM überführt. Das nach erster Zentrifugation erhaltene Zellpellet wird erneut in 4ml DMEM aufgenommen und zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO herauszulösen. Im Anschluss kann das Zellpellet in 3ml DMEM aufgenommen, unter mehreren Pipettiervorgängen wieder resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt werden. Multizelluläre Tumorsphäroide werden in der Liquid-Overlay-Technik hergestellt. Dazu wird eine Suspension von 500.000Zellen/ml hergestellt und 1ml davon in 4ml DMEM verbracht. Anschließend werden 20µl der Lösung pro Slot in eine mit Agarose beschichteten 96-well-Platte gegeben und mit 200µl DMEM-Medium aufgefüllt. Nach 24h werden die Späroide zum Versuch verwendet.



### 3.1.5 Zellzählung

Nach dem Ernten der Zellen werden diese für fünf Minuten bei 1000U/min zentrifugiert und das Zellpellet mit 10ml Pufferlösung resuspendiert. Hiernach erfolgen eine Verdünnung mit steriler NaCl-Lösung in einem Verhältnis von 1:10 und das Überführen in eine Neubauer-Zählkammer. Dort werden lichtmikroskopisch zehn Großquadrate ausgezählt (Z), die Summe der vorhandenen Tumorzellen durch 100 geteilt. In dieser Dissertation wird eine Zielkonzentration von etwa 10.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte angestrebt, also teilt man 10.000 durch die entstandene Zahl ( $Z \cdot 10^4$ ), multipliziert das Ergebnis mit 1000 und erhält die Menge in  $\mu\text{l}$  mit welchen je ein Well zu bestücken ist.

Formel:

$$\Sigma \text{ in } \mu\text{l} = [10.000 / (Z \cdot 10^4)] \cdot 1000$$

## 3.2 Motilitätsassay/Einzelzellmigration

### 3.2.1 Vorbemerkungen/Vorbereitungen

Zur Herstellung der Migrationskammern werden handelsübliche, einseitig beschichtete Objektträger zunächst an einem Ende mit einer U-förmigen Begrenzung aus einem 50:50-Vaseline-Paraffin-Gemisch versehen. Dieses muss zügig und gleichmäßig auftragen werden, um Lufteinschlüsse zu verhindern, in welche das Kollagenmatrix-Tumorzell-Gemisch später eindringen respektive diese sogar perforieren könnte. Mittels eines Skalpells trägt man das halb erstarrte Paraffin auf die gewünschte Höhe ab und bringt ein Deckgläschen von 20x20mm Größe auf. Es folgt die Fixation durch erneute Paraffinpinselung an den Rändern, damit die Kammern auf einer Seite offen bleiben und anschließend die Lagerung bei 5°C für 24h zum Aushärten. Bei der Anfertigung der Boxen ist dabei stets auf die anschließend geplante Verwendung zu achten, da für die einzelnen Versuchsansätze unterschiedliche Kammerhöhen benötigt werden. Folgende Kammergrößen kamen zum Einsatz:

Standardisierte Höhen, Füllmengen und Verwendung:

- |                      |   |
|----------------------|---|
| FS = Fat Standard    | = Höhe eines Objektträgers (2mm, > 500 $\mu\text{l}$ , für Sphäroide)                             |
| MS = Medium Standard | = Höhe zweier Deckgläser (0,35mm, > 100 $\mu\text{l}$ , für Einzelzellmigration)                  |
| SS = Slim Standard   | = Höhe eines Deckgläschens (0,175mm, < 100 $\mu\text{l}$ , experimentell zur Qualitätssicherung ) |

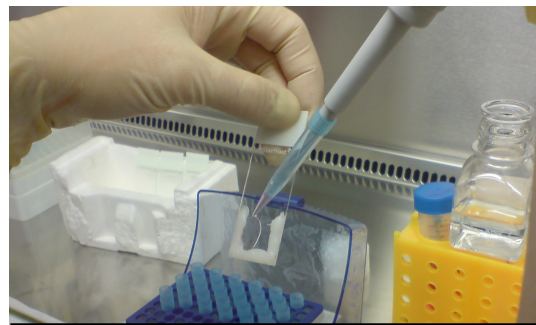
### 3.2.2 Versuchsdurchführung

Die Zellkulturen werden dreifach mit DMEM + 10%igem FKS gespült und anschließend zur Ablösung fünf Minuten mit Accutase bei 37°C inkubiert. Der Lyseprozess kann intermittierend lichtmikroskopisch beobachtet, kontrolliert und wenn nötig verlängert

respektive zeitlich verkürzt werden. Sind alle Zellen gleichmäßig abgelöst, erfolgt ein Reaktionsstopp durch Zusatz von frischem Kulturmedium (etwa 5ml/Zellkulturflasche). Der gesamte Flascheninhalt wird in ein 10ml-Röhrchen überführt und bei 1000U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Durch weiteres Verdünnen, je nach Pelletgröße, erfolgt die Herstellung einer Lösung mit einer Zielkonzentration von 500.000Zellen/ml mit dem Coulter-Zählautomaten. Für vier zeitgleiche Migrationsversuche ist folgendes Kollagenmatrixgemisch erforderlich:

**50µl MEM + 23µl Bikarbonat + 375µl Vitrogen**

133µl des Vitrogen-MEM-Bikarbonat-Gemisches werden mit 66µl Zellsuspension gleichmäßig, luftblasenfrei vermischt und in die ersten beiden vorgefertigten Migrationskammern hineinpipettiert. Im zweiten Versuchsansatz fügt man dem MEM-Bikarbonat-Gemisch vorerst 5µl Y27632 zu. Das MEM-Bikarbonat-Y27632-Gemisch wird erst dann mit 375µl Vitrogen vermengt, da bei primärer Zugabe von Vitrogen kein luftblasenfreies homogenes Vermischen des ROCK-Inhibitors möglich wäre. Davon werden nun jeweils 133µl zu den 66µl Zellsuspension in die Tubes Nummer drei bzw. vier hinzugefügt. Auch diese Lösungen pipettiert man anschließend in zwei vorgefertigte Migrationsboxen (siehe Abb. 9). Alle Teilschritte erfolgen bei 5-8°C, da eine größere Wärmezufuhr ein sofortiges Auspolymerisieren des Vitrogengemisches bewirken würde. Es folgt das Verschließen der Kammer mit

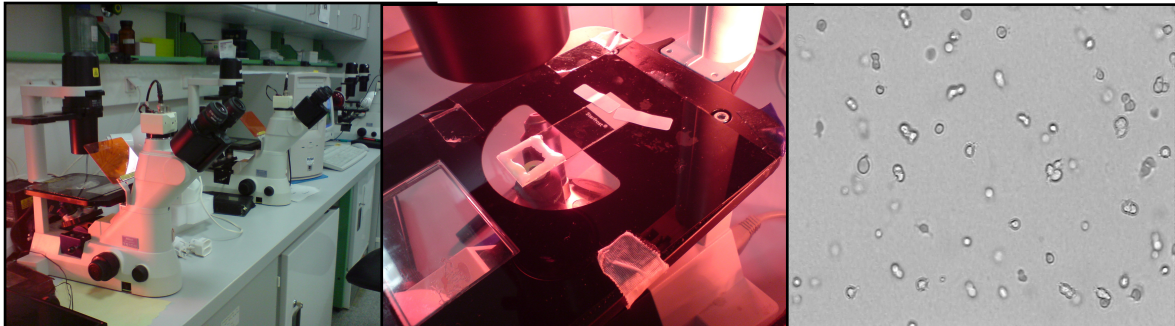


**Abb. 9: Bestücken der Migrationskammer**

Paraffin-Vaseline. Die restlichen 182µl werden in einem 1ml Reaktionstube bei Raumtemperatur belassen, um die vollständige Auspolymerisation beobachten zu können. Nach 15 Minuten ist der Polymerisationsprozess abgeschlossen. Zeigen sich hierbei schon Ausflockungen, Lufteinschlüsse oder Polymerisationsstörungen wird das Material verworfen. Ergeben sich beim Auspolymerisieren keine Probleme, werden die Migrationskammern auf den Beobachtungsmikroskopen eingespannt, mittels live Bildübertragung auf dem PC-Monitor ausgerichtet und ein Ausschnitt mit 20-30 Zellen pro Kammer mit homogener Verteilung ausgewählt. Danach werden die Kammern mittels Klebestreifen und Paraffin auf dem Objektträgertisch fixiert.

Um ein *in vivo*-ähnliches Milieu der Zellen zu erreichen, werden die Migrationskammern in Rotlichtwärmeboxen gestellt. Hierdurch wird eine Temperatur von 37°C ± 1°C über 48h konstant gehalten. Die Rotlichtwärmeboxen bestehen aus einer selbst konstruierten Plexi-

glashülle, welche vollständig mit schwarzem Isolier- und Thermoband beklebt und isoliert sind. Zusätzlich ist ein Temperaturfühler in jede Box eingelassen, um Temperaturschwankungen ab 1°C durch Ab-/Anschalten der Rotlichtlampen zu kompensieren. Alle 10min zeichnet das Grab4PCI-Programm ein Bild pro Kamera auf, sodass nach 48h vier Datensätze von je 290 Aufnahmen entstehen (siehe Abb. 10, Tab. 3a/3b).

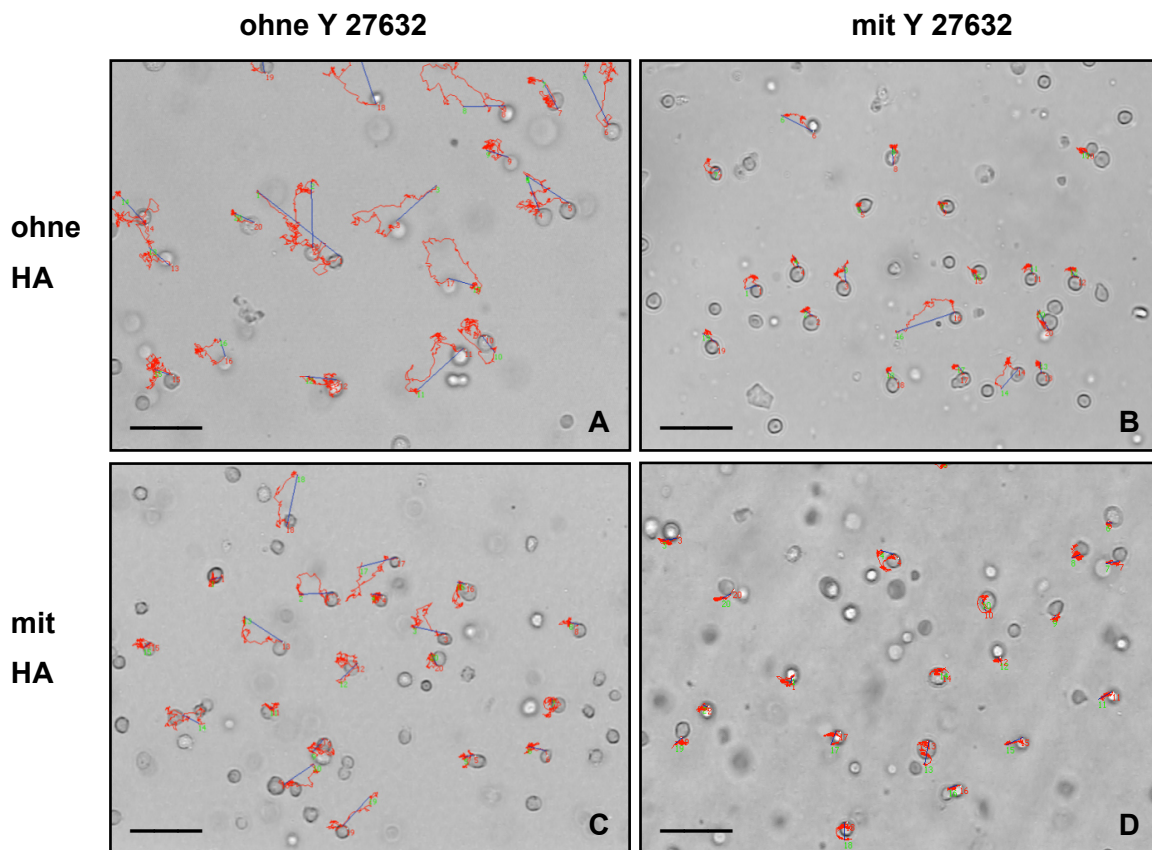


**Abb. 10: Versuchsaufbau der Migrationseinrichtung:** (von links nach rechts) Versuchseinheit Nikon Eclipse; Einspannen der Kammer unter dem Mikroskop, Mikroskopische Aufsicht bei 400-facher Vergrößerung auf die Tumorzelllinie SKOV3

**Tabelle 3a/3b:** Arbeitsschritte Motilitätsassay/Einzelzellmigration

3a	Arbeitsschritt	Zeit	3b	Arbeitsschritt	Zeit
1	Zellstimulation	2h	9	in 50% der Versuchsansätze Zugabe Y27632	5min
2	DMEM+FKS 10%	5min	10	Zellsuspension + V	5min
3	Trypsin 0,25%	5min	11	Kammerfüllung	5min
4	Lysestopp	5sec	12	Paraffinschluss	5min
5	Zentrifugieren	5min	13	Polymerisation	1min
6	Resuspension	1min	14	Einspannen	10min
7	Zellzählung	5min	15	Beobachtung	48h
8	Vitrogengem. (V)	10min			

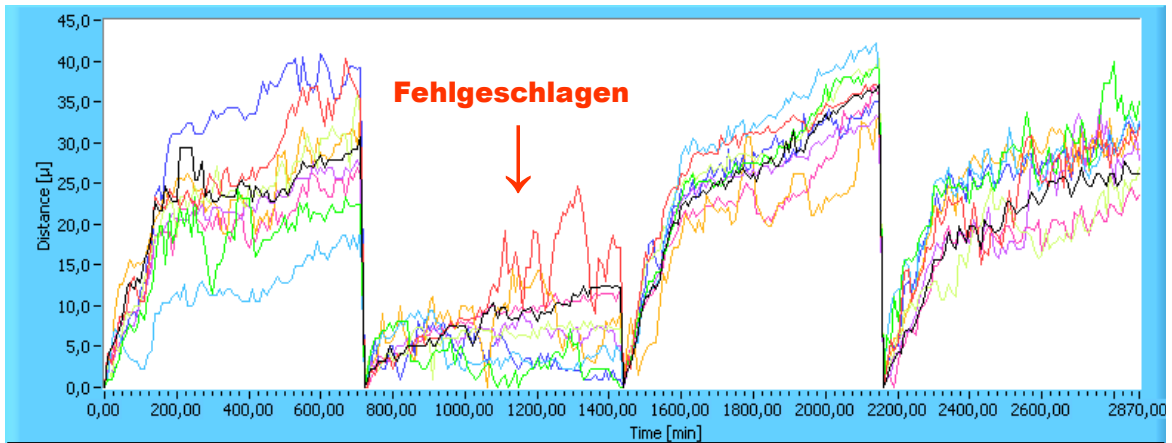
Zum Erfassen der Migrationsstrecke werden einzelne Zellen mittels des Grab4PCI-Programmes zu Beginn des Versuches markiert. Im Zeitrafferdurchlauf der 48-stündigen Aufnahmen ergibt sich die Gesamtmigrationsweite der Tumorzellen in  $\mu\text{m}$ . Zu beachten ist, dass die angegebene „Trackingstrecke“ nicht nur den Unterschied von der Startposition A zur Endposition B wiedergibt, vielmehr die reelle Zellmigration (siehe Abb. 11). Als Kontrolle werden unstimulierte Zellreihen (jeweils mit/ohne 10%igem FKS) mitgeführt.



**Abb. 11 A-D: Beispiel der getrackten Tumorzelllinie SKOV3 unter Zugabe von HA und/oder Y27632 nach 48 Stunden:** Dabei stellen die roten Linien die realen Migrationsweiten der einzelnen Tumorzelle dar. Die blauen Linien zeigen die direkte Entfernung der Tumorzelle zwischen Start- und Zielpunkt nach 48h. Im Beispiel zeigt sich hierbei eine enorme Migrationsaktivität bei der Kontrolle (ohne Y27632, ohne HA). Nach Zugabe von Y27632 (B) bzw. HA (C) erkennt man eine Verminderung der realen Wanderungsstrecke, welche sich bei gleichzeitiger Zugabe von Y27632 und HA (D) noch potenziert. Der Balken in A-D entspricht 487,5µm.

### 3.2.3 Qualitätskontrolle

Abgesehen von der rein optischen Versuchskontrolle (Verunreinigungen des Deckgläschens/des Objektträgers/der Zellkultur, Verrutschen des Präparates, Apoptose durch ungenügende Wärmezufuhr, etc.), bietet das Auswerten der sogenannten Speedhistogramme eine objektive Versuchskontrolle (siehe Abb. 12). Bei regelrechten Versuchsabläufen kommt es initial zu einer starken linear bis exponentiellen Migrationskurve, welche sich zu einem plateau-förmigen Verlauf ändert. Speedhistogramme mit deutlich anderem Verlauf innerhalb ein und derselben Versuchsreihe (gleiche Zelllinie, gleiche Stimulantienkonzentration, etc.) werden als Ausreißer aussortiert und gehen nicht in die statistische Berechnung ein.



**Abb. 12: Beispiel eines Speedhistogramms:** Gezeigt sind vier Ansätze der Zelllinie SKOV3 (mit einer gleich hohen Konzentration an Y27632). Auf der Ordinate zeigt sich das zeitlich hintereinander ausgeführte Tracking in Minuten bei simultan stattgefundenem Versuchsablauf. Die Migrationskurven des ersten, dritten und vierten Ansatzes verlaufen nahezu identisch (zu Beginn exponentiell, später kommt es zum Erreichen eines Plateaus). Die Migrationskurven des zweiten Ansatzes zeigt einen apoptotischen Kurvenverlauf; 2. wird als „Fehlgeschlagen“ eingestuft und statistisch nicht berücksichtigt.

### 3.3 Motilitätsassay/Sphäroidzellmigration

Zur Bewertung der Invasivität im Tumorzellverband wird ein Sphäroidzellmigrationsassay konzipiert. Dabei kommt die Zelllinie SKOV3 zum Einsatz, da diese das höchste Migrations- und Invasionspotential in den vorangegangenen Versuchen zeigte. Dazu werden je 120µl einer 2%igen Agaroselösung in die slots einer 96well-Platte pipettiert und im Brutschrank innerhalb von 24 Stunden zur Aushärtung gebracht. Dies dient als anti-adhäsiver Boden für die spätere Sphäroidanzüchtung. Danach wird die Zellsuspension zur Sphäroidbildung hergestellt. Die Zellvorbereitung erfolgt analog der Einzelzellmigration (siehe 3.3.1). Es wird jedoch eine Zellkonzentration von 1,5 Millionen Zellen/ml benutzt. Nach der Zellpassagierung werden 20µl der Zellsuspension je Slot der 96-well-Platte pipettiert und dann mit je 200µl DMEM bedeckt. Unter täglicher Kontrolle und vorsichtigem Mediumwechsel erfolgt nach 3 Tagen das Gewinnen der Sphäroide. Zur Herstellung der Migrationskammern werden jeweils 150-200µl Vitrogengel (Vitrogen + Bicarbonat + MEM) vorbereitet und in eine FS-Kammer pipettiert. Anschließend erfolgt der Transfer des Sphäroiden aus dem Well mittels Glaspipette in den vorbereiteten FS-Objekträger, wo er mittig platziert wird. Zur Auffüllung der Box verwendet man 150µl DMEM + 10% FKS. Nach Verschließen der Box mit Paraffin wird der Objekträger unter dem Mikroskop bei hundertfacher Vergrößerung platziert. Zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur kommen wiederum Rotlichtwärmeboxen mit 37°C +/- 1°C zum Einsatz. Die abschließende videomikroskopische Beobachtung der Migration der Tumorzellen in die dreidimensionale, künstliche Kollagenmatrix erfolgt mittels Grab4PCI über 48-72h je Zelllinie mit Erstellung einer Aufnahme alle zehn Minuten.

### 3.4 Immunfluoreszenz

#### 3.4.1 Herkunft der Präparateschnitte

Die mit Y27632 stimulierten Ovarialkarzinomzellen sowie als Kontrolle dienende, unstimulierte Zellen werden mit einer Primärantikörper-Kombination aus einer der zu untersuchenden Hauptkomponenten, entweder gegen Ezrin (H) oder CD44 (H), sowie gegen einer der phosphorylierten/aktivierten Tyrosinase-Untereinheiten Ezrin355, Ezrin565, CD44v3 oder CD44v6 versetzt (siehe Tab. 4). Als Sekundärantikörper wurde Cy3 im Falle von Ezrin (H), CD44 (H), CD44v3 und CD44v6 verwandt, da diese eine mouse-sheep-Konjugation des Primärantikörpers besitzen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop stellt sich dies als rote Signalaktivität dar. Der Sekundärantikörper FITC wird einerseits aufgrund seiner sheep-rabbit-Konjugation zu den Primärantikörpern von Ezrin353 und Ezrin 566 verwandt. Andererseits soll somit eine mögliche Doppelfärbung von dem Primärantikörper Ezrin (H) vs. dessen Untereinheiten Ezrin353/Ezrin566 erreicht werden. FITC zeigt unter dem Fluoreszenzmikroskop eine grünliche Signalgebung (siehe Tab. 5).

**Tab. 4:** IF mit spezifischen Angaben betreffend die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Klonalität	Code	Donor	Verd.	Hersteller
Ezrin (H)	monoklonal	ab47255	mouse	1:200	abcam
Ezrin 353	polyklonal	ab47273	rabbit	1:100	abcam
Ezrin 566	polyklonal	ab47293	rabbit	1:100	abcam
CD44 (H)	monoklonal	NCL-CD44-2	mouse	1:200	R&D
CD44v3	monoklonal	ab34229	mouse	1:100	abcam
CD44v6	monoklonal	ab30436	mouse	1:400	abcam
Cy3	polyklonal	515-165-062	sheep	1:100	JacksonIR
FITC	polyklonal	ab6717	goat	1:300	abcam
DAPI	blau	A1001	synthetisch	1:1000	AppliChem

**Tab. 5:** Farbschemata der Primär-AK gegen Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 , CD44v6

Primär-AK vs.	Farbgebung	Primär-AK vs.	Farbgebung
Ezrin (H)	Rot	CD44 (H)	Rot
Ezrin353	Grün	CD44v3	Rot
Ezrin566	Grün	CD44v6	Rot

### 3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung – Vorgang

Nach Absaugen des Mediums erfolgt das Ablösen der Zellen mit Accutaselösung vom Flaschenboden. Nach Mobilisation der Zellen, Verbringen dieser in ein Petri-Röhrchen, Zentrifugieren für fünf Minuten bei 1000U/min und Abgießen des Überstandes, wird das Zellpellet in 1ml DMEM-Medium resuspendiert. Im Anschluss werden 10 $\mu$ l



Abb. 13: Zellreihen für die IF-Reaktion

aus dem Suspensat in 100 $\mu$ l Aqua dest. pipettiert und die Zellzahl mittels Coulter-Zählautomaten bestimmt. Danach wird eine Zellkonzentration von 500.000Zellen/ml eingestellt. Um eine Adhäsion der ruhenden Zellen mit möglichst vielen Pseudopodien für die IF als Voraussetzung zu haben, werden die passagierten Tumorzellen in Petrischalen mit darin befindlichen Deckgläschen ausgebracht und nach 48h in den Versuch einbezogen. Nach dem Verbringen von einem 20x20mm Deckgläschens in eine Petrischale pipettiert man 20 $\mu$ l Zellsuspension auf das Zentrum des Deckgläschens. Dann erfolgt das Auffüllen mittels DMEM-Medium und anschließender Bebrütung für 24h (siehe Abb. 13.). Am darauffolgenden Tag wird die Entwicklung der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Erster Schritt bei der IF ist ein Wasch-/Spülvorgang, welcher sich zwischen den einzelnen Fixier- und Färbevorgängen mehrmals wiederholt um inadhärente Zellen oder verbliebene Zellbestandteile aus dem Versuch zu entfernen. Das Zellmedium wird abgegossen und die einzelne Petrischale jeweils dreimal hintereinander unter leichten Schwenkbewegungen mit 200 $\mu$ l TBST gespült. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1ml Methanol zur Fixierung der adhärenen Zellen und deren Pseudopodien für 15min bei -20°C. Das überschüssige Methanol wird wiederum durch dreimaliges Dekantieren mittels TBST entfernt. In Folge werden 20 $\mu$ l des verdünnten Primärantikörpers auf die Deckgläschen gegeben und 1h auf einem Schwenktisch bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach erfolgter Primärantikörper-Anlagerung wird die Petrischale erneut dreimal hintereinander mit TBST gespült. Anschließend werden 20 $\mu$ l des Sekundärantikörpers in die Petrischale mit darin befindlichem Deckgläschen aufgebracht und für eine weitere Stunde auf den Schwenktisch gelegt. Wegen der hohen Photosensitivität muss die Petrischale abgedunkelt werden, um eine vorzeitige Signalabschwächung des Sekundärantikörpers zu vermeiden. Nach anschließendem Spülvorgang folgt die DAPI-Kernfärbung (siehe Abb. 14). Diese dient zur Kontrolle, ob die Zellorganell-Anfärbung von

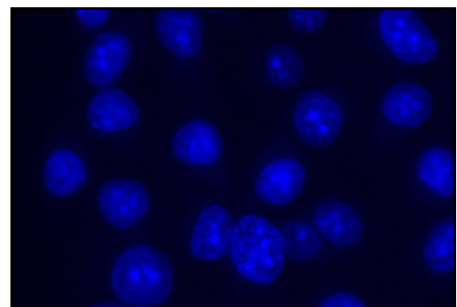


Abb. 14: DAPI-Kernfärbung

intakten, migrationsfähigen Zellen erfolgreich war und verhindert zugleich das Auswerten von apoptotischen Zellen bzw. Zellfragmenten. Nach erfolgtem letztem Spülvorgang können die Deckgläschen mit Hilfe eines Skalpells und einer anatomischen Pinzette aus den Petrischalen herausgehoben werden. Das Eindecken auf den Objektträgern durch Mounting Medium muss luftblasenfrei erfolgen, da in der anschließenden mikroskopischen Betrachtung sonst Verzerrungen der Proteinsignalstärke auftreten würden. Die Präparate werden im letzten Arbeitsschritt bei 4°C für 24 Stunden getrocknet, dunkel gelagert und anschließend am Fluoreszenzmikroskop begutachtet (siehe Tab. 6).

**Tabelle 6:** Arbeitsschritte Immunfluoreszenzfärbung

Schritt	Substanz/Arbeitsschritt	Zeit
1	Aceton	5min
2	Trocknen	2min
3	TBS-Puffer	3 x spülen
4	Hyaluronidase	30min
5	TBS-Puffer	3 x spülen
6	Antikörper I	60min
7	TBS-Puffer	3 x spülen
8	Antikörper II	60min
9	TBS-Puffer	3 x spülen
10	DAPI	15min
11	Methanol	3 x spülen
12	Mounting medium	eindecken
13	Lagern bei 4°C	24h

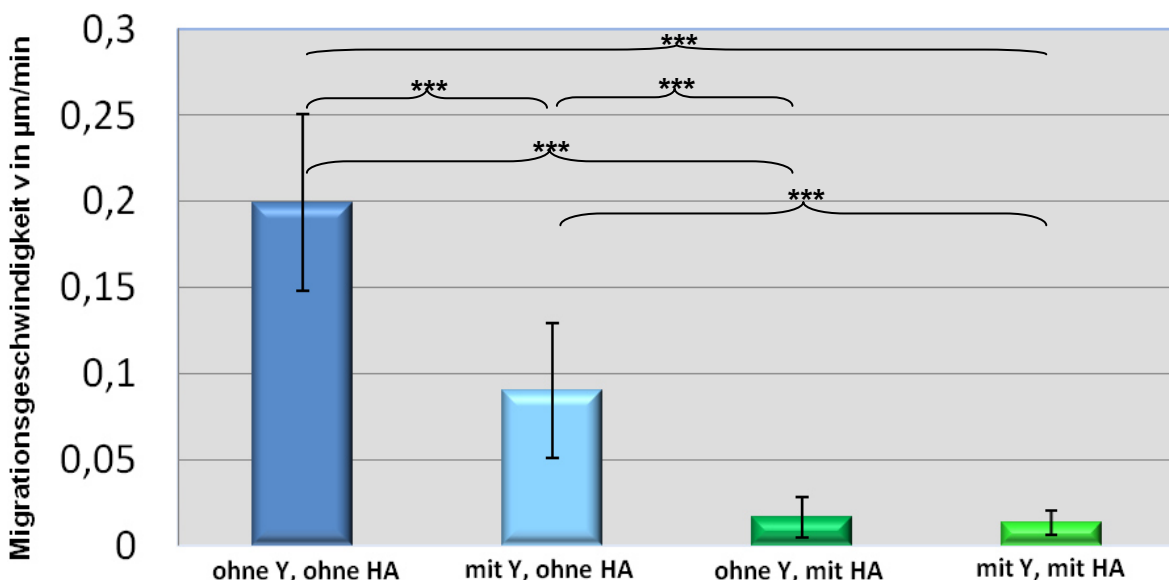


## 4 Ergebnisse

Um das Migrationsverhalten der fünf Ovarialkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurden neben Einzel- und Sphäroidmigrationstests auch Immunfluoreszenzuntersuchungen mit den entsprechenden Primärantikörpern gegen Ezrin (H) und CD44 (H) sowie deren Isoformen Ezrin353, Ezrin566, CD44v3 bzw. CD44v6 durchgeführt. Dabei sollten die Expression der Moleküle, deren Zellorganell-assoziierte Lage sowie eine mögliche Lokalisationsänderung analysiert werden. Es zeigt sich bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens eine Gruppierung in inhibierbare und aktivierbare Zelllinien. So werden die beiden Zelllinien ES2 und SKOV3 durch den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 in ihrer Migration gehemmt, die Zelllinien OVCAR3, OAW42 und CAO3 jedoch stimuliert.

### 4.1 SKOV3: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

Im Rahmen der Einzelzellmigration lässt sich eine maximale Migrationsgeschwindigkeit von  $0,199\mu\text{m}/\text{min}$  der Karzinomzelllinie in nativer Situation (Kontrolle) ohne Zusatz von HA und Y27632 verzeichnen (siehe Abb. 15). Dies entspricht einer durchschnittlichen Gesamtmigrationsweite nach 48 Stunden von  $573,12\mu\text{m}$ . Die Behandlung der Zellen mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzellmigration auf  $0,09\mu\text{m}/\text{min}$ . Dies bedeutet eine verminderte durchschnittliche Migrationsgesamtweite von  $259,49\mu\text{m}$  bzw. eine Absenkung auf 55% im Vergleich zum Kontrollversuch. Nach Zugabe von Hyaluronsäure sinkt die Migrationsgeschwindigkeit auf  $0,017\mu\text{m}/\text{min}$  bzw. um 92% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hierbei beträgt die maximale



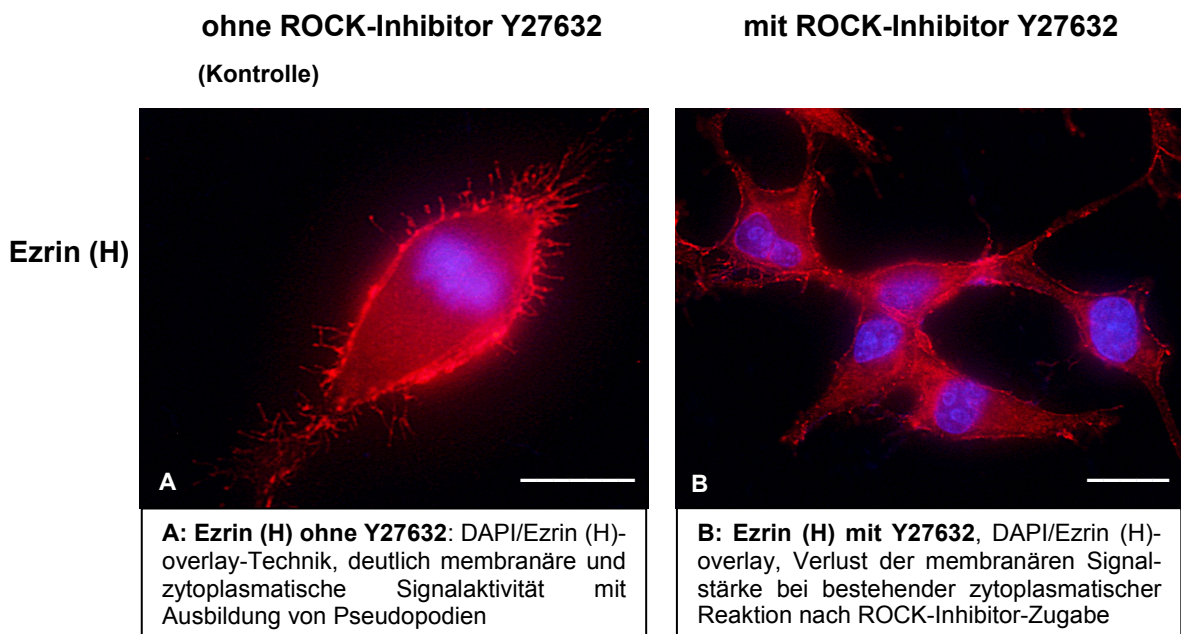
**Abb. 15: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie SKOV3 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$ :** Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632. Nach Inkubation mittels HA wird ebenfalls eine Hemmung der Geschwindigkeit beobachtet. Unter Doppel-Inkubation mittels Y27632 und HA sinkt die Migrationsgeschwindigkeit noch weiter ab. \*\*\* entsprechen einem p-Wert  $< 0,001$ .

mittlere Gesamtmigrationsweite nach 48h nur 48,10µm. Im Fall einer zeitgleichen Y27632- und HA-Zugabe sinkt die Migrationsgeschwindigkeit auf 0,01µm/min. Dies bedeutet eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit um 93% und eine Verminderung der durchschnittlichen Gesamtwerte auf 38,30µm im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei potenzieren sich die Migrationshemmungen der singulären Zugaben von Y27632 und HA und bilden einen synergistischen Effekt.

### **SKOV3: Expression von CD44 und Ezrin unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe**

Ezrin ist vorwiegend als kontinuierliches, submembranäres Band sowie in filopodienartigen Ausläufern der Tumorzellen nachweisbar. Eine deutlich schwächere Anreicherung zeigt es im Zellkern und im Zytoplasma. Zudem ist das Signal im Bereich von desmosomalen Zell-Zell-Interaktionen akzentuiert. Ein ähnliches Färbemuster ist mit dem AK gegen den aktivierten und phosphorylierten Ezrin-Tyrosinaserest353 zu verzeichnen. Ezrin566 findet man exklusiv in den Filopodien. CD44 (H) lässt sich in dieser Zelllinie deutlich membranär nachweisen, die Varianten CD44v3 und CD44v6 werden in dieser Lokalisation jedoch nicht exprimiert.

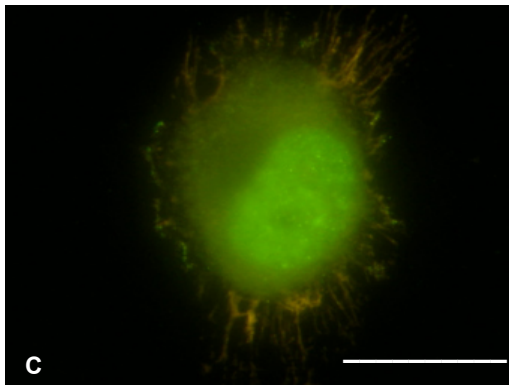
Nach ROCK-Inhibition nimmt die membranäre Signalstärke von Ezrin (H) stark ab, wobei die zytoplasmatische und nukleäre Anreicherung gleich bleiben. Ezrin353 und Ezrin566 werden vollständig von der Membran abgelöst. Im Fall von Ezrin353 zeigt sich eine zytoplasmatische Signalanreicherung. Die CD44-Expression ändert sich unter Y27632-Zugabe nicht (siehe Abb. 16A-T/ 17, Tab. 7/ 8).



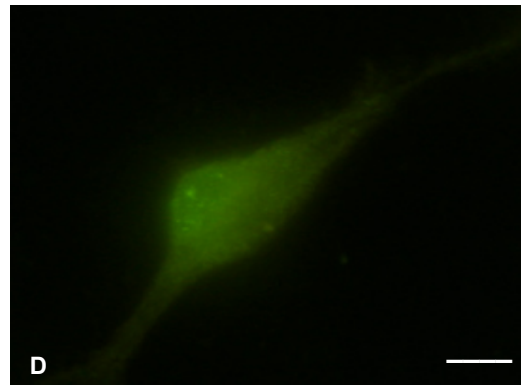
ohne ROCK-Inhibitor Y27632

mit ROCK-Inhibitor Y27632

Ezrin353

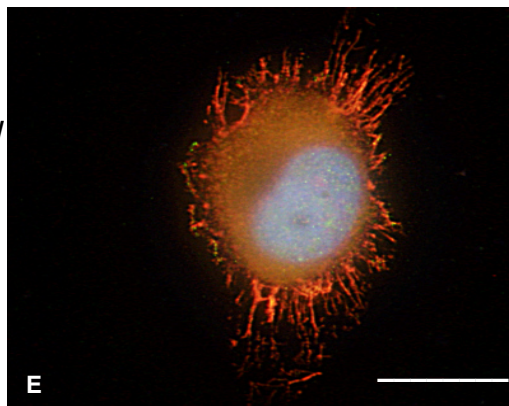


**C: Ezrin353 ohne Y27632**, verstärkt nukleäre Anreicherung mit Ausbildung von membranären Pseudopodien und mittlerer zytoplasmatischer Signalaktivität

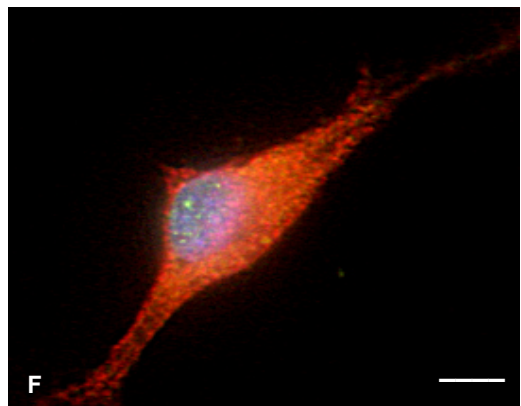


**D: Ezrin353 mit Y27632**, Verschwinden der membranären, pseudopodischen Komponente bei erhaltener zytoplasmatischer und nukleärer Aktivität

Ezrin353/  
Ezrin (H)  
Doppel-  
färbung

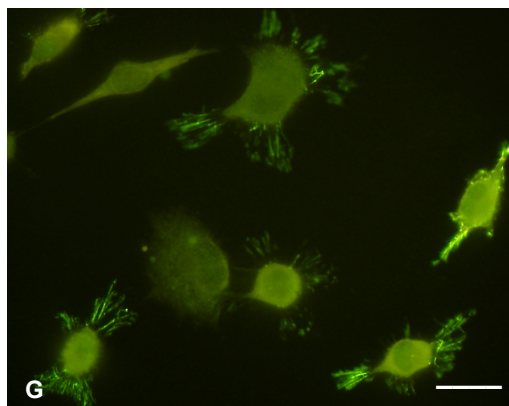


**E: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin353 ohne Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), membranäre, durch beide Ezrin-Moleküle bedingte Pseudopodienbildung bei mäßiger zytoplasmatischer Komponente

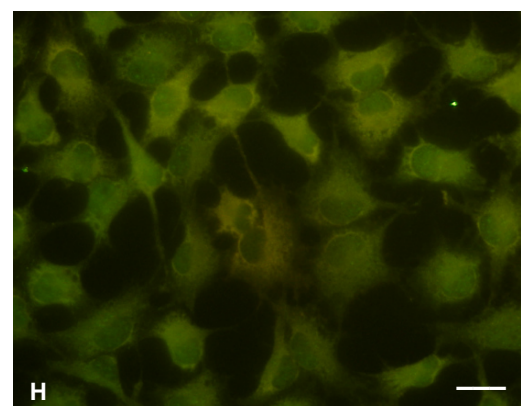


**F: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin353 mit Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Verlust der membranären und verstärkte zytoplasmatische Signalaktivität bei ROCK-Inhibitor-Zugabe

Ezrin566



**G: Ezrin566-Untereinheit ohne Y27632**, verstärkte membranäre Anreicherung und vermehrte Detektion in Pseudopodien, mäßige zytoplasmatische Aktivität bei fehlender nukleärer Reaktion

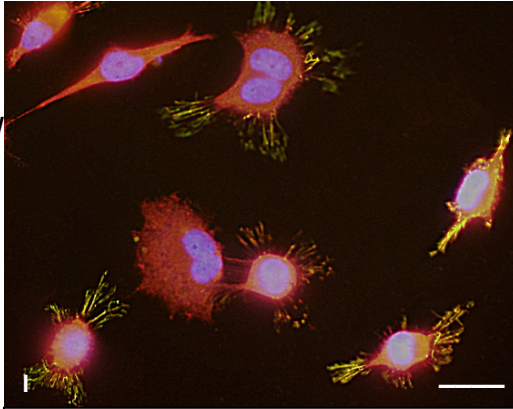


**H: Ezrin566-Untereinheit mit Y27632**, Verlust der membranären und pseudopodischen Anreicherung bei erhaltener zytoplasmatischer Komponente und fehlender nukleärer Anreicherung

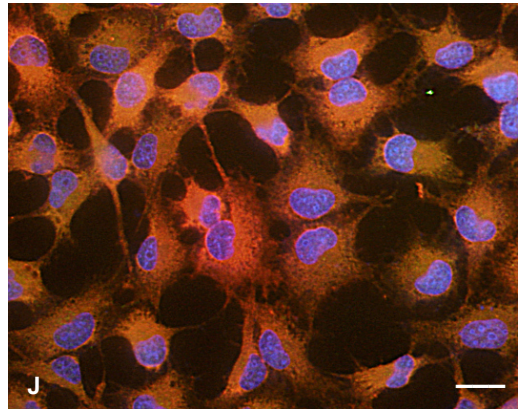
ohne ROCK-Inhibitor Y27632

mit ROCK-Inhibitor Y27632

Ezrin566/  
Ezrin (H)  
Doppel-  
färbung

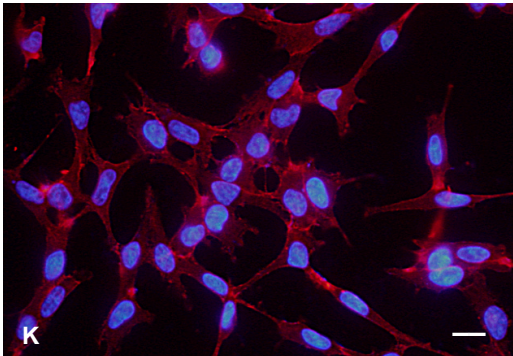


**I: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin566 ohne Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Pseudopodien vorwiegend Ezrin566 bestückt bei komplementärer Ezrin (H)/Ezrin566 zytoplasmatischer Signalaktivität

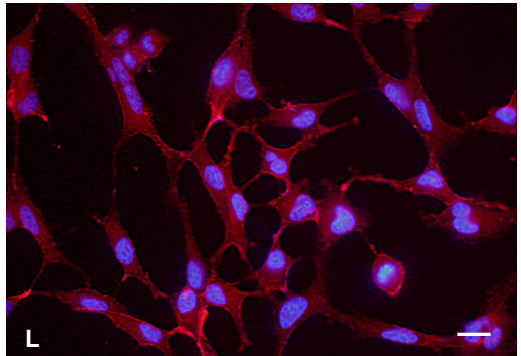


**J: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin566 mit Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Verlust der membranären Ezrin566-Signalaktivität bei erhaltener zytoplasmatischer Ezrin-Aktivität unter ROCK-Blockierung

CD44 (H)

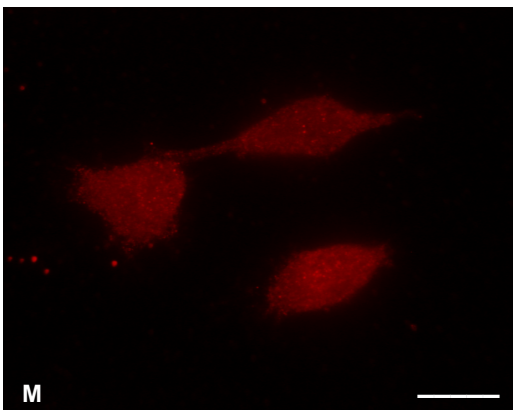


**K: CD44 (H) ohne Y27632**, DAPI/CD44 (H)-Overlaytechnik, gleichmäßige Verteilung des CD44 (H)-Moleküls membranär sowie zytoplasmatisch

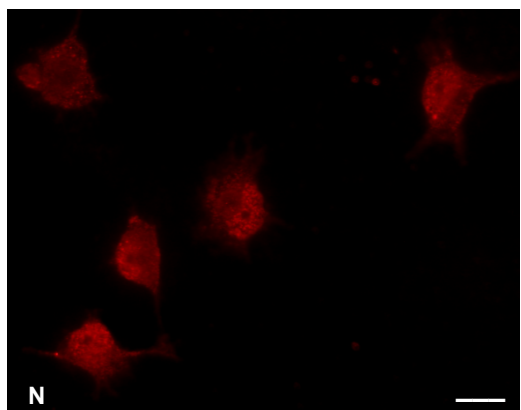


**L: CD44 (H) mit Y27632**, keine Zellkompartiment-assoziierte Änderung unter ROCK-Inhibitor-Zugabe an der Verteilung des CD44 (H) Moleküls

CD44v3



**M: CD44v3 ohne Y27632**, zytoplasmatische und nukleäre Anreicherung bei fehlender membranärer Komponente

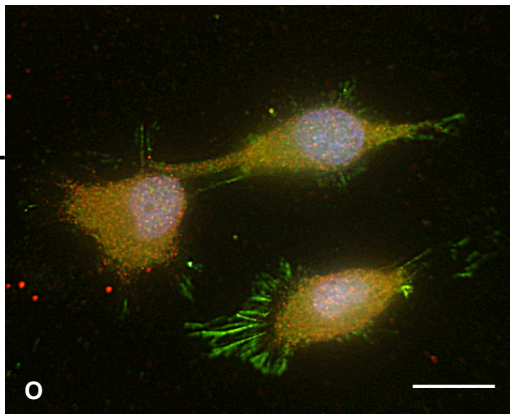


**N: CD44v3 mit Y27632**, unter Y27632-Zugabe keine Änderung der zytoplasmatischen Aktivität bei zeitgleicher Zunahme der nukleären Signalstärke

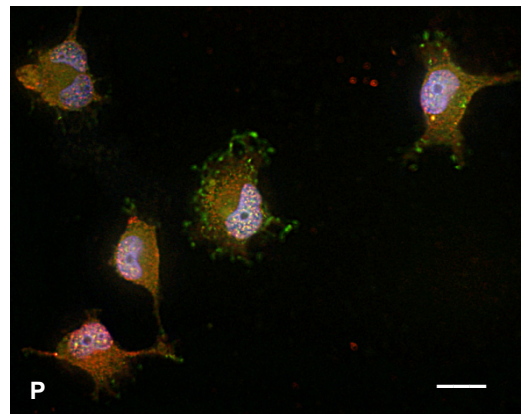
ohne ROCK-Inhibitor Y27632

mit ROCK-Inhibitor Y27632

CD44v3/  
Ezrin (H)-  
Doppel-  
färbung

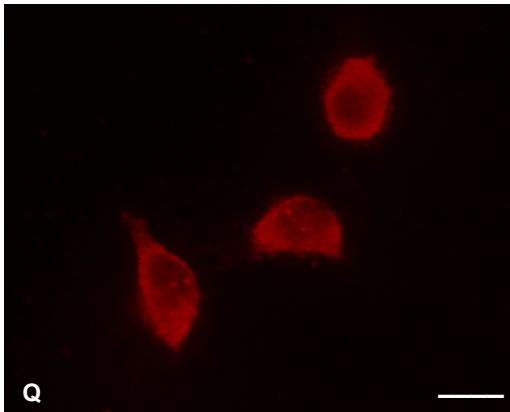


**O: Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v3 ohne Y27632**, (CD44v3-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Pseudopodien Ezrin(H) assoziiert bei zeitgleicher zytoplasmatischer Ezrin (H)/CD44v3-Signalaktivität

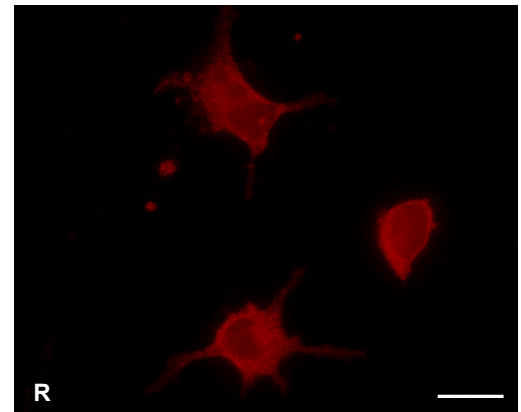


**P: Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v3 mit Y27632**, (CD44v3-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Verlust des membranären Ezrin (H)-Signals bei erhaltener zytoplasmatischer Ezrin (H)/CD44v3-Signalaktivität

CD44v6

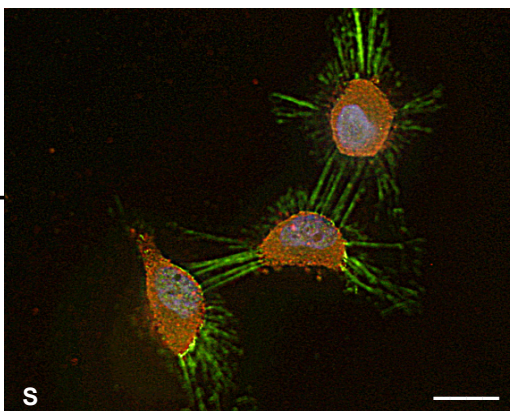


**Q: CD44v6 ohne Y27632**, zytoplasmatische und gering membranäre Anreicherung bei fehlender nukleärer Komponente

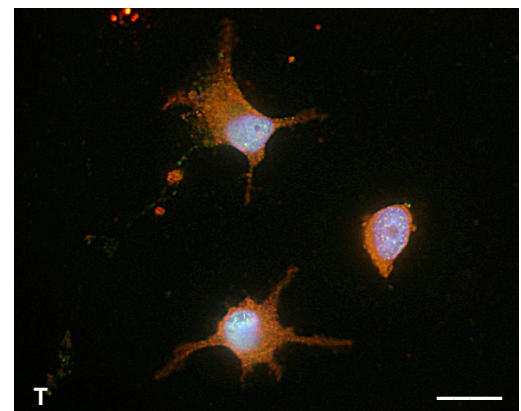


**R: CD44v6 mit Y27632**, keine Änderung der Signalaktivität unter Zugabe von Y27632 bei erhaltener zytoplasmatischer und gering membranärer Signalanreicherung

CD44v6/  
Ezrin (H)-  
Doppel-  
färbung



**S: Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v6 ohne Y27632**, (CD44v6-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Pseudopodien Ezrin (H) assoziiert bei zeitgleicher zytoplasmatischer Ezrin (H)/CD44v3-Doppel-Signalaktivität



**T: Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v6 mit Y27632**, (CD44v6-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Verlust der membranären Ezrin (H)-Signalaktivität bei erhaltener zytoplasmatischer Ezrin (H)/CD44v3-Signalaktivität

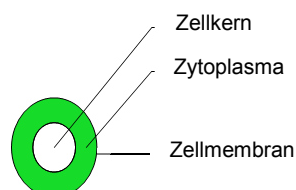
**Abb. 16: A-T: IF der Tumorzelllinie SKOV3:** Differenzierung der Primärantikörper und deren Komplexüberlagerung bei Y27632-Inkubation. Der weiße Balken entspricht in den Bildern A-T jeweils 85,7µm.

**Tab. 7:** IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie SKOV3 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6 (Legende: semiquantitative Einschätzung der Anfärbbarkeit: 0=keine Anfärbbarkeit, 3=stärkste Anfärbbarkeit)

	ohne Y27632	mit Y27632
<b>Ezrin (H)</b>	membranär (2) zytoplasmatisch (2) nicht nukleär vorkommend (0)	membranär (1) zytoplasmatisch (2) nicht nukleär vorkommend (0)
<b>Ezrin353</b>	membranär (1) zytoplasmatisch (1,5) nukleär (2)	nicht membranär vorkommend (0) zytoplasmatisch (1,5) nukleär (2)
<b>Ezrin566</b>	membranär (2,5) zytoplasmatisch (1,5) nicht nukleär vorkommend (0)	nicht membranär vorkommend (0) zytoplasmatisch (1,5) nicht nukleär vorkommend (0)
<b>CD44 (H)</b>	membranär (1), zytoplasmatisch (1,5), nicht nukleär vorkommend (0)	
<b>CD44v3</b>	nicht membranär und nukleär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1,5)	
<b>CD44v6</b>	zytoplasmatisch (1,5), nicht membranär und nukleär vorkommend (0)	

**Tab. 8:** Einfluss des ROCK-Inhibitors Y27632 auf die Lokalisierung von Ezrin und CD44 der Zelllinie SKOV3

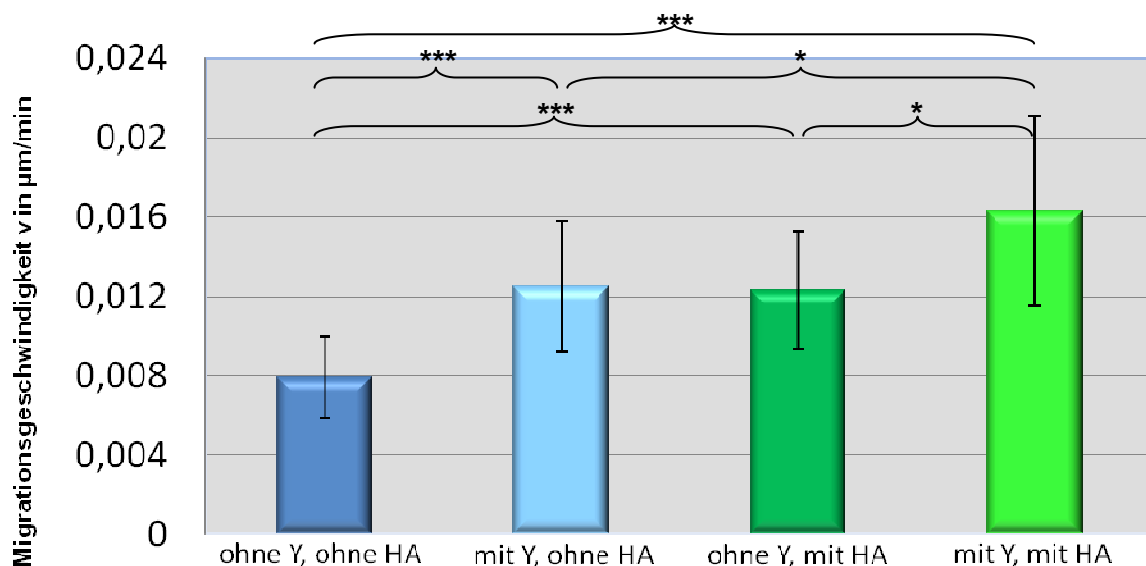
	ohne Y27632	mit Y27632		ohne / mit Y27632
<b>Ezrin (H)</b>			<b>CD44 (H)</b>	
<b>Ezrin353</b>			<b>CD44v3</b>	
<b>Ezrin566</b>			<b>CD44v6</b>	



**Abb. 17: Schema der Zellbestandteile bei der Immunfluoreszenzverteilung:** Dreiteilung in Zellkern, Zytoplasma und Zellmembran entsprechend der Hauptwirkungs-orte von CD44 (H) und Ezrin (H).

#### 4.2 OVCAR3: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

In der Betrachtung der OVCAR3-Einzelzellmigration ist per se eine niedrige Migrationsgeschwindigkeit von  $0,008\mu\text{m}/\text{min}$  ohne Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 oder von Hyaluronsäure feststellbar (siehe Abb. 18). Nach 48 Stunden bedeutet dies eine maximale Gesamtmigrationsweite von  $22,75\mu\text{m}$ . Unter Zugabe von Y27632 steigt die Migrationsgeschwindigkeit signifikant auf  $0,013\mu\text{m}/\text{min}$ , in der Gesamtmigrationsweite auf  $36,00\mu\text{m}$  bzw. um 58,2% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen an. Nach Hyaluronsäure-Inkubation ist ein nahezu identischer Anstieg auf  $0,012\mu\text{m}/\text{min}$  bzw. um 56,7% zu resümieren. Dies bedeutet eine Steigerung der Gesamtmigrationsstrecke auf  $35,42\mu\text{m}$ . Bei zeitgleicher Behandlung mittels HA und Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 steigt die Migrationsgeschwindigkeit auf  $0,016\mu\text{m}/\text{min}$  und die 48 Stunden-Migrationsweite auf  $46,94\mu\text{m}$ . Dies bedeutet eine Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit und der absoluten Gesamtweite auf 206,3% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hierbei ist von einer Summierung der Wirkung der beiden Einzelkomponenten Y27632 und HA auszugehen.



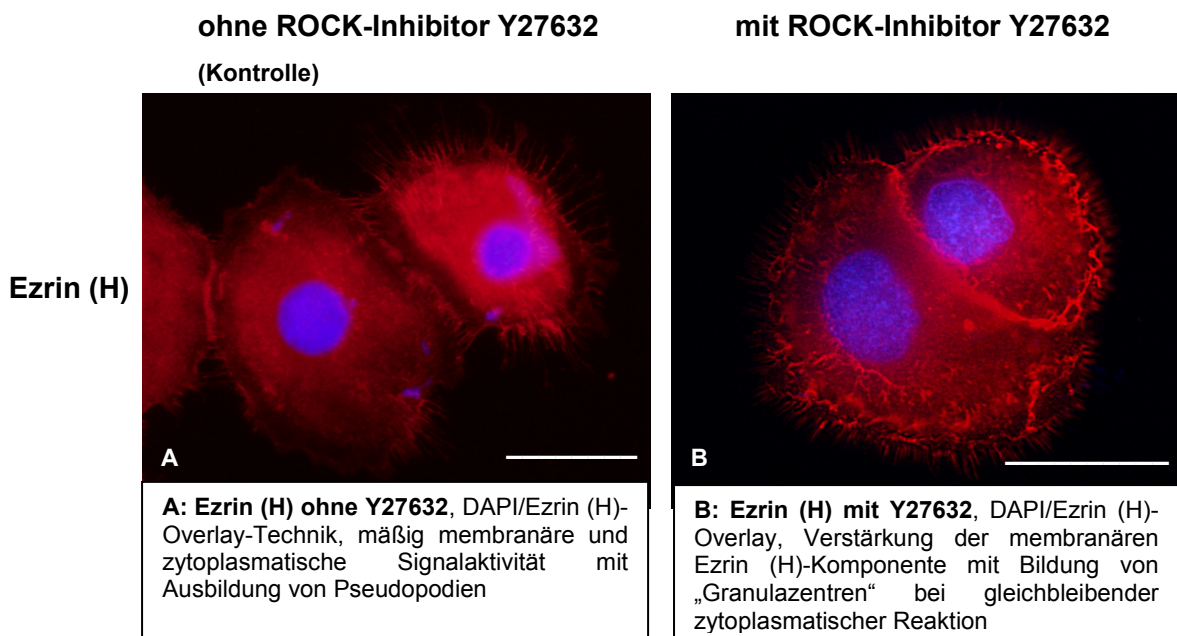
**Abb. 18: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie OVCAR3 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$ :** Dabei stellen die drei \*\*\* einen p-Wert  $< 0,001$  zwischen den einzelnen Versuchsansätzen dar. Die p-Werte mit einem \* zeigen eine Signifikanz  $< 0,05$  an.

#### OVCAR3: Expression von CD44 und Ezrin unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

Nachfolgend ist die Expression und die Lokalisierung von Ezrin, dessen phosphorylierter Untereinheiten Ezrin353/ Ezrin566 bzw. CD44, CD44v3/ CD44v6 bei der Tumorzelllinie OVCAR3 dargestellt (siehe Abb. 19A-T). Ezrin lässt sich im Zytoplasma sowie membranär, nicht aber im Zellkern nachweisen. Ein geringes Ezrin566-Signal lässt sich auch in dieser Zelllinie membranär nachweisen, wenngleich dessen zytoplasmatische Anreicherung dominiert und der Zellkern stets frei bleibt. Bei der phosphorylierten Isoform von Ezrin353 zeigt sich eine klare Zellkompartimentengliederung. Hierbei ist keine

membranäre Anreicherung des Ezrin353 zu verzeichnen. Daneben ist ein mittleres Ezrin353-Signal zytoplasmatisch und eine starke nukleäre Aktivität nachweisbar. CD44 (H) wird in dieser Zelllinie gleichmäßig membranär und zytoplasmatisch exprimiert. Die Varianten CD44v3 und CD44v6 sind zwar zytoplasmatisch jedoch nicht im Bereich der Zellmembran nachweisbar. Bei CD44v3 ist neben der zytoplasmatischen auch noch eine nukleäre Expression zu verzeichnen.

Nach ROCK-Inhibition ist eine deutlich granulär-membranäre Ezrin-Aktivität zu verzeichnen, im Wesentlichen durch Ezrin (H) bedingt. Es erfolgt dabei keine komplette Bindung an die Zellmembran, jedoch ein Hervortreten der filopodienartigen Strukturen (siehe Abb. 19). Bei singulärer Betrachtung der Ezrin353-Phosphorylierungsstelle ist keine Signaländerung von membranär und zytoplasmatisch sowie einer damit ursächlichen Ezrin-Konformationsänderung sichtbar. Das membranär gelagerte Ezrin566 geht verloren, parallel dazu steigt das zytoplasmatische Signal an. Zudem lässt sich Ezrin566 nun auch verstärkt nukleär nachweisen. Die CD44 (H) und CD44v3/CD44v6-Varianten-Expression ändert sich nach Y27632-Zugabe nicht. Das membranäre begrenzte Signal zeigt bei CD44 (H) wiederum die stärkste Intensitätsausprägung, gefolgt von einer zytoplasmatischen Anreicherung (siehe Tab. 9/ 10). Bei CD44v3 überwiegt der nukleäre Anteil und bei CD44v6 ist nur eine zytoplasmatische Expression zu verzeichnen.

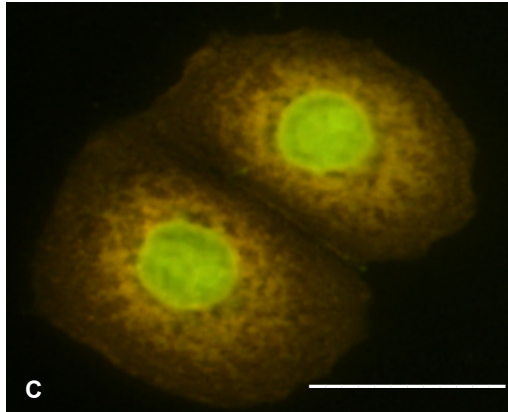




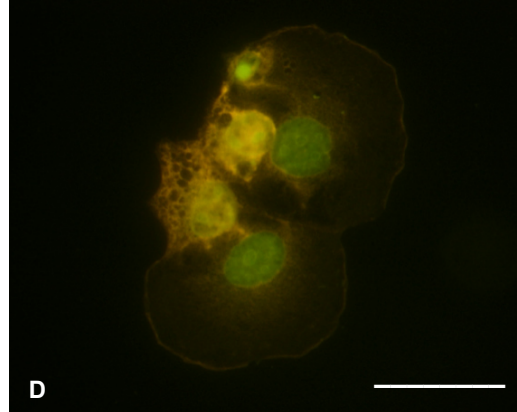
ohne ROCK-Inhibitor Y27632

mit ROCK-Inhibitor Y27632

Ezrin353

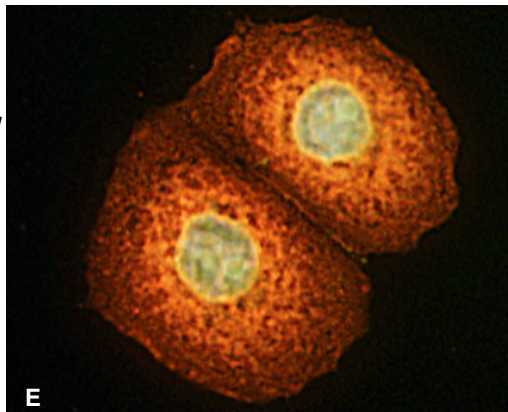


**C: Ezrin353 ohne Y27632**, verstärkt nukleäre Anreicherung sowie zytoplasmatisch-perinukleäre Ezrin (H)-Signalaktivität bei fehlender membranärer Komponente

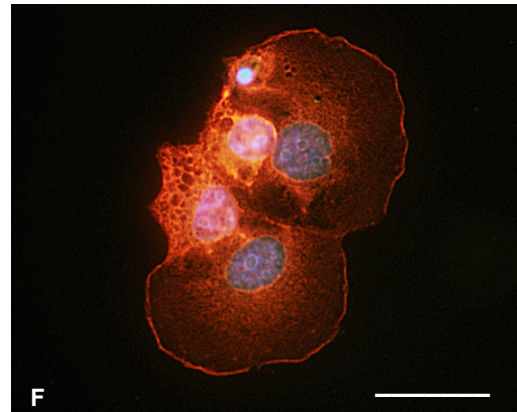


**D: Ezrin353 mit Y27632**, geringe membranäre Mehranreicherung bei leichtem zytoplasmatischen Signalverlust von Ezrin (H) unter Y27632-Zugabe

Ezrin353/  
Ezrin (H)  
Doppel-  
färbung

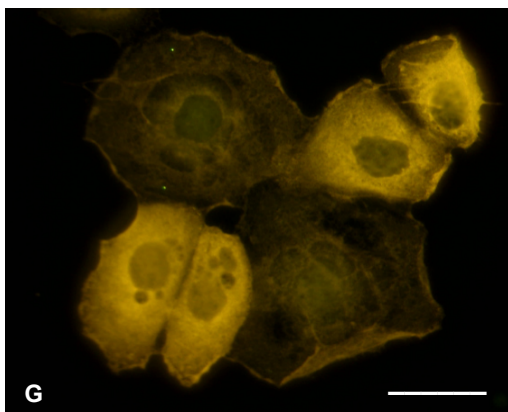


**E: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin353 ohne Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), verstärkt zytoplasmatisch-perinukleäre Ezrin (H)/Ezrin353-Signalaktivität bei fehlender membranärer Komponente

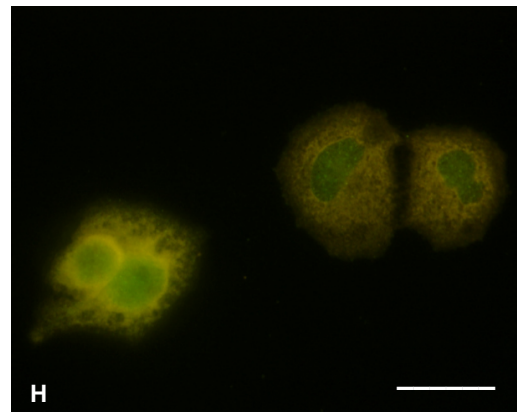


**F: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin353 mit Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), membranäre Mehranreicherung bei leichter zytoplasmatischer Signaldeletion von Ezrin (H)/Ezrin353 unter Y27632-Zugabe

Ezrin566



**G: Ezrin566-Untereinheit ohne Y27632**, geringe membranäre Anreicherung bei mittlerer zytoplasmatischer Aktivität und fehlender nukleärer Reaktion

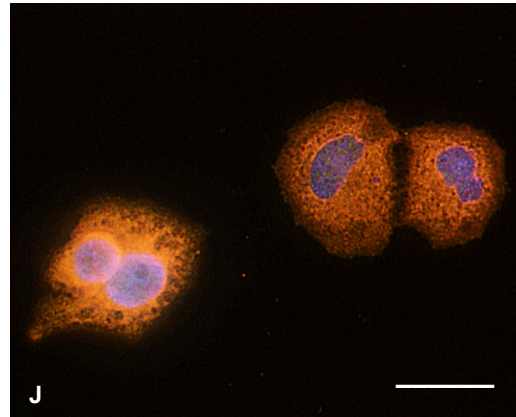
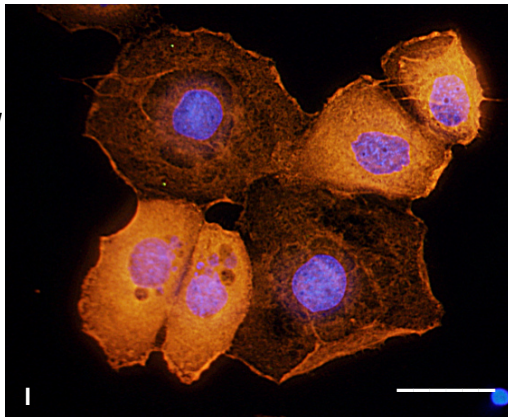


**H: Ezrin566-Untereinheit mit Y27632**, Verlust der membranären Anreicherung bei erhaltener zytoplasmatischer Komponente und nun verstärkter nukleärer Ausprägung unter Y27632-Zugabe

ohne ROCK-Inhibitor Y27632

mit ROCK-Inhibitor Y27632

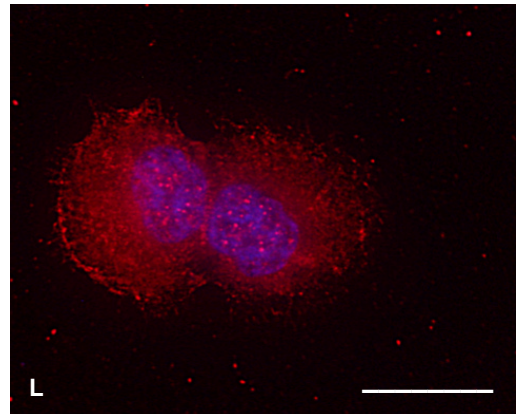
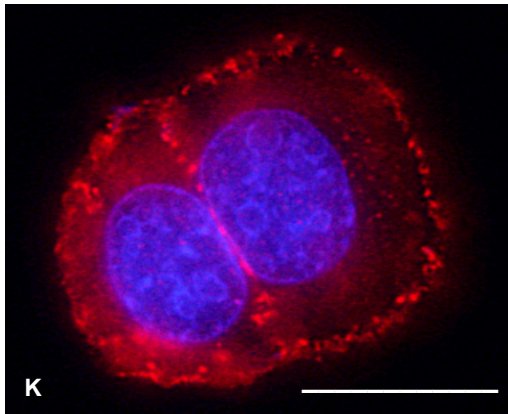
Ezrin566/  
Ezrin (H)  
Doppel-  
färbung



**I: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin566 ohne Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), geringe membranäre Anreicherung bei mittlerer zytoplasmatischer Aktivität von Ezrin (H)/ Ezrin566

**J: Komplexfärbung Ezrin (H)/Ezrin566 mit Y27632**, (Ezrin (H)-rot, Ezrin353grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), Verlust der membranären Ezrin (H)/ Ezrin566-Aktivität bei erhaltener zytoplasmatischer und verstärkt perinukleärer Aktivität

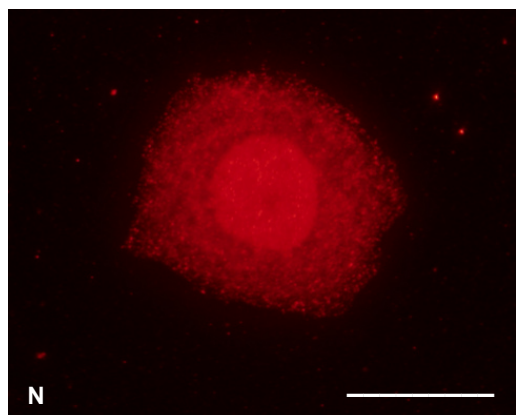
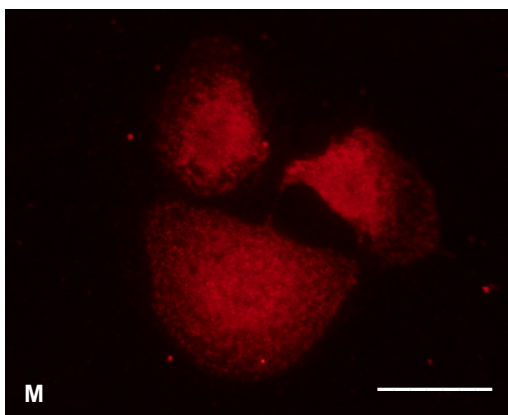
CD44 (H)



**K: CD44 (H) ohne Y27632**, DAPI/CD44 (H)-Overlay, roter Cy3-AK, gleichmäßige Verteilung des CD44 (H)-Moleküls membranär-aktiviert sowie zytoplasmatisch-inaktiv-gelöst

**L: CD44 (H) mit Y27632**, keine Zellkompartiment-assoziierte Änderung unter ROCK-Inhibitor-Zugabe an der Verteilung des CD44 (H) Moleküls

CD44v3



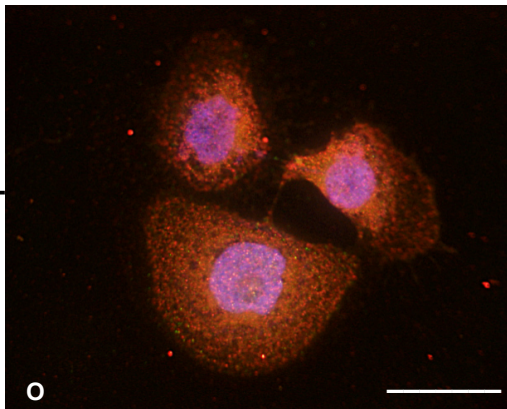
**M: CD44v3 ohne Y27632**, zytoplasmatische und nukleäre Anreicherung bei fehlender membranärer Komponente

**N: CD44v3 mit Y27632**, unter Y27632-Zugabe nukleäre Mehranreicherung bei gleichbleibender zytoplasmatischer Aktivität

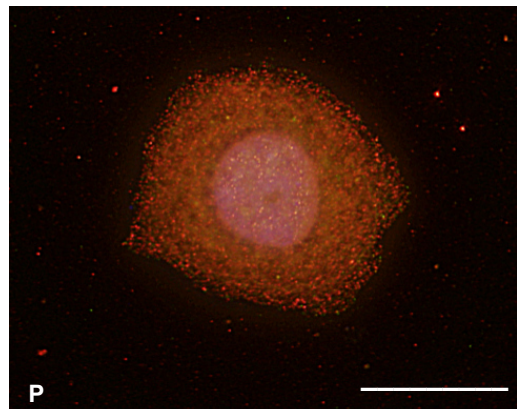
ohne ROCK-Inhibitor Y27632

mit ROCK-Inhibitor Y27632

CD44v3/  
Ezrin (H)-  
Doppel-  
färbung

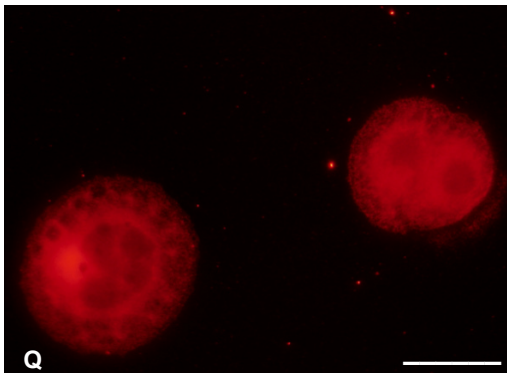


**O:** Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v3 ohne Y27632, (CD44v3-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), zytoplasmatische und nukleäre Anreicherung bei fehlender membranärer Komponente

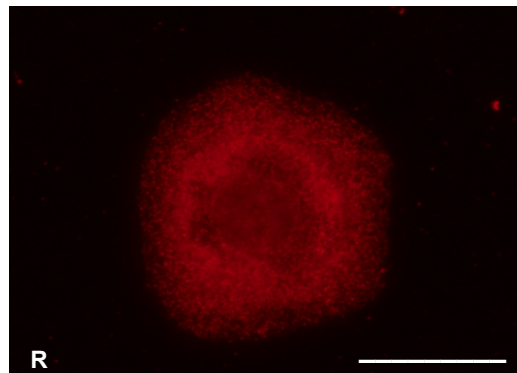


**P:** Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v3 mit Y27632, (CD44v3-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), gering zytoplasmatische Mehranreicherung bei erhaltener nukleärer Komponente

CD44v6

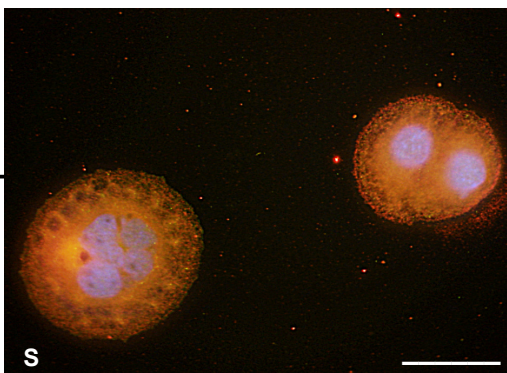


**Q:** CD44v6 ohne Y27632, zytoplasmatisch-wolkige Signalaktivität von CD44v6 bei nukleärer Aussparung und perinukleärem Halo, fehlende membranäre Komponente

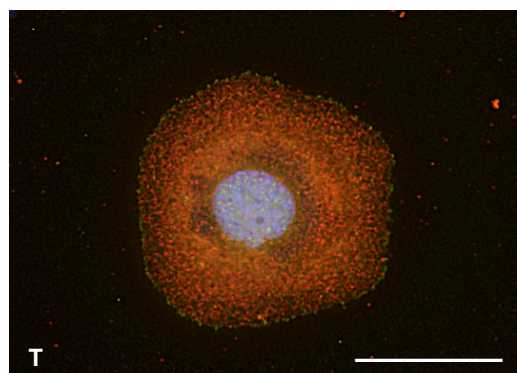


**R:** CD44v6 mit Y27632, keine Änderung der Signalaktivität unter Zugabe von Y27632 bei erhaltener zytoplasmatischer und perinukleärer Anreicherung

CD44v6/  
Ezrin (H)-  
Doppel-  
färbung



**S:** Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v6 ohne Y27632, (CD44v6-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), zytoplasmatische und perinukleäre Anreicherung











**T:** Komplexfärbung Ezrin (H)/CD44v6 mit Y27632, (CD44v6-rot, Ezrin (H)-grün, DAPI-blau-Dreifachfärbung), keine Änderung der zytoplasmatisch-perinukleären Signalaktivität unter Zugabe von Y27632

**Abb. 19: A-T: IF der Tumorzelllinie OVCAR3:** Differenzierung der Primärantikörper und deren Komplexüberlagerung bei Y27632-Inkubation. Der weiße Balken entspricht in den Bildern A-T jeweils 85,7µm.

**Tab. 9:** IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie OVCAR3 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6

	ohne Y27632	mit Y27632
<b>Ezrin (H)</b>	membranär (1,5) zytoplasmatisch (1,5) nicht nukleär vorkommend (0)	membranär (2,5) zytoplasmatisch (1,5) nicht nukleär vorkommend (0)
<b>Ezrin353</b>	nicht membranär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1,5), nukleär (2,5)	
<b>Ezrin566</b>	membranär (1) zytoplasmatisch (1,5) nicht nukleär vorkommend (0)	nicht membranär vorkommend (0) zytoplasmatisch (2) nukleär (2)
<b>CD44 (H)</b>	membranär (1,5), zytoplasmatisch (1), nicht nukleär vorkommend (0)	
<b>CD44v3</b>	nicht membranär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1,5), nukleär (1,5)	
<b>CD44v6</b>	zytoplasmatisch (1,5), nicht membranär und nukleär vorkommend (0)	

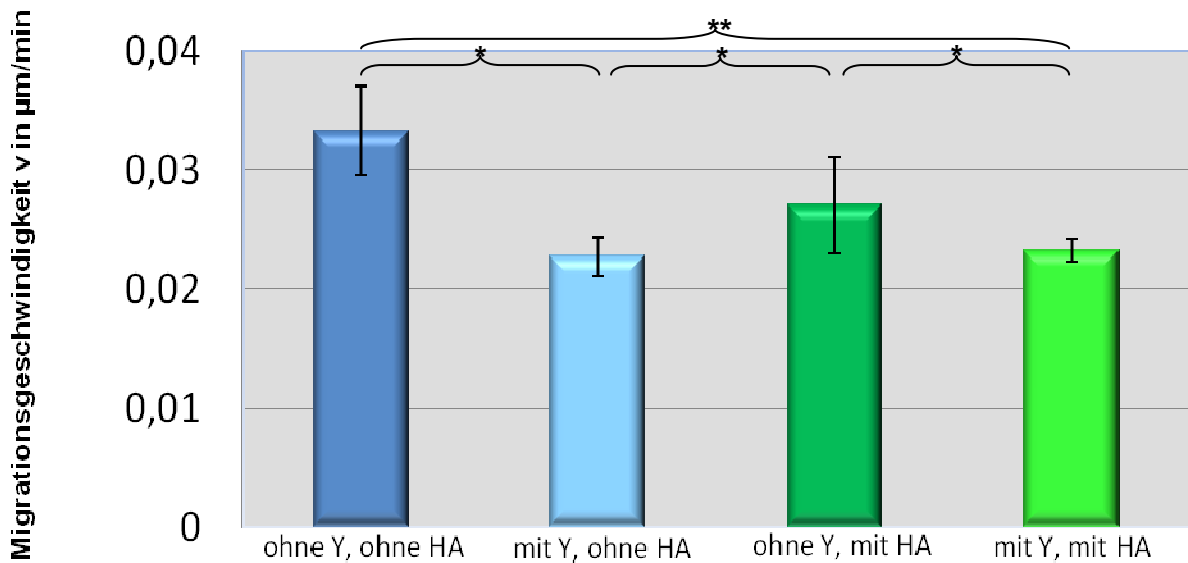
**Tab. 10:** Einfluss des ROCK-Inhibitors Y27632 auf die Lokalisierung von Ezrin und CD44 der Zelllinie OVCAR3

	ohne Y27632	mit Y27632		ohne / mit Y27632
<b>Ezrin (H)</b>			<b>CD44 (H)</b>	
<b>Ezrin353</b>			<b>CD44v3</b>	
<b>Ezrin566</b>			<b>CD44v6</b>	

#### 4.3 ES2: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

Die Hemmung der Rho-Kinase führt in der Zelllinie ES2 zu einer signifikanten Verminderung der Migrationsweiten. In der Nativ-Kontrolle ohne Zusatz von Y27632 und Hyaluronsäure ist eine Migrationsgeschwindigkeit von 0,033µm/min zu verzeichnen (siehe Abb. 20). Dies bedeutet eine Gesamtmigrationsweite von 95,62µm nach 48 Stunden. Nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 zeigt sich eine signifikante Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit und somit Hemmung der Tumorzellausbreitung ungeachtet des Zusatzes von HA auf 0,023µm/min. Die Gesamtmigrationsweite beträgt nach 48 Stunden

65,38 $\mu$ m, was eine Reduktion um 31,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bedeutet. Hierbei ist neben der Minderung der Migrationsgeschwindigkeit und -strecke auch ein Verlust bei der Ausbildung von Pseudopodien nachweisbar. Nach Inkubation mittels HA wird eine vergleichbare Hemmung der Geschwindigkeit auf 0,027 $\mu$ m/min sowie um 18,7% beobachtet. Dabei beträgt die nach 48 Stunden zurückgelegte Migrationsstrecke 77,76 $\mu$ m. Unter zeitgleicher Zugabe von Y27632 und HA sinkt die Migrationsgeschwindigkeit auf 0,0232 $\mu$ m/min, die Migrationsweite auf 66,82 $\mu$ m bzw. um 30,1% im Vergleich zur Kontrollgruppe ab.



**Abb. 20: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie ES2 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu$ m/min:** Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 sowie eine vergleichbare Hemmung nach Inkubation mittels HA. Unter Simultanzugabe von Y27632 und HA sinkt die Migrationsgeschwindigkeit ebenfalls. Dabei stellt ein \* einen p-Wert < 0,05 als Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsansätzen dar. Zwei \*\* bedeuten einen p-Wert < 0,01.

Aufgrund des simultanen Reaktions- und Lokalisationsverhaltens von Ezrin bzw. CD44 bei der Tumorzelllinie ES2 im Vergleich zu SKOV3 sowie CAOV3 respektive OAW42 zu OVCAR3 in der Immunfluoreszenz wird auf eine bildliche Darstellung dieser Ergebnisse in den folgenden Zelllinien verzichtet und lediglich eine tabellarische sowie beschreibende Form gewählt.

### ES2: Expression von CD44 und Ezrin unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

Bei der Betrachtung der Expression von Ezrin (H) in der Immunfluoreszenz zeigt die Ovarialkarzinomzelllinie ES2 eine vorwiegend membranäre Signalstärke mit Ausbildung eines kontinuierlichen Bandes von Ezrin (H) sowie das Vorkommen in filopodienartigen Ausläufern der Tumorzellen. Eine zytoplasmatische Reaktion ist lediglich spärlich sichtbar. Dies ist beim phosphorylierten Ezrin566 in gleichem Maße der Fall. Lediglich

Ezrin353 zeigt keine membranäre, wohl aber eine leicht zytoplasmatische sowie eine verstärkt nukleäre Anreicherung. Nach Zugabe von Y27632 bei Betrachtung von Ezrin (H) ist eine Verlagerung des ERM-Komplex-assoziierten Signales nach intrazellulär und somit ein qualitativ sichtbarer Membranmarkierungsverlust nachweisbar (siehe Tab.11). Zusätzlich stellt sich eine Verringerung des Ezrin (H)-Signals in den Pseudopodien nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors dar. Diese Reaktion ist ebenfalls bei Ezrin566 deutlich sichtbar. Ezrin353 zeigt in den Immunfluoreszenzfärbungen bei der ES2-Zelllinie keine Zellkompartiment-spezifischen Veränderungen unter Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632. Das transmembranäre CD44 (H) sowie dessen Spleißvarianten CD44v3 und CD44v6 weisen sowohl ohne als auch mit Y27632 keine Veränderung ihrer Lokalisation auf. Hierbei zeigt CD44 (H) in der Immunfluoreszenz ein mäßig membranäres Signal, teils in den Filopodien akzentuiert. Zytoplasmatisch ist es nur gering nachweisbar. Im Gegensatz dazu sind die Spleißvarianten CD44v3 und CD44v6 membranär nicht nachweisbar. Sie zeigen sich leicht zytoplasmatisch gelagert. CD44v3 wird zusätzlich noch in einer schwachen Ausprägung nukleär detektiert.

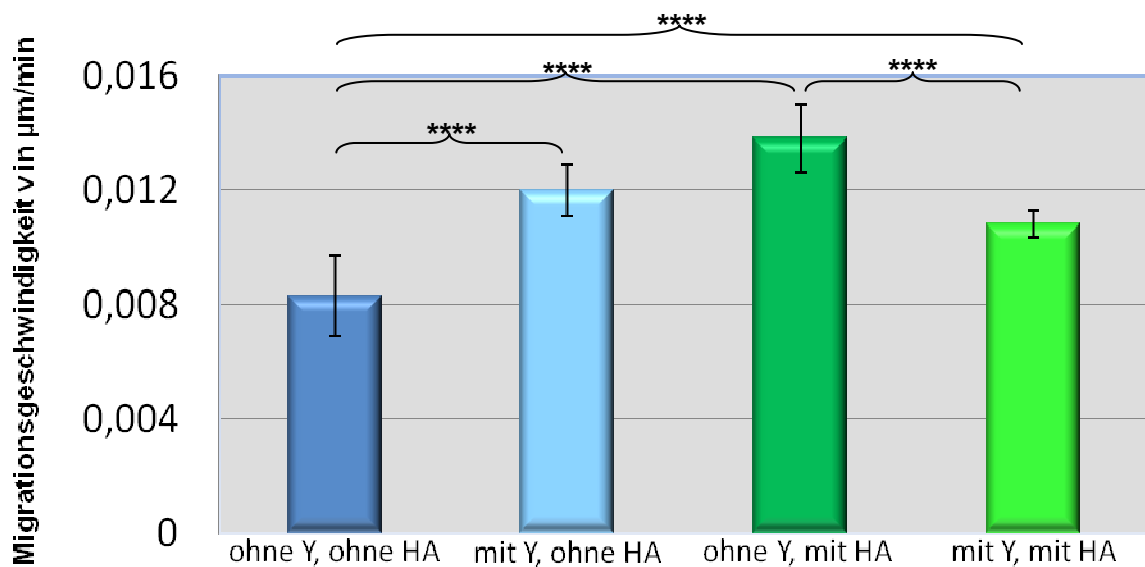
**Tab. 11:** IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie ES2 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6

	ohne Y27632	mit Y27632
<b>Ezrin (H)</b>	membranär (2,5) zytoplasmatisch (1) nicht nukleär vorkommend (0)	membranär (1) zytoplasmatisch (1) nicht nukleär vorkommend (0)
<b>Ezrin353</b>	nicht membranär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1), nukleär (2)	
<b>Ezrin566</b>	membranär (2,5) zytoplasmatisch (1) nicht nukleär vorkommend (0)	nicht membranär vorkommend (0) zytoplasmatisch (1) nicht nukleär vorkommend (0)
<b>CD44 (H)</b>	membranär (1,5), zytoplasmatisch (1), nicht nukleär vorkommend (0)	
<b>CD44v3</b>	nicht membranär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1), nukleär (1)	
<b>CD44v6</b>	nicht membranär (0), zytoplasmatisch (1), nicht nukleär (0)	

#### 4.4 OAW42: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

Im Rahmen der OAW42-Einzelzellmigration ist eine maximale Migrationsgeschwindigkeit von 0,008µm/min und eine maximale Migrationsweite nach 48h von 23,90µm der Karzinomzelllinie in nativer Situation ohne Zusatz von HA und Y27632 verzeichnen (siehe

Abb. 21). Bei OAW42 zeigt sich im Migrationsversuch eine signifikante Erhöhung der Motilität nach Y27632-Zugabe. So ist eine Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 auf 0,012µm/min zu verzeichnen. Dies bedeutet eine Steigerung der Migrationsgesamtweite über 48h auf 34,56µm im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Mikroskop-gestützten 48 Stunden-Aufnahme zeigt sich bei OAW42 nach Y27632-Inkubation eine signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit um 44,6% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Inkubation mittels Hyaluronsäure wird eine vergleichbare Stimulation der Geschwindigkeit auf 0.014µm/min beobachtet. Unter HA-Substitution ist ebenfalls eine Steigerung der Gesamtmigrationsweite auf 39,70µm sichtbar. Bei der Zellstimulation mittels Hyaluronsäure ergibt sich eine Anhebung der Migrationsgeschwindigkeit um 66,3%. Unter zeitgleicher Doppel-Inkubation mittels Y27632 und HA steigt die Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle auf 0,011µm/min und die Gesamtmigrationsweite signifikant auf 31,1µm/ 48h, bleibt jedoch im Vergleich zu den Einzelstimulationen hinter diesen zurück. Somit ist keine Potenzierung der Einzelergebnisse bei gleichzeitiger Zugabe von Hyaluronsäure und Y27632 zu verzeichnen. Abschließend wird bei der Y27632- und HA-Doppelinkubation eine Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit um 30,1% im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt.



**Abb. 21: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie OAW42 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in µm/min:** Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632. Nach Inkubation mittels HA wird eine vergleichbare Stimulation der Geschwindigkeit beobachtet. Unter zeitgleicher Doppel-Inkubation mittels Y27632 und Hyaluronsäure steigt die Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle, sinkt jedoch im Vergleich zu den Einzelstimulationen mittels Y27632 und HA ab. Dabei stellen vier \*\*\*\* einen p-Wert < 0,0001 als Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsansätzen dar.

#### OAW42: Expression von CD44 und Ezrin unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

Die Zelllinie OAW42 zeigt nativ eine leicht membranär sowie stärker zytoplasmatisch ausgeprägte Expression von Ezrin (H) in der IF. Nach Zugabe von Y27632 erfolgt eine

deutliche Signalverstärkung der membranären Komponente mit Hervortreten plumper Pseudopodien. Auch in diesen Ausziehungen ist eine verstärkt membranäre Signallokalisation zu verzeichnen. Die zytoplasmatische Komponente zeigt keine Veränderung der Signalstärke. Nukleär ist in beiden Fällen keine Expression sichtbar. Bei der Ezrin566-Färbung erkennt man ohne Zugabe von Y27632 eine leicht membranäre und zytoplasmatische Komponente bei einer deutlich hervortretenden, nukleären Signalaktivität. Nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors ist eine Reduktion des membranständigen Ezrin-Komplexes nachweisbar. Bei Ezrin353 lassen sich keine Lokalisationsänderungen der Ezrin-Signalaktivität in den einzelnen Zellkompartimenten erkennen. Hier ist, wie bei Ezrin566, eine akzentuiert nukleäre Anreicherung neben einer leicht zytoplasmatischen Signalaktivität bei fehlendem membranären Nachweis sichtbar. Die CD44 (H), CD44v3 und CD44v6-IF weisen auch bei dieser Zystadenokarzinomzelllinie keine Unterschiede bezüglich einer Expressions- und Lokalisationsänderung nach Zugabe von Y27632 auf. CD44 (H) ist sowohl ohne als auch mit Zugabe von Y27632 lediglich im Zytoplasma nachweisbar. Gleichsam ist bei CD44v6 ebenfalls nur eine zytoplasmatische Anreicherung ersichtlich, welche aber im Vergleich zu CD44 (H) schwächer ausfällt. Konträr zeigt sich bei CD44v3 neben einer zytoplasmatischen Komponente auch eine vermehrt nukleäre Anreicherung mit teils herdförmiger Akzentuierung (siehe Tab. 12).

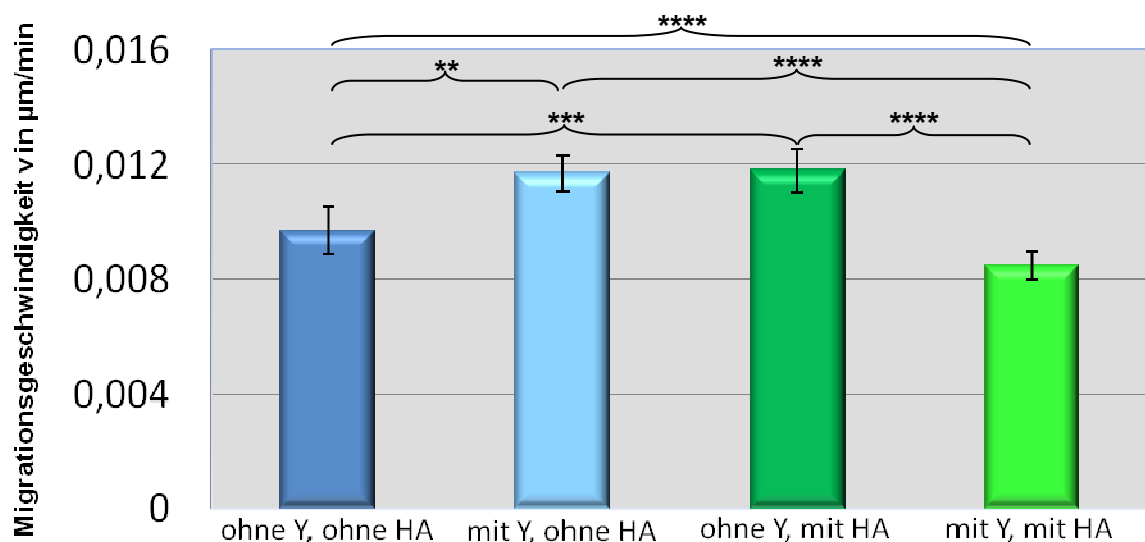
**Tab. 12:** IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie OAW42 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6

	ohne Y27632	mit Y27632
Ezrin (H)	membranär (1) zytoplasmatisch (2) nicht nukleär vorkommend (0)	membranär (2,5) zytoplasmatisch (2) nicht nukleär vorkommend (0)
Ezrin353	nicht membranär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1), nukleär (2)	
Ezrin566	membranär (1) zytoplasmatisch (1) nukleär (2)	nicht membranär vorkommend (0) zytoplasmatisch (1) nukleär (2)
CD44 (H)	zytoplasmatisch (2), nicht membranär und nukleär vorkommend (0)	
CD44v3	nicht membranär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1), nukleär (1,5)	
CD44v6	zytoplasmatisch (1), nicht membranär und nukleär vorkommend (0)	



#### 4.5 CAOV3: Migrationsverhalten unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

CAOV3 zeigt eine Migrationsgeschwindigkeit von  $0,01\mu\text{m}/\text{min}$  sowie eine Migrationsgesamtweite von  $27,94\mu\text{m}$  nach 48h-Inkubation in den Kontrollversuchen ohne Zusatz von HA und Y27632 (siehe Abb. 22). Unter Applikation des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 ist eine signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit auf  $0,0117\mu\text{m}/\text{min}$  bzw. eine maximale Migrationsweite von  $33,70\mu\text{m}$  nach 48h zu ermitteln. Dies bedeutet eine Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit um 20,6% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Zusatz von Hyaluronsäure ist ebenfalls eine Steigerung der Gesamtstrecke auf  $33,98\mu\text{m}$  und einer Migrationsgeschwindigkeit der Tumorzellen auf  $0,012\mu\text{m}/\text{min}$  erkennbar. Dies entspricht einer Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit um 21,6%. Nach zeitgleicher Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 und Hyaluronsäure ist eine Minderung der Migrationsgeschwindigkeit respektive -weite zu verzeichnen. Hierbei sinkt die Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrollpopulation auf  $0,009\mu\text{m}/\text{min}$  bzw. einer Gesamtmigrationsweite von  $24,48\mu\text{m}$ . Dies bedeutet eine Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit um 12,4% im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 22: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie CAOV3 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$ :** Es zeigt sich eine signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit nach Zugabe des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632. Nach Inkubation mittels HA wird ebenfalls eine Stimulation der Geschwindigkeit beobachtet. Unter zeitgleicher Doppel-Inkubation mittels Y27632 und Hyaluronsäure sinkt die Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Dabei stellen zwei \*\* einen p-Wert  $< 0,01$ , drei \*\*\* einen p-Wert  $< 0,001$  und vier \*\*\*\* einen p-Wert  $< 0,0001$  als Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsansätzen dar.

#### CAOV3: Expression von CD44 und Ezrin unter ROCK-Inhibitor Y27632-Zugabe

Es zeigt sich bei der Zelllinie CAOV3 eine mäßig ausgeprägt zytoplasmatische sowie membranäre Ezrin (H)-Expression unter Fehlen einer nukleären Komponente in nativer Situation im Rahmen der IF. Die Lokalisierung von Ezrin (H) in Filopodien ist nur sehr vereinzelt und rudimentär zu verzeichnen. Unter Y27632-Zugabe ist eine Verstärkung des

membranären Signals bei gleichbleibender zytoplasmatischer Aktivität ersichtlich. Im Vergleich dazu zeigt sich Ezrin353 ohne Rho-Kinase-Inhibitor nukleär sowie zytoplasmatisch, nicht aber membranständig vorkommend. Nach Y27632-Inkubation ist hier ein leichter Anstieg des IF-Signals im Zytoplasma nachzuweisen. Bei Anfärbung des Ezrin566 ist nach Y27632-Zugabe eine membranäre Depletion bzw. ein verstärktes nukleäres Signal bei gleichbleibender zytoplasmatischer Komponente im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Die CD44 (H)-, CD44v3- und CD44v6-Expression ändert sich bei ROCK-Inhibition mittels Y27632 ebenfalls nicht. CD44 (H) lässt sich im Zytoplasma sowie an der Zellmembran, nicht aber nukleär nachweisen. Das bei CD44v3 und CD44v6 zytoplasmatisch begrenzte Signal zeigt in diesen Fällen eine mittelstarke Intensität (siehe Tab. 13).

**Tab. 13:** IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie CAOV3 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6

	ohne Y27632	mit Y27632
Ezrin (H)	membranär (1) zytoplasmatisch (1,5) nicht nukleär vorkommend (0)	membranär (2,5) zytoplasmatisch (1,5) nicht nukleär vorkommend (0)
Ezrin353	nicht membranär vorkommend (0) zytoplasmatisch (1) nukleär (1)	nicht membranär vorkommend (0) zytoplasmatisch (2) nukleär (1)
Ezrin566	membranär (1) zytoplasmatisch (1) nicht nukleär vorkommend (0)	nicht membranär vorkommend (0), zytoplasmatisch (1) nukleär (1,5)
CD44 (H)	membranär (1), zytoplasmatisch (1,5), nicht nukleär vorkommend (0)	
CD44v3	zytoplasmatisch (1,5), nicht membranär und nukleär vorkommend (0)	
CD44v6	zytoplasmatisch (1,5), nicht membranär und nukleär vorkommend (0)	

#### 4.6 Migrationsverhalten der Tumorzelllinien im Überblick

Die oben einzeln dargestellten fünf Ovarialkarzinomzelllinien zusammenfassend betrachtet zeigt sich eine Gruppierung in zwei durch den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 gehemmte Tumorzelllinien mit SKOV3 und ES2 sowie drei aktivierte Tumorzelllinien mit OVCAR3, OAW42 und CAOV3. Dabei wird durch die Y27632-Inkubation nicht nur eine

Verminderung der maximalen Migrationsweite hervorgerufen, sondern auch eine teils deutliche Minderung (SKOV3) bzw. deutliche Aktivierung (OVCAR3) der Migrationsgeschwindigkeit. So zeigt die Zelllinie ES2 im Vergleich zur nativen Situation ohne Y27632- bzw. Hyaluronsäure-Zugabe eine Minderung der Migrationsweite auf 68,4% unter Rho-Kinase-Inhibitor-Inkubation und Hemmung am Ezrin Molekül. Die Migrationsgeschwindigkeit fällt hierbei um 32% ab. Im Falle einer Hyaluronsäure-getriggerten ES2-Einzelzellmigration zeigt sich eine Verringerung der Zellaktivität auf bis zu 81,3%. Bei zeitgleicher Y27632 und HA-Inkubation ist eine Reduktion der maximalen Migrationsstrecke auf 69,9% im Vergleich zur nativen Situation ersichtlich. Bei der Tumorzelllinie SKOV3 ist eine weitaus stärkere Inhibition mit simultanem Verschwinden von Pseudopodien und Zell-Zell-Interaktion unter Y27632-Inkubation zu verzeichnen. Hier wird die maximale Migrationsstrecke auf 45,3% im Vergleich zur Nativsituation gesenkt und die Migrationsgeschwindigkeit auf unter die Hälfte reduziert. Bei Zugabe von Hyaluronsäure ist sogar eine Minderung auf 8,4% der originären Migrationsweite nachweisbar. Dieses Ergebnis wird bei zeitgleicher Y27632 und HA-Inkubation noch übertroffen. Hier werden lediglich Migrationsgeschwindigkeiten und -weiten von ca. 6,7% erreicht. Somit zeigt sich bei beiden Zelllinien eine Hemmung der Migrationsaktivität über den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 bei Interaktion mit dem ERM-Komplex und Dephosphorylierung des Ezrin-Moleküls. Diese Wirkung wird ebenfalls durch die Inkubation mittels Hyaluronsäure erreicht. Hierbei erfolgt ein Herabsetzen der Interaktion mit dem transmembranären CD44-Molekül und einer dadurch gesenkten Migrationsaktivität.

Dem entgegen steht die Aktivierung der Tumorzellmigration bei den oben erwähnten drei Zelllinien. Hierbei ist die Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR3 hervorzuheben, welche eine deutliche Steigerung der Migrationsweite und -geschwindigkeit von 158,3% unter ROCK-Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweist. Dieses Ergebnis ist auch unter HA-Applikation mit 155,7% erreichbar. Bei zeitgleicher Y27632- und HA-Zugabe ist die Verdopplung der Migrationsgeschwindigkeit und eine Steigerung der Migrationsweite auf 206,3% im Vergleich zum nativen Migrationsassay der OVCAR3-Zelllinie möglich (siehe Tab. 14/15).

Tab. 14: Gesamtmigrationsweiten in  $\mu\text{m}$  über die Versuchsdauer von 48h

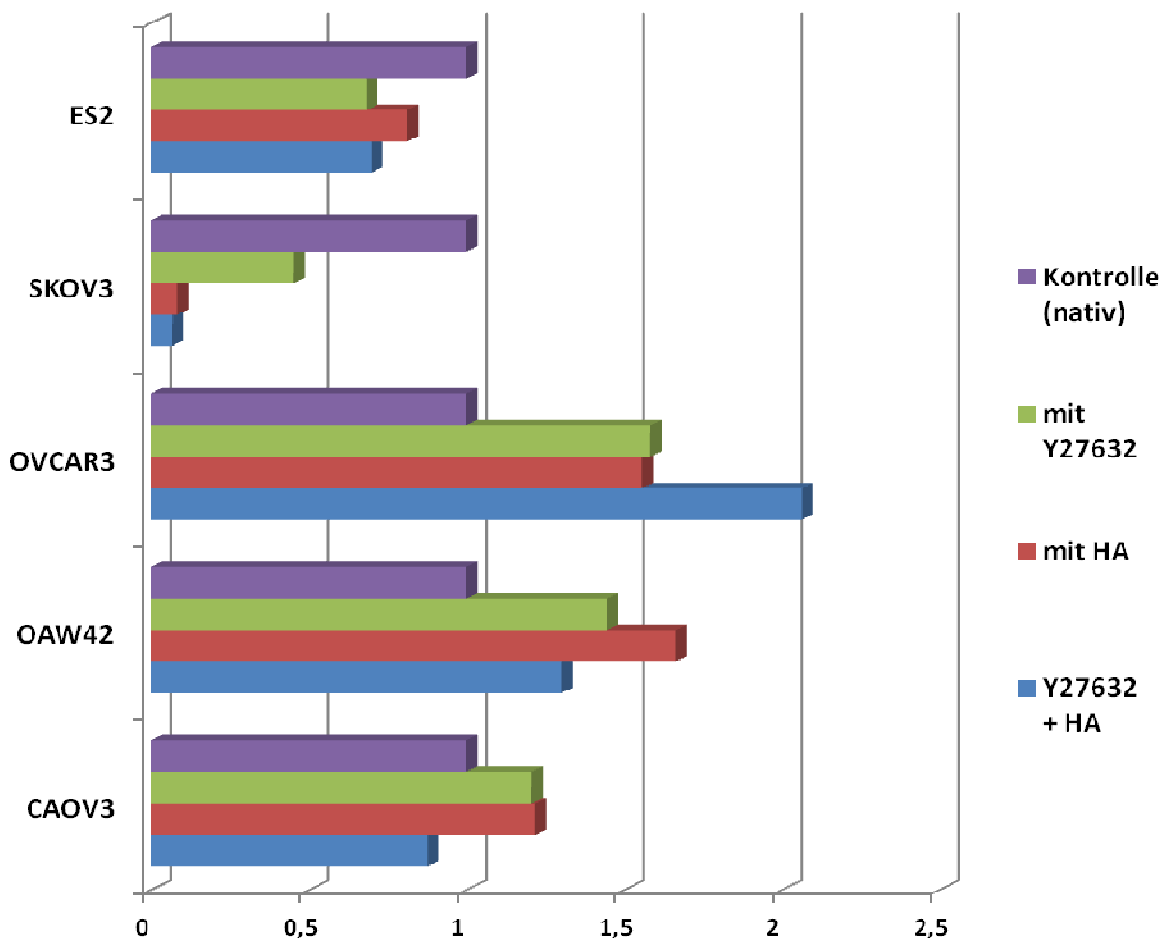
	Kontrolle (nativ) in $\mu\text{m}$	mit Y27632/ ohne HA in $\mu\text{m}$ (% zur Kontrolle)	ohne Y27632/ mit HA in $\mu\text{m}$ (% zur Kontrolle)	mit Y27632/ mit HA in $\mu\text{m}$ (% zur Kontrolle)
ES2	95,62	65,38 (68,4)	77,76 (81,3)	66,82 (69,9)
SKOV3	573,12	259,49 (45,3)	48,10 (8,4)	38,30 (6,7)
OVCAR3	22,75	36,00 (158,3)	35,42 (155,7)	46,94 (206,3)
OAW42	23,90	34,56 (144,6)	39,74 (166,3)	31,10 (130,1)
CAOV3	27,94	33,70 (120,6)	33,98 (121,6)	24,48 (87,6)

Tab. 15: Schematische Darstellung der Änderung des Migrationsverhaltens

	mit Y27632	mit HA	Y27632 + HA	statistische Darstellung der Migrationsweiten/min
ES2	↓	-	↓↓	↓ = Senkung mit $p < 0,05$ ↓↓ = Senkung mit $p < 0,01$ ↓↓↓ = Senkung mit $p < 0,001$ ↓↓↓↓ = Senkung mit $p < 0,0001$ ↑ = Steigerung ohne $p < 0,05$ ↑↑ = Steigerung ohne $p < 0,01$ ↑↑↑ = Steigerung ohne $p < 0,001$ ↑↑↑↑ = Steigerung ohne $p < 0,0001$
SKOV3	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	
OVCAR3	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	
OAW42	↑↑↑↑	↑↑↑↑	↑↑↑↑	
CAOV3	↑↑	↑↑↑	↓↓↓↓	

Zusätzlich zu erwähnen ist der vermehrte lichtmikroskopische Nachweis von Pseudopodien und Zell-Zell-Interaktion nach Y27632- und HA-Inkubation, welche in der IF eine verstärkte Ezrin-positive, membranäre Signalaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. Die Tumorzelllinie OAW42 zeigt eine deutliche Erhöhung der Migrationsweite um 44,6% unter Y27632-Zugabe. Nach HA-Stimulation ist eine Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit um 66,3% nachweisbar. Im Vergleich zur verstärkten Migrationsweite und -geschwindigkeit im Falle von OVCAR3 ist bei zeitgleicher Stimulation mittels Rho-Kinase-Inhibitor und Hyaluronsäure bei der Zelllinie OAW42 nur eine Erhöhung um 30,1% im Vergleich zur Kontrollgruppe ersichtlich. Sowohl OAW42 und CAOV3 bilden sehr selten Pseudopodien in der nativen Situation aus, unter Stimulation mittels Y27632 und/oder HA sind diese nur geringfügig vermehrt. So zeigt CAOV3 ebenso wie die beiden zuvor

genannten Zelllinien eine Steigerung der Migrationsaktivität unter Y27632 auf 120,6% und unter HA auf 121.6% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bemerkenswert ist jedoch die Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit und –weite bei zeitgleicher Y27632- und Hyaluronsäure-Zugabe nicht nur auf Werte im Rahmen der Einzelstimulationen sondern eine Reduktion der Migrationsaktivität auf 87,6% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zusammenfassend ist bei zwei der fünf Tumorzelllinien (ES2 und SKOV3) eine Hemmung der Migrationsaktivität mittels Y27632 zwischen 20% - 90%, meist im Bereich von 40%, im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. Im Falle von drei der fünf Zelllinien (OVCAR3, OAW42 und CAO3) ist eine Steigerung des Migrationsverhaltens bei ROCK-Inhibition ersichtlich. Dabei sind bei Inkubation mittels Y27632 oder Hyaluronsäure jeweils signifikante Steigerungen der Migrationsaktivität zu verzeichnen. Auch unter Doppelstimulation tritt diese Wirkung auf. Lediglich bei CAO3 kommt es unter Doppelstimulation mit HA und Y27632 zu einer Hemmung, was an einer direkten Hemmung der zwei Pathways über den CD44-ERM-Komplex bei ROCK-Inhibition und den CD44-HA-Komplex zu erklären ist (siehe Abb. 23).



**Abb. 23: Prozentuale Darstellung der Gesamtmigrationsweite der Zelllinien nach 48h:** Unterschied zwischen den gehemmten Zelllinien ES2 und SKOV3, sowie den aktivierten Zelllinien OVCAR3, OAW42 und CAO3. Dabei wurden die nativen Migrationsmittelwerte jeder Zelllinie = 100% gesetzt und die anderen Versuchsansätze prozentual damit verglichen.

#### 4.7 IF-Nachweis der Proteine und deren Spleißvarianten nach Y27632-Inkubation

Bei Untersuchung der für die Tumorzellmigration notwendigen membranären Ezrin-Aktivität zur Phosphorylierung und Aktivierung des ERM-Komplexes zeigt sich hierbei in der Immunfluoreszenz eine Signalabschwächung der Selbigen unter Y27632-Zugabe bei den Zelllinien ES2 und SKOV3. Hierbei ist der Nachweis einer membranären Depletion des Ezrin (H), respektive Ezrin566, mit fehlender Phosphorylierung des ERM-Komplexes bei zeitgleicher Zunahme der zytoplasmatischen Komponente ersichtlich. Dies hat eine anschließende Hemmung der Migrationsaktivität bei ursprünglicher maximaler Migrationsweite und -geschwindigkeit. Zudem ist ein neben dem generellen Verlust der Expression von Ezrin (H) in den Pseudopodien auch eine Reduktion der Signalstärke von membranärem und zytoplasmatischem Ezrin566 nachweisbar.

Bei OVCAR3, OAW42 und CAO3V3 hingegen stellt sich eine Verstärkung des membranären Ezrin-Expressions-Signals nach Y27632-Zugabe ein. Dies ist mit der in der Einzelzellmigration beobachteten Motilitätssteigerung vereinbar, da durch die membranäre Ezrin-Lokalisationsanreicherung eine verstärkte und zielgerichtete Migration der Tumorzellen ermöglicht wird. Die erhöhte membranäre Ezrin-Expression bedeutet in diesem Falle eine vermehrte Anzahl phosphorylierbarer Rezeptoren, welche wiederum mit mehreren transmembranären CD44-Aktin-Molekülen interagieren und diese aktivieren können. Die in der Einzelzellmigration ermittelten Hemmungen und Aktivierungen der Migrationsaktivitäten der Tumorzelllinien lassen sich mit den Lokalisationsänderungen von Ezrin bzw. CD44 in der Immunfluoreszenzuntersuchung bekräftigen und zeigen sich dabei als nahezu vollständig kongruent. (siehe Tab. 16 und Tab. 17).

**Tab. 16:** Hauptlokalisationsorte der Proteine Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6 nach Rho-Kinase-Inhibition mit Y27632 und dessen unterschiedliche Gewichtung

**Legende:** m = membranär, n = nukleär, c = zytoplasmatisch, **fett** = verstärkt

	<b>Ezrin (H)</b>	<b>Ezrin 353</b>	<b>Ezrin 566</b>	<b>CD44 (H)</b>	<b>CD44v3</b>	<b>CD44v6</b>
<b>ES2</b>	m, c	c, n	m, c	m, c	c, n	c
<b>SKOV3</b>	m, c	c, n	m, c	m, c	c, n	c
<b>OVCAR3</b>	m, c	c, n	m, c	<b>m, c</b>	c, n	c
<b>OAW42</b>	<b>c, m</b>	c, n	m, c, n	c	c, n	c
<b>CAOV3</b>	m, c	c, n	m, c	m, c	c	c

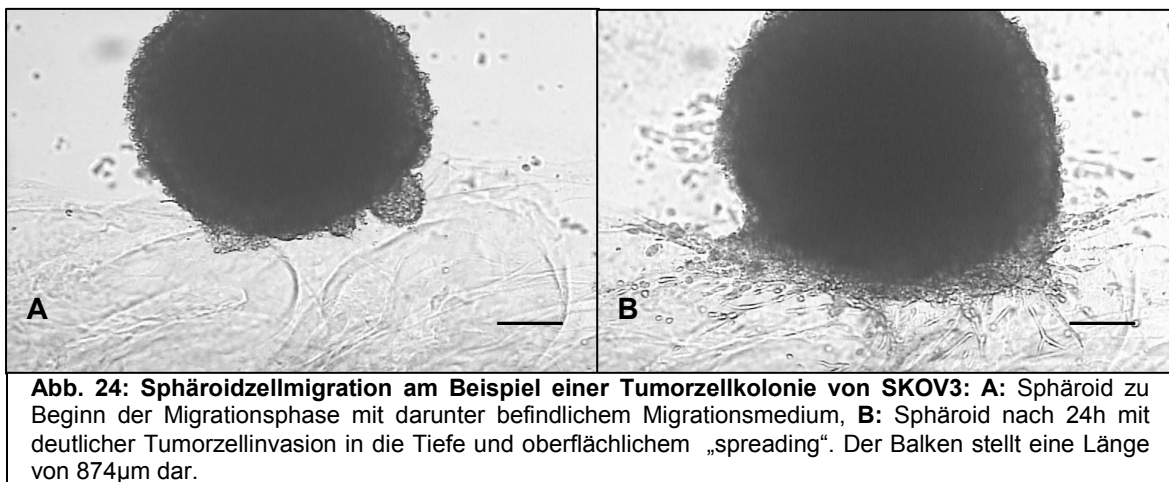
**Tab. 17:** Übersicht der Y27632-Signalaktivität der Tumorzelllinien bei Ezrin (H), Ezrin353 und Ezrin566

	<b>Ezrin</b>	<b>353</b>	<b>566</b>
<b>ES2</b>	m↓	∅m	m↓
<b>SKOV3</b>	m↓	m ↓	m↓
<b>OVCAR3</b>	m↑	∅m	m↑, n↑
<b>OAW42</b>	m↑	∅m	m↑
<b>CAOV3</b>	m↑	∅m	m↑, n↑

**Legende:** m↓= membranäre Dislokation der Ezrin-Moleküle unter Zugabe von Y27632  
m↑= membranäre Mehranreicherung der Ezrin-Moleküle bei Zugabe von Y27632  
∅m= keine membranäre Komponente und keine Änderung

#### 4.8 Sphäroidzellmigration der Zelllinie SKOV3

Im Rahmen der Sphäroidzellversuche der Zelllinie SKOV3 zeigt sich das für Tumorzellen charakteristische, invasive Verhalten. Dabei imponierten die selbstständige Separation von Einzelzellen aus dem Tumorverband und deren zielgerichtete Migration ins vorbe-stehende Medium. Nachdem anfänglich nur wenige Einzelzellen migrieren, ist nach 16 Stunden eine vermehrte Tumorzellinvasion, sowie das oberflächliche „spreading“ (Auseinanderlaufen) des Sphäroiden zu beobachten. Ebenfalls kann eine Migration von nachfolgenden Karzinomzellen im Verlauf des Weges einer zuvor invasiven Tumorzelle nachgewiesen werden.



Im Rahmen des Versuches mittels einer HOSE-Zellschicht als Endothel-„Imitat“ zwischen Tumorsphäroid und Medium wird eine mehrlagige Zellschicht, entgegen der angestrebten Einzel- bzw. Doppellagenschicht, erreicht. Auch hier zeigt sich eine gerichtete Migration. Über verlängerte oder veränderte Invasionszeiten/-kriterien lassen sich keine signifikanten Aussagen über das Tumorverbandverhalten erzielen. Aufgrund stark schwankender HOSE-Zelllagen und keines sicher repetierbaren Versuchsansatzes werden weitere Versuchsansätze unter Rho-Kinase-Inhibitor-Inkubation durchgeführt. Es finden weitere experimentelle Versuche zum Konzipieren einer HOSE-Einzellagenschicht zwischen Medium und Tumorzellsphäroid statt.

## **5 Diskussion**

Epitheliale Ovarialkarzinome sind aggressive Tumoren mit bereits hämatogener bzw. lymphogener Aussaat in drei von vier Fällen (Frickhofen und du Boist, 2007). Im Rahmen ihrer peritonealen Metastasierung spielt die Wechselwirkung des transmembranären CD44-Moleküls als Promoter des Aktin-Zytoskeletts, der intrazellulären Hyaluronsäure und dem ERM-Komplex zwischen Tumorzelle und Mesothel eine wichtige Rolle. Das transmembranäre CD44-Molekül wird über den phosphorylierten ERM-Komplex am kontraktile Zytoskelett der Zelle gebunden (ähnlich wie E-Cadherin durch  $\beta$ -Catenin). Dabei stellte sich die Frage einer Veränderung des Migrationsverhaltens durch Modulation des ERM-Komplexes bei Hemmung der Rho-Kinase-Phosphorylierung mittels ROCK-Inhibitor Y27632. Ziel der Arbeit war es daher die Wechselwirkung zwischen Rho-Kinase, ERM-Komplex und CD44-Molekül zu analysieren und aufzuzeigen, in welcher Form eine Inhibition von ROCK die Migrationseigenschaften von Ovarialkarzinomzellen verändert.

### **5.1 Ovarielle Karzinogenese und extrazelluläre Matrix: *in-vivo*-Situation**

Kwon et al. zeigten, dass verschiedene Adhäsionsmoleküle und Proteasen Teil der Zellmatrix von Ovarialkarzinomen und grundlegend für die dadurch bedingte Migration, Endothelpenetration und Invasion sind (Kwon et al. 2011). Es wurde (ähnlich unseres Versuchsprotokolls) die Invasion bzw. Eindringtiefe von zwölf verschiedenen ovariellen Karzinomzelllinien in ihrer EZM erforscht. Dabei differenzierte man zwischen den zwei Adenokarzinomzelllinien OVCAR5 bzw. OVCAR10 (Eckrich und Sauter, 2011). OVCAR5-Zellen bauten im Rahmen ihrer Invasion die umliegende Matrix ab, während OVCAR10-Zellen lediglich eine Migration in der Matrix zeigten, ohne diese jedoch zu verändern oder abzubauen.

Weiterhin unterschied man Zelllinien mit epithelialen und mesenchymalen Ursprung. Die Zellen mit epithelialer Herkunft migrierten innerhalb der EZM unter Nutzung von Proteasen und Zell-Zell-Interaktionen. Dem entgegen nutzten mesenchymale Zellen Matrizen über modifizierte Rho Serin/Threonin-Kinasen (ROCK) ohne Zell-Zell-Wechselwirkungen. So entstand durch die ROCK-Inhibition bei Tumorzellen ein multipolar-dendritischer und sessiler Phänotyp. Im Gegenzug dazu wurde beispielsweise bei Hemmung des Proteins Rac ein rundlicher, aber ebenfalls apolarer und sessiler Phänotyp induziert. Entsprechend dieser Wechselwirkungen zeigte sich, dass ROCK für Kontraktilität und Retraktion bei mesenchymalen Tumorzellen verantwortlich ist (Friedl, 2010).



In der vorliegenden Arbeit wurde das Migrationsverhalten bei fünf Ovarialkarzinomzelllinien untersucht. Dabei führte die Hemmung der Rho-Kinase-Aktivität durch den ROCK-Inhibitor Y27632 zu einer signifikanten Migrationshemmung im Falle von SKOV3 und ES2.

Neben einer Verminderung der Gesamtmigrationsweite zeigte sich in beiden Fällen ebenfalls eine verminderte Zellmotilität und Ausbildung von Pseudopodien. Zusätzliche IF-Untersuchungen wiesen hierbei durch Y27632-Inkubation eine Lokalisationsänderung der migrationsverantwortlichen Ezrin-Moleküle von membranär nach zytoplasmatisch nach. Bei den anderen drei Ovarialkarzinomzelllinien (OVCAR3, OAW42 und CAOV3) zeigte sich eine Migrationsaktivierung der Einzelzellen durch Y27632-Zugabe und Blockierung der ROCK. Zudem wurden nach ROCK-Hemmung vermehrt membranäre Ezrin-Moleküle unter Y27632 nachgewiesen. Somit war die konträre Reaktion bei Hemmung der gleichen Rho-Kinase wie bei ES2/ SKOV3 durch vermehrte Modulation weiterer ERM-Komplexes bei gesteigerter Tumorzellmigration zu beobachten. Insgesamt zeigen sowohl die Versuche von Kwon et al. im Fall von Rac, etc., als auch unsere Versuchsreihen mit Inhibition von ROCK, dass verschiedene Zellmembraninteraktionen über Rho-Kinasen oder andere Proteinkomplexe (Rac, etc.) zwischen einzelnen ovariellen Tumorzellen bzw. den Tumorverbänden möglich sind. Durch Inhibition der Phosphorylierung respektive Aktivierung des entsprechenden Proteinkomplexes kommt es zur Hemmung der Migrationskaskade und somit zur Reduktion der Motilität.

## **5.2 Neuordnung („Remodelling“) der Ezrin-Molekül-Lokalisation nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 und dessen Bedeutung für die Zelllinien ES2 und SKOV3**

Im Rahmen der Tumorzellmigration gibt es verschiedene Modelle, welche sich neben Kalzium-gestützter Migration auch mit der Rho-Kinase(ROCK)-induzierten Fortbewegung beschäftigen. Arbeiten von Horiuchi et al. und Lee et al. zeigten, dass eine Phosphorylierung des N-terminalen-ERM-Komplexes mittels Rho-Protein zur gesteigerten Zellmigration und Aktivierung des Aktin-Zytoskelettes führt. Induziert wird dieser Vorgang durch eine Rho-Kinase-bedingte Phosphorylierung des intrazytoplasmatisch gelegenen Ezrin-Moleküls. Dieses wird von einer inaktiven („coiled“) in eine gestreckte, aktive Form umgewandelt. Somit ist eine Interaktion des N-terminalen-Pols mit dem transmembranären CD44-Molekül, welches wiederum mit den intrazellulären Aktin-Molekülen interagiert, gegeben. Bei Inhibition der ROCK durch Y27632 erfolgt keine Phosphorylierung des Rho-Proteins, keine Konformationsänderung der Ezrin-Komponente, eine fehlende Aktivierung des ERM-Komplexes sowie schlussendlich keine ERM-CD44-Aktin-Interaktion (Horiuchi et al., 2008; Lee et al., 2008).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind nur wenige Daten bekannt, die den Zusammenhang zwischen dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 und der Migration von ovariellen Tumorzellen belegen. Von Lee et al. wurde die Wirkung von Lysophosphatidessigsäure (LPA), welche vermehrt im Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen vorkommt, auf den Wirkkomplex des Rho-A-Moleküls untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Hemmung der Rho-A-Moleküle durch Y27632 trotz LPA-induzierter Tumorzellmigration, was darauf schließen lässt, dass durch Inhibition der ROCK multiple Reaktionskaskaden wie z.B. über ERM-Komplex oder LPA in der Tumorzellmigration getriggert werden. Weiterhin wurde eine Phosphorylierungs-Inhibition mit vermehrter intrazellulärer Calciumanreicherung als Ursache einer Migrationshemmung postuliert (Lee et al., 2008)

In einer weiteren Arbeit von Jeon et al. konnte ebenfalls die Wirkung von LPA unter Hemmung durch Y27632 bei mesenchymalen Stammzellen (hASCs) bestätigt werden. Auch hier zeigte sich eine Senkung der Migrationsaktivität im Bereich des Rho-A-Proteins nach Zugabe des ROCK-Inhibitors und eine verminderte Invasivität der Tumorzellen (Jeon et al., 2010).

Bei der Publikation von Horiuchi et al. wurde die Komplexität der Proteinstruktur des Rho-A-Moleküls im Zellverbandsmodell („Sphäroid“) betrachtet. Die Daten zeigten, dass Rho-A ein wichtiger Faktor in der Neuorganisation, Regulation und Interaktion des Zytoskeletts ist (Horiuchi et al., 2008). Aus vorangegangenen Arbeiten von Horiuchi et al. weiß man, dass eine Überexpression von Rho-A-Molekülen in Ovarialkarzinomzellen sowie im Aszites von Ovarialkarzinom-Patientinnen zu finden ist. In der neuesten Studie von Horiuchi wurde „das aggressiv biologische Verhalten von Rho-A“ nach Y27632-Zugabe an der Zelllinie SKOV3 *in vivo* und *in vitro* untersucht (Horiuchi et al., 2008). Dabei zeigte sich eine erhöhte Invasivität *in vitro* bei gleichbleibender proliferativer Aktivität nach Rho-Protein-Aktivierung. Nach Zugabe von Y27632, Lovastatin, Pravastatin oder C3-Exoenzym konnte jeweils eine signifikante Unterdrückung der Invasivität sowie der Migrationsaktivität der Tumorzelllinie SKOV3 festgestellt werden (Horiuchi et al., 2008).

Die Verbindung des ERM-Komplexes mit dem transmembranären CD44-Molekül, dessen Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung durch das Rho-A-Protein erfolgt, spielen eine wichtige Rolle im Zellmechanismus und bei der gezielten Migration von Tumorzellen. In der vorliegenden Dissertation zeigte sich ebenfalls eine signifikante Hemmung der Migration bei zwei Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV3, ES2) durch ROCK-Inhibition. Bei den anderen drei untersuchten Zelllinien (OVCAR3, OAW42, CAO3) führte die Rho-Kinase Hemmung durch Y27632 zu einer signifikanten Steigerung des Migrationsverhaltens. Äquivalent zu Ohtani et al., Bretscher et al. und Hirao et al. kamen Han et al. zu dem Schluss, dass ROCK durch Inhibition am C-terminalen Ende des ERM-Komplexes eine entscheidende Rolle in der Invasion und Metastasierung von Ovarial-

karzinomen spielt (Hirao et al., 1996; Bretscher et al., 1999; Ohtani et al., 2002; Han et al., 2007). Letztendlich konnte in der vorliegenden Dissertation, vergleichbar zu der Arbeit von Horiuchi et al., eine Hemmung der Migrationsstrecke der Zelllinie SKOV3 durch Inhibition mittels Y27632 auf unter 50% nachgewiesen werden. Zudem war eine Minimierung der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit von 0,20µm/min auf 0,09µm/min zu verzeichnen. Hierbei fielen eine verringerte Ausbildung von Pseudopodien und eine verminderte Kontaktaufnahme zu benachbarten Einzelzellen auf.

Weiterhin zeigten sich signifikante Ergebnisse bei der Inhibition der Ovariakarzinomzelllinie ES2 durch Y27632. Auch hier konnte eine Hemmung der Gesamtmigrationsweite nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Wirkung des Rho-Kinase-Inhibitors Y27632 in Tumorzellverbänden wurden die bei der Einzelzellmigration signifikant inhibierbaren Zelllinien SKOV3 und ES2 zur Sphäroidzellmigration herangezogen. In einzelnen Versuchen mit SKOV3-Zellen ohne HOSE-Endothelwischenschicht zeigte sich nach Y27632-Zugabe eine verringerte Invasionsgeschwindigkeit und Migrationsaktivität der Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle ohne ROCK-Inhibitor. Somit war auch im Sphäroidmodell eine Minderung der Invasion und Hemmung der Migrationsaktivität einzelner Ovariakarzinomzelllinien zu verzeichnen.

Horiuchi et al. zeigten wiederum, dass ein Bi- bzw. Multilayerstadium der Endothelwischenschicht die Stoffwechselprozesse der Tumorzellen hemmt, somit die Zellproliferation verschlechtert und zur Apoptose der Zellen während der Invasion führen kann (Ahn et al., 2004; Horiuchi et al., 2008). Derartige Versuchsansätze sollen in nächster Zukunft in weiteren Experimenten Anwendung finden.

### **5.3 Nachweis und Lokalisationsänderung des Ezrin-Moleküls unter Y27632-Zugabe bei ES2 undSKOV3-Zellen in der IF**

Die Interaktion zwischen ROCK und ERM-Molekül mit Phosphorylierung und Aktivierung des Komplexes und einer ROCK-Inhibition durch Y27632 sollte in der IF überprüft werden. Die Inhibition der Rho-Kinase führt zu einer Lokalisationsänderung des Ezrin-Moleküls nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 mit Reduktion der membranären und Steigerung der zytoplasmatischen Komponenten (Köbel et al., 2006). Zudem ist ein Verlust der Expression von membranärem Ezrin in den für die Zell-Zell-Interaktion verantwortlichen Pseudopodien nachweisbar. Die fehlende Phosphorylierung bedingt dabei eine Ablösung des Ezrin-Moleküls von der Zellmembran und einem Übergang in frei im Zytoplasma vorkommende ERM-Komplexe.

Bei SKOV3 und ES2 ergaben sich im Rahmen dieser Dissertation nach Inhibition von ROCK durch Y27632 eine Abschwächung des membranären Signals und eine

Verstärkung der zytoplasmatischen Ezrin-Signale im Vergleich zu Kontrolle. Diese Lokalisationsänderung wurde erstmals in der Arbeit von Fakharzadeh erwähnt. Auch unter Zugabe von Hyaluronsäure kann diese Herunterregulation nachgewiesen werden (Fakharzadeh et al., 1991). Somit war bei Rho-Phosphorylierungshemmung der beiden Zelllinien mittels Y27632 von einer Hemmung der Molekülkonversion des ERM-Komplexes und einem damit verbundenen Ablösen des Molekülverbandes vom transmembranären CD44-Molekül und Unterbrechung der ROCK-CD44-Aktin-Motilitätskaskade auszugehen (Isacke, 1994). Das aus der Membran gelöste Ezrin zeigte eine zytoplasmatische Anreicherung. Daneben erkannte man nach ROCK-Inhibition ein partiell membranäres Restsignal von Ezrin, welcher auf die desmosomalen Zellinteraktionsstrukturen zurückzuführen ist (Kurrey et al, 2005). Inaktives, nicht-phosphoryliertes Ezrin senkt somit die Migrationsaktivität der Zelle (Machesky et al., 1996). Das CD44-Molekül wurde, wie aus der vorliegenden Dissertation ersichtlich, nicht in seiner Lokalisation verändert. Wie auch bei Shiozaki et al. zeigten die Untereinheiten CD44v3 und CD44v6 keine Lokalisationsänderung vom membranären zum zytoplasmatischen Kompartiment aufgrund einer fehlenden ROCK-Hemmung und Inhibition durch Y27632 (Shiozaki et al., 2011). Bei Tumorsphäroiden war verstärkt ein membranäres Ezrin-Signal an den Zellgrenzen sichtbar, was auf eine vermehrte Kommunikation der Zellen zwischen einander schließen ließ. Nach Y27632 zeigte sich auch hier eine Abschwächung des membranären Signals mit einer damit verbundenen Herunterregulation der Zell-Zell-Interaktion (Nariyuma et al., 2000).

#### **5.4 Steigerung der Migrationsaktivität von OVCAR3, CAOV3 und OAW42 durch Y27632**

Entgegen der Migrationshemmung bei SKOV3 und ES2 zeigten die Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR3, OAW42 und CAOV3 eine Steigerung der Proliferation nach Inkubation mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y27632. Ebenso war bei der videoanalytischen Betrachtung der drei Zelllinien eine erhöhte Ausbildung von Zellfortsätzen und Interaktionen mit benachbarten Tumorzellen sichtbar. Diese Situation war bei der ROCK-Inhibition mittels Y27632 sowie bei der HA-Zugabe zu verzeichnen. Durch fehlende Phosphorylierung des ERM-Rezeptors im Falle von Y27632 bzw. Zugabe von HA bei OVCAR3 kam es zu einer Verstärkung des PKC-Signaltransduktionsweges mit Aktivierung des CD44-Moleküls und Steigerung der Migration (Ween et al., 2011). Zudem ließ sich Ezrin566 in der IF verstärkt nukleär nachweisen, was auf eine Aktivierung der Phosphorylierungsstelle zurückzuführen war.

In den Publikationen von Han et al. wurden verschiedene Zelllinien auf Migrationsaktivitätsänderungen durch Rho-Kinase-Inhibitoren hin untersucht, darunter auch die

Zelllinie CAOV3. Es zeigte sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch unter ROCK-Inhibition ein vergleichbares Verhalten bezüglich Adhäsion, Invasion und Proliferation. Eine Reduktion oder Steigerung der Tumormotilität unter ROCK-Inhibition ließen sich hierbei nicht nachweisen (Han et al., 2007). In unserem Falle konnten wir zeigen, dass nach Inkubation der CAOV3-Zellen mit Y27632 eine signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit um 21 % vorliegt. So erfolgte die direkte intrazelluläre Hemmung der ROCK-Phosphorylierung sowie die Inhibition des Ezrin-Moleküls durch den ROCK-Inhibitor Y27632 bei Verbleib des ERM-Komplexes in seine „coiled“-Form. Im Fall von Han et al. wurde eine Transfektion mit einem Rho-Plasmid aus dominant negativer Rho-Kinase durchgeführt, welches die Menge des Rho-Proteins veränderte, jedoch keine Auswirkungen auf die funktionellen Einheiten und deren freie Bindungsstellen hatte (Ishizaki et al., 1997). Somit könnte ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse bei Han et al. und der vorliegenden Arbeit in der in unserem Falle direkten Veränderung der „binding domain“ mittels ROCK-Inhibitor Y27632 liegen. Bei der Tumorzelllinie OAW42 war ebenfalls eine Steigerung der Gesamtmigrationsweite unter Y27632-Gabe ersichtlich. In dem mit HA versetzten Versuchsmodell wurde die Migrationsweite jedoch gehemmt. Somit war keine Potenzierung der Einzelergebnisse bei gleichzeitiger Zugabe von Hyaluronsäure und Y27632 zu verzeichnen.

In einer weiteren Arbeit von Hurst et al. 2009 wurde die Wirkung von LPA-Stimulation bei SKOV3 und CAOV3 auf eine Zellaktivitätsänderung untersucht. Hierbei zeigten sich, wie schon bei Lee et al., divergierende Ergebnisse zwischen den beiden Tumorzelllinien. Während eine Aktivierung von CAOV3 durch gesättigte und ungesättigte LPA Spezies erfolgt, wurde bei der SKOV3-Linie eine verminderte Wirksamkeit der gesättigten LPA festgestellt. Wichtigstes Differenzierungsmerkmal in Bezug auf die Zellmotilität und Zellwachstum war die Abhängigkeit der Tumorzelllinie SKOV3 von LPA-stimulierten G-Proteine im Vergleich zur Notwendigkeit eines ROCK-geführten Reaktionsweges über p160 bei CAOV3 (Lee et al., 2008; Hurst und Hooks, 2009). Diese Erkenntnis des G-Protein-abhängigen, LPA-stimulierten Zellwachstums in SKOV3-Zellen stützte unsere These über verschiedene, nebeneinander bestehende Signalkaskaden der einzelnen Zelllinien und damit eine unterschiedliche Beeinflussung dieser Regulationsvorgänge. Auch eine Studie von Zhao et al. stellte die Zusammenhänge der spezifischen Rho C-Expression in humanen Ovarialkarzinomen und seine Wirkung auf die Expression von vascular endothelial growth factor, Rho-Kinasen, und Metallo-Matrix-Proteinasen heraus. Dabei wurden Gewebeproben von unauffälligen Ovarien, gutartigen ovariellen Tumoren und epithelialen Tumoren gesammelt. Hier zeigte sich, dass die Expression von Rho-C, ROCK, VEGF und MMP9 in Ovarialkarzinomen signifikant höher ist als in unauffälligen ovariellen Geweben oder benignen Ovarialtumoren. Die Rho-C-Expression korrelierte

dabei positiv mit der ROCK-, VEGF- und MMP9-Expression. Eine verminderte Rho-C-Expression hemmte die Invasions- und Migrationsfähigkeit von Tumorzellen und führte außerdem zu einer Hemmung von ROCK, VEGF, und MMP9. Hierbei wurde, wie in unserem Falle, durch die fehlende Phosphorylierung einer Rho-Kinase und folglich fehlende Aktivierung des ERM-Komplexes eine Aktivierung des Aktin-Zytoskeletts nachgewiesen (Zhao et al., 2010).

Entsprechend den Migrationsergebnissen von Zhao et al. stellten sich in dieser Arbeit in der IF Lokalisationsänderungen des Ezrin-Moleküls nach Y27632-Zugabe dar. In allen drei Tumorzelllinien wurde eine membranäre Anreicherung des Ezrin (H) und dessen Untereinheiten Ezrin353 bzw. Ezrin566 nach Inkubation mit Y27632 beobachtet. Ebenfalls war der gleichbleibende zytoplasmatische Ezrin-Anteil bei vermehrter membranärer Ezrin-Komponente bei OVCAR3, OAW42 und CAO3 zu beobachten. Dies konnte durch eine mögliche Strukturänderung von gebundenem, nicht aktiviertem zu einem gestreckt-aktiviertem ERM-Komplex mit freier Phosphorylierungsstelle erklärt werden. Ein Überangebot dieser freien Ezrin-Bindungsstellen könnte in weiteren Versuchsmodellen als Angriffspunkt für Proteine bzw. Substanzen zur Störung des Tumorzellzyklus bis hin zur möglichen Apoptoseaktivierung eine Rolle spielen (Wenham et al., 2002, Solinet et al., 2013).

### **5.5 Reduktion und Inhibition der Tumorzellmigration**

In einer Arbeit von Sugimoto et al. wurde die „Wechselwirkung zwischen dem Rho-Protein, der Rac-Äquivalente und der Lysophosphatidessigsäure“ untersucht (Sugimoto et al., 2006). Es sollte eine mögliche Überexpression von ROCK und der damit verbundenen Überstimulation und Hemmung der bekannten Migrationssteigerung unter LPA-Wirkung bestätigt werden. Dabei kam man zu dem Schluss, dass eine alleinige Aktivierung der Rho-Kinase ohne Modulation weiterer Proteine nicht zu einer Hemmung der Zellmigration ausreicht. Umgekehrt imitierte die Anwesenheit einer dominierenden Rac-Mutante ausreichend die LPA-Hemmung der Zellmigration. LPA hemmte in diesem Fall den intrazellulären Wachstumsfaktor und damit die Aktivierung von Aktin, welche lediglich in nur 40% der Zellen Rho-Kinase-abhängig war. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Hemmung der Migration durch LPA-Zugabe über das Rac-Molekül möglich ist, aber bei Zugabe von vermehrtem ROCK keine Rolle in der Migrations- und Invasionsgenese mehr zu spielen scheint (Sugimoto et al., 2006). In einer anderen Studie von Chen et al. zur Progression des hepatozellulären Karzinoms zeigten posttranslationale Modulationen der Migrationsfunktion von Proteinen, dass sie eine Invasion und Metastasierungstendenz der Karzinomzellen fördern (Chen et al., 2011). Zur Spezifizierung dieser Veränderungen wurden Vergleiche von primären Leberzellkarzinom und Proben von intravaskulären

Tumorthromben gleichen Ursprungs untersucht. Massenspektrometrische Analysen der hepatozellulären Proben ergaben eine Thr567-Hyperphosphorylierung des Zytoskelettproteins Ezrin, welches den invasiven Phänotyp der Leberzellkarzinome erklärt. Auch die *in vitro*-Invasivität der Tumorzellen wurde durch die Ezrin-Phosphorylierung gefördert. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Beobachtung, dass die Thr567-Phosphorylierung den Umbau des Membran-Zytoskeletts unterstützt. Durch die Versuche von Chen et al. an hepatozellulären Karzinomen bzw. Robertson et al. an pulmonalen Karzinomen zeigte sich korrespondierend zu den Ergebnissen dieser Arbeit die Bedeutung der Hemmung der Rho-Kinase (Robertson et al., 2000; Chen et al., 2011). Eine Hemmung der Thr567- Phosphorylierung am Ezrin-Komplex führte folglich zu einer Blockade des Migrationssignalweges und verhinderte eine gerichtete Invasion der Tumorzellen. Als wesentliche Ursache einer Karzinommigrations- und Invasionshemmung in Ovarialtumoren konnte somit die ROCK-Inhibition bei fehlender Phosphorylierung des Ezrin im ERM-Komplex postuliert werden (Petee et al., 2014).

## **5.6 Ausblick**

Aufgrund tumorspezifischer Reaktionswege konnten wir in dieser Studie eine Migrationshemmung bei fehlender Phosphorylierung der ROCK durch den spezifischen Inhibitor Y27632 nachweisen. Entsprechend Y27632 gilt es der Verifizierung spezifischer ROCK-Inhibitoren des hauptsächlich für die verstärkte Tumorzellmigration verantwortlichen Rho-Moleküls um eine Blockierung des aktivitäts- und invasivitätssteigernden ERM-Rho-Komplexes zu erreichen.

In der vorliegenden Dissertation erfolgte neben dem Versuch der Migrationshemmung bei Ovarialkarzinomeinzelzellen auch die Verminderung der Metastasierung aus dem Zellverband heraus. Hierbei konnte anhand der Zelllinie SKOV3 eine Minderung der Eindringtiefe und Geschwindigkeit der Tumorzellen unter Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 nachgewiesen werden. Somit war neben der Migrationshemmung einer einzelnen Ovarialkarzinomzelle auch eine Inhibition der Ausbreitung des gesamten Tumorverbandes möglich. Entsprechend ist eine Migrationshemmung des Tumorzellverbandes mit einer geringeren Metastasierung verknüpft (Kim et al., 2011). Dabei spielen die Migrationsinhibition ebenso wie die chirurgische oder chemotherapeutische Intervention bei vorliegendem Karzinom eine wesentliche Rolle in der Bekämpfung von malignen Erkrankungen (Whittemore, 1994). Sie sollte als weitere Möglichkeit in der Bekämpfung von Ovarialkarzinom-Metastasierung als Ergänzung zur bisherigen Therapie gesehen werden. So wären prätherapeutische Einsatzgebiete nach erfolgter operativer Entfernung des Primärherdes aber vor einer eventuell anschließenden Chemotherapie denkbar (McGrail et al., 2014). Hierzu müssen weitere Untersuchungen über mögliche

Zwischenwege respektive Modifikationen bezüglich der Wirkung von Rho-Kinase und deren Inhibitoren erfolgen. In zukünftigen Untersuchungen sollten eventuelle Nebenwirkungen von Y27632 und anderen ROCK-Inhibitoren eruiert werden. Zudem würden so sekundäre Präventionsmöglichkeiten bei diagnostizierten Karzinomen und Satellitenherden erschlossen werden (Chen J, 2013; Liu et al., 2014).

Denkbar wären, wie schon von Sugimoto et al. und Han et al. angemerkt, eine mögliche Veränderung des Wirkungsspektrum der Rho-Kinase im Sinne eines Verlustes der phosphorylierenden und somit aktivierenden Eigenschaften. Möglicherweise sind hierbei auch unterschiedliche Reaktionskaskaden des ERM-Komplexes mit dem CD44-Molekül im Vergleich zu anderen ovariellen Karzinomzelllinien gegeben. Dies bedingt, die Zelllinie SKOV3 betrachtend, beispielsweise die Verlängerung der hämatogenen sowie lymphogenen Tumorzellausbreitung von 173,6 Tagen auf 385,8 Tage bei Heranziehen der vorliegenden Ergebnisse. Hieraus resultierend stellt sich ein therapeutischer Zeitgewinn von ca. 6 Monaten unter Rho-Kinase-Inhibition mittels Y27632 dar. Zudem würde dies, bei Feststellung des Ovarialkarzinoms in einem späteren-inoperablen Stadium, eine günstigere Verlaufsprognose mit einem verlängerten, rezidiv- und chemotherapiefreien Zeitintervall bedeuten. Ebenso ist durch Unterdrückung der Migrationseigenschaften der Karzinomzellen die Reduktion der Metastasenabsiedelung in andere Organe vermindert. Auch dies würde einen Zeitgewinn für die Patientinnen bei weniger Folgeeingriffen (Metastasenchirurgie), weniger karzinomassoziierten Beschwerden und somit einer besseren Lebensqualität bedeuten.



## **6 Zusammenfassung**

Rho-Kinasen (ROCK) sind multifunktionale intrazelluläre Proteine, deren Aufgabe in der Phosphorylierung von transmembranären und intrazellulären Molekülen liegt. Zu ihren Hauptfunktionen zählt die Aktivierung und Phosphorylierung des intrazellulär gelegenen ERM-Komplexes, welcher mit dem transmembranären CD44-Molekül kommuniziert. Dieser Multi-Protein-Verband, gesteuert über ROCK-vermittelte und Phosphorylierung ist an der Tumorzellmigration in verschiedenen Karzinomen (Leber, Colon, Ovar, Mamma, etc.) beteiligt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Migrationsverhalten durch den ROCK-Inhibitor Y27632 in Wechselwirkung mit der spezifischen Rho-Kinase, dem ERM-Komplex sowie dem funktionalen Aktin-Myosin-Komplex zu untersuchen. Als Zellmodelle dienten fünf immortale Ovarialkarzinomzelllinien. Hierbei sollte der Frage einer Inhibition der verantwortlichen Rho-Kinase-Phosphorylierung durch Y27632 und der dadurch bedingten Hemmung des CD44-ERM-Komplexes vermittelten Tumorzellmigration und –invasion nachgegangen werden. Weiterhin wurde der ROCK-ERM-Komplex bei zeitgleicher Hyaluronsäure- sowie Y27632-Zugabe untersucht. Zur Verifizierung der Migrationsergebnisse erfolgten daraufhin lokalisationspezifische Immunfluoreszenzuntersuchungen mit verschiedenen Antikörpern gegen die Proteine Ezrin und CD44, welche wesentlich an der Tumorzellmigration beteiligt sind. Abschließend sollten durch Migrationsversuche an Sphäroiden unter ROCK-Inhibition die Auswirkung von Y27632 auf eine endotheliale Penetration einerseits und die Effekte auf den gesamten Tumorzellverband andererseits dargestellt werden.

In den Einzelzellmigrationsversuchen an den fünf Ovarialkarzinomzelllinien zeigte sich im Falle von SKOV3 und ES2 eine signifikante Inhibition des Migrationsverhaltens durch Y27632-Zugabe. Korrespondierend zu den Migrationsversuchen zeigte sich im Rahmen der Immunfluoreszenz bei Y27632-Zugabe eine ROCK-Inhibition mit folglichem ERM-Komplex-Aktivitätsminderung. So ließen sich eine membranäre Signalaktivitätsverminderung durch Delokalisation des Ezrin-Moleküls und Umlagerung in den zytoplasmatischen Bereich nachweisen. Diese Umlagerung hatte eine verminderte Migration der Tumorzelle aufgrund der ROCK-Inhibition zur Folge. Bei den anderen drei Tumorzelllinien OVCAR3, OAW42 und CAOV3 zeigte sich eine signifikante Steigerung der Migrationsaktivität bei gesteigerter Motilität und Invasivität im Rahmen der Einzelzellmigration. Mittels Immunfluoreszenz wurden vermehrt membranständige Ezrin-

Signalaktivitäten detektiert, welche eine gesteigerte Migrationsaktivität der Zelllinien OVCAR3, OAW42 und CAOV3 untermauerten.

Es wird deutlich, dass die ROCK-vermittelte Aktivierung von intrazellulären, CD44-assoziierten Makromolekülen (ERM) eine wesentliche Rolle in der Aktin-gekoppelten Tumorzellmigration respektive -invasion spielt. Der Wirkmechanismus einer Inhibition der Phosphorylierung des ROCK-Komplexes hat signifikanten Einfluss auf die Migrationsaktivität und damit Invasivität einzelner Ovarialkarzinome. Hierbei ist die Inhibition des ROCK-ERM-Komplexes wie im Falle von SKOV3 und ES2 aufgrund des singulären Wirkmechanismus von Y27632 über diesen Komplex zu erklären. Bei den anderen drei Zelllinien OVCAR3, OAW42 und CAOV3 zeigte sich jedoch eine Steigerung der Migrationsaktivität, welche sich durch eine Stimulation des ERM-Komplex mit folglich Aktin-Aktivierung erklären lässt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass ROCK-getriggerte Migrationskaskaden einzelner Ovarialkarzinomzelllinien einer Inhibition durch den Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 unterliegen. So bestätigte sich die Hypothese, dass neben einer PLC-getriggerten auch eine ROCK-vermittelte Aktin-Skelett-Steuerung zur Tumorzellmigration und Metastasierung bei verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien vorliegt. In weiteren Studien gilt es die quantitative Rolle der ROCK-Inhibition zu verifizieren um eine größtmögliche Hemmung der Tumorzellmigration zu erzielen.

## **7 Literaturverzeichnis**

- Abdou AG, Asaad NY, Abd El-Wahed MM, Aiad HA, Serag El-Dien M (2013) Immunohistochemical Expression of ERalpha, ERbeta, and TFF1 in Type I and II Ovarian Tumors. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology* **22(6)**: 421-32.
- Ahmed A, Becker C, Bast R Jr. (2012) The origin of ovarian cancer. *BJOG* **119**: 134-136.
- Ahn HJ, Kim YS, Kim JU, Han SM, Shin JW, Yang HO (2004) Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *J Cell Biochem* **91**: 1043-1052.
- Aktories K, Barbieri JT (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol.* **3**: 397-410.
- Aspenström P, Fransson A, Saras J (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* **377(Pt 2)**: 327–337.
- Bakrin N; Bereder JM; Decullier E; Classe JM; Msika S; Lorimier G; Abboud K; Meeus P; Ferron G; Quenet F; Marchal F; Gouy S; Morice P; Pomel C; Pocard M; Guyon F; Porcheron J; Glehen O (2013) Peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for advanced ovarian carcinoma. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* **39(12)**: 1435-43.
- Banerji S, Day AJ, Kahmann JD, Jackson DG (1998) Characterization of a functional hyaluronan-binding domain from the human CD44 molecule expressed in *Escherichia coli*. *Protein expr Purif* **14**: 371-381.
- Batzler WU, Kieschke J, Bertz J, Lehnert M, Eisinger B, Oberhausen R, Hentschel S, Schmidtman I, Husmann G, Schneider D (2002) Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 2002.

- Berryman M, Franck Z (1993) Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* **105**: 1025-1043.
- Böcker, Denk, Heitz (2004) *Lehrbuch der Pathologie* (3. Auflage) Urban & Fischer S. 903-918.
- Bretscher A (1986) Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J Cell Biol.* **108(3)**: 921-30.
- Bretscher A (1999) Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 109-116.
- Burges A, Schmalfeldt B (2011) Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2011; **108(38)**: 635–41.
- Burrige K, Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *J Cell Biol.* **116**: 167-179.
- Carmeci C, Thompson DA (1998) Moesin expression is associated with the estrogen receptor-negative breast cancer phenotype. *Surgery* **124**: 211-217.
- Castelo L, Jay DG (1999) Radixin is involved in lamellipodial stability during nerve growth cone motility. *Mol Biol Cell* **10**: 1511-1520.
- Chen J, Mandel LJ (1997) Unopposed phosphatase action initiates ezrin dysfunction: a potential mechanism for anoxic injury. *Am J Physiol* **273**: C710-C716.
- Chen J, Wang J, Chen D; Yang J; Yang C; Zhang Y; Zhang H; Dou J (2013) Evaluation of characteristics of CD44+CD117+ovarian cancer stem cells in three dimensional basement membrane extract scaffold versus two dimensional monocultures. *BMC cell biology* **14**: 7.

- Chen Y, Wang D, Guo Z, Zhao J, Wu B, Deng H, Zhou T, Xiang H, Gao F, Yu X; Liao J, Ward T, Xia P, Emenari C, Ding X, Thompson W, Ma K, Zhu J, Aikhionbare F, Dou K, Cheng SY, Yao X (2011) Rho kinase phosphorylation promotes ezrin-mediated metastasis in hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **71(5)**: 1721-9.
- Cramer DW, Hutchison GB, Welch WR, Scully RE, Knapp RC (1982) Factors affecting the association of oral contraceptives and ovarian cancer. *N Engl J Med.* **307(17)**: 1047-51.
- Cramer DW, Welch WR (1983) Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst.* **71(4)**: 717-21.
- Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW (1980) Monoclonal antibody to a human brain-granulocyte-T lymphocyte antigen probably homologous to the W 3/13 antigen of the rat. *Eur J Immunol* **10**: 745-749.
- Eckrich CE, Sauter G (2011) Prävalenz der Tyrosinkinase-Überexpression in humanen Zelllinien: Eine Gewebe-Mikroarray Analyse von BTK, ZAP70, HER3, HER4, JAK2. Dissertation 2011 Hamburg.
- Engel J, Hölscher G, Schubert-Fritschle G (2004) MANUAL Maligne Ovarialtumore/ Epidemiologie. Tumorzentrum München, Zuckschwerdt W Verlag München; 1-11.
- Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL (1991) Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* **10**: 1565-1569.
- Feeley KM, Wells M (2001) Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology* **38**: 87-95.
- Fraser JR, Appelgren LE, Laurent TC (1983) Tissue uptake of circulating hyaluronic acid. A whole body autoradiographic study. *Cell tissue Res* **233**: 285-293.
- Frickhofen N, du Bois A (2007) Tumore der weiblichen Genitalorgane. DGHO
- Friedl P (2010) Interaction of malignant tumor cells with extracellular matrix and migration: role of Rac and ROCK. Dissertation urn:nbn:de:bvb:20-opus-52894, Berlin.

- Fu X, Gong MC, Jia T, Somlyo AV, Somlyo AP (1998) The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca<sup>2+</sup>-sensitization of smooth muscle. *FEBS Lett* **440(1-2)**: 183-7.
- Gallion HH, Powell DE, Smith LW, Morrow JK, Martin AW, van N, Jr., Donaldson ES (1990) Chromosome abnormalities in human epithelial ovarian malignancies. *Gynecol Oncol* **38**: 473-477.
- Geiger KD, Stoldt P (2000) Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol* **157**: 1785-1793.
- Gest C, Mirshahi P, Li H, Pritchard LL, Joimel U, Blot E, Chidiac J, Poletto B, Vannier JP, Varin R, Mirshahi M, Cazin L, Pujade-Lauraine E, Soria J, Soria C Gest (2011) Ovarian cancer: Stat3, RhoA and IGF-IR as therapeutic targets. *Cancer letters* **317**: 207-17.
- Glasspool RM, McNeish IA (2013) Clear cell carcinoma of ovary and uterus. *Current oncology reports*; **15(6)**: 566-572.
- Goodfellow P N, Bantin G, Wiles M, Tunnacliffe A, Parkar M, Solomon E, Dalchau R, Fabre JW (1982) The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur J Immunol* **12**: 659-663.
- Greenfield B, Wand WC, Marquardt H, Piepkorn M, Wolff EA, Aruffo A, Bennett KL (1999) Characterization of the Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate Assembly Sites in CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**: 2511-2517.
- Hamm HE (1998) The many Faces of G Protein Signaling. In *J Biol Chem* **273**: 669–672.
- Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF (2005) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* **43**: 5379-5389.

- Han ZQ; Hong ZY; Hu CX; Hu Y; Chen CH; Lu YP; Wang SX; Zhou JF; Ma D (2007) Effect of blocking of ROCK-1, an effector of small G protein Rho, on the malignant behavior of ovarian tumor cells in vitro. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese Journal of Oncology]* **29(10)**: 723-7.
- Hashimoto R, Nakamura Y, Kosako H, Amano M, Kaibuchi K, Inagaki M, Takeda M (1999) Distribution of Rho-Kinase in the Bovine Brain. *Biochemical and biophysical research communications* **263(2)**: 575-579.
- Heider KH, Hofmann M, Horst E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST (1993) A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* **120**: 227-233.
- Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita S (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* **135**: 37-51.
- Hiraoka J, Okano I, Higuchi O, Yang N, Mizuno K (1996) Self-Verband der LIM-Kinase 1 vermittelt durch die Wechselwirkung zwischen einem N-terminalen LIM-Domäne und eine C-terminale Kinase-Domäne. *FEBS Lett* **399(1)**: 117-21.
- Hofman M, Rudy W, Zoller M, Tolg C, Ponta H, Herrlich P, Gunthert U (1991) CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumro cell lines. *Cancer Res* **51**: 5292-5297.
- Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Wang C, Hayashi A, Nikaido T, Konishi I (2008) Overexpression of RhoA enhances peritoneal dissemination: RhoA suppression with Lovastatin may be useful for ovarian cancer. *Cancer Science* **99(12)**: 2532-9.
- Cai H, Xu Y (2013) The role of LPA and YAP signaling in long-term migration of human ovarian cancer cells. *Cell Communication and Signaling* **11**: 31.
- Hurst JH, Hooks SB (2009) Lysophosphatidic acid stimulates cell growth by different mechanisms in SKOV-3 and Caov-3 ovarian cancer cells: distinct roles for Gi- and Rho-dependent pathways. *Pharmacology* **83(6)**: 333-47.

- Isacke CM (1994) The role of the cytoplasmic domain in regulating CD44 function. *J Cell Sci* **107 (Pt 9)**: 2343-2359.
- Ishizaki T, Naito M, Fujisawa K, Maekawa M, Watanabe N, Saito Y, Narumiya S (1997) p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Letter* **404(2-3)**:118-24.
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* **57(5)**: 976-83.
- Ivetic A, Ridley AJ (2004) Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leukocytes. *Immunology* **112**: 165–176.
- Jackson DG, Buckley J, Bell JI (1992) Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J Biol Chem* **267(7)**: 4732-4739.
- Jaffe AB, Hall A (2005) RHO GTPases: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**: 247-69.
- Jeon ES, Heo SC, Lee IH, Choi YJ, Park JH, Choi KU, Park do Y, Suh DS, Yoon MS, Kim JH (2008) Ovarian cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates secretion of VEGF and stromal cell-derived factor-1 alpha from human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med.* **42(4)**: 280-93.
- Jeong KJ, Cho KH, Panupinthu N, Kim H, Kang J, Park CG, Mills GB, Lee HY (2013) EGFR mediates LPA-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer invasion: Inhibition by resveratrol. *Mol Oncol* **7**: 121-129.
- Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P, (1995) CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *The Lancet* **345**: 615-619.



- Kim EK, Park JM, Lim S, Choi JW, Kim HS, Seok H, Seo JK, Oh K, Lee DS, Kim KT, Ryu SH, Suh PG (2011) Activation of AMP-activated protein kinase is essential for lysophosphatidic acid-induced cell migration in ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **286** (27): 24036-45.
- Kitajiri S, Fukumoto K (2004) Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *J Cell Biol* **166**: 559-570.
- Kobayashi H, Sagara J (2003) Shifts in cellular localization of moesin in normal oral epithelium, oral epithelial dysplasia, verrucous carcinoma and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **32**: 344-349.
- Köbel M; Gradhand E; Zeng K; Schmitt WD; Kriese K; Lantzsch T; Wolters M; Dittmer J; Strauss HG; Thomssen C; Hauptmann S (2006) Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma. *Int journal of gynecological pathology* **25**(2): 121-30.
- Koyanagi M, Takahashi J, Arakawa Y, Doi D, Fukuda H, Hayashi H, Narumiya S, Hashimoto N (2008) Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *Journal of neuroscience research* **86**(2): 270-80.
- Kurrey NK, K A, Bapat SA (2005) Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecologic oncology*; **97**(1): 155-65.
- Kwon MJ, Kim SS, Choi YL, Jung HS, Balch C, Kim SH, Song YS, Marquez VE, Nephew KP, Shin YK (2010) Derepression of CLDN3 and CLDN4 during ovarian tumorigenesis is associated with loss of repressive histone modifications. *Carcinogenesis* **31**: 974–983.
- Lee MJ, Jeon ES, Lee JS, Cho M, Suh DS, Chang CL, Kim JH (2008) Lysophosphatidic acid in malignant ascites stimulates migration of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* **104**(2): 499-510.

- Legg JW, Lewis CA, Parsons M, Ng T, Isacke CM (2002) A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol* **4(6)**: 399-407.
- Lesley J, Hyman R, Kincade PW (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* **54**: 271-335.
- Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L (1996) The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* **16(10)**: 5313–27.
- Liu S, Goldstein RH, Scepanisky EM, Rosenblatt M (2014) Inhibition of Rho-Associated Kinase Signaling Prevents Breast Cancer Metastasis to Human Bone. *Cancer Res* **69**: 8742.
- Lu Q, Longo FM, Zhou H, Massa SM, Chen YH (2013) Signaling Through Rho GTPase Pathway as Viable Drug Target. *Curr Med Chem.* **16(11)**: 1355–1365.
- Machesky LM, Hall A (1996) Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **6**: 304-310.
- Makitie T, Carpen O (2001) Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 2442-2449.
- Matzke A, Puchta H (2005) Funktion der extrazellulären Domäne von CD44v6 als Ko-Rezeptor als Wachstumsfaktorrezeptoren. *Blood journal* **114(25)**: 5236-44.
- McGrail DJ, Kieu QMN, Dawson MR (2014) The malignancy of metastatic ovarian cancer cells is increased on soft matrices through a mechanosensitive Rho–ROCK pathway. *J Cell Sci* **127**: 2621-2626.
- Minase T, Ishima T, Itoh K, Hashimoto K (2010) Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by the ROCK inhibitor Y-27632: a possible role of IP3 receptors. *European journal of pharmacology* **648(1-3)**: 67-73.

- Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T, Yue L, Bray-Ward P, Ward DC (2005) Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Medical Sciences* **102(21)**: 7677–7682.
- Mulder JWR, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk C A, Weidema WF, Offerhaus GJA, Pals ST (1994) Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *The Lancet* **344**: 1470-1472.
- Nahas WA (1997) Ovarian cancer-Current outlook on this deadly disease. *Postgraduate medicine* **102(3)**: 112-20.
- Narumiya S, Ishizaki T, Uehata M (2000) Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol* **325**: 273-8.
- Nik NN, Vang R, Shih IM, Kurman RJ (2013) Origin and Pathogenesis of Pelvic (Ovarian, Tubal, and Primary Peritoneal) Serous Carcinoma. *Annual review of pathology* **9**: 27-45.
- Ohtani K, Sakamoto H (2002) Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is highly expressed in atypical endometrial hyperplasia and uterine endometrioid adenocarcinoma. *Cancer Lett* **179**: 79-86.
- Paglini G, Kunda P (1998) Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons. *J Cell Biol* **143**: 443-455.
- Pecorelli S, Favalli G (2002) Surgical versus chemical upfront debulking in advanced ovarian cancer *International Journal of Gynecological Cancer* **1046**: 1525-1438.
- Pettee KM, Dvorak KM, Nestor-Kalinoski AL, Eisenmann KM (2014) An mDia2/ROCK Signaling Axis Regulates Invasive Egress from Epithelial Ovarian Cancer Spheroids. *PLoS ONE* **9(2)**: e90371.
- Pfisterer J, du BA, Hilpert F, Wagner U, Meier W (2004) Fortschritte in der Therapie des Ovarialkarzinoms. *Dtsch Med Wochenschr* **129**: 379-384.
- Pignata S (2004) Ovarian cancer in the elderly. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**: 77-86.

- Raftopoulou M, Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**: 23-32.
- Richardson A, Kaye SB (2005) Drug resistance in ovarian cancer: The emerging importance of gene transcription and spatio-temporal regulation of resistance. *Drug Resist Updat.* **8(5)**: 311-21.
- Ridley AJ (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**: 522-529.
- Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ (2003) RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol.* **23**: 4219-4229.
- Robertson TP, Dipp M, Ward JP, Aaronson PI, Evans AM (2000) Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br J Pharmacol* **131(1)**: 5-9.
- Schmandke A, Schmandke A, Strittmatter SM (2007) ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist.* **13**: 454-469.
- Scott M, McCluggage WG (2006) Current concepts in ovarian epithelial tumorigenesis: correlation between morphological and molecular data. *Histol Histopathol* **21**: 81-92.
- Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG (1993) The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human and rat. *J Biol Chem* **268(17)**: 12235-12238.
- Sheikh H, Legg J, Lewis C, Peck D, Isacke C (1998) Discrete domains within the hyaluronan receptor CD44 regulate membrane localization and cell migration. *Cell Adhes Commun* **6**: 149-156.
- Shiozaki M, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Naganawa Y, Shibata T, Fujii Y, Takeyama H (2011) Expression of CD44v6 is an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology letters*; **2**: 429-434.

- Smolich B, Vo M, Buckley S, Plowman G, Papkoff J (1997) Klonierung und biochemische Charakterisierung von limk-2, ein Protein-Kinase mit zwei LIM-Domänen. *SUGEN Inc* **121(2)**: 382-8.
- Solinet S, Mahmud K, Stewman SF, Ben El Kadhi K, Decelle B, Talje L, Ma A, Kwok BH, Carreno S (2013) The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. *The Journal of cell biology* **202(2)**: 251-60.
- Spencer C, Montalvo J, McLaughlin SR, Bryan BA (2011) Small molecule inhibition of cytoskeletal dynamics in melanoma tumors results in altered transcriptional expression patterns of key genes involved in tumor initiation and progression. *Cancer genomics & proteomics* **8(2)**: 77-85.
- Sugimoto N; Takuwa N; Yoshioka K; Takuwa Y (2006) Rho-dependent, Rho kinase-independent inhibitory regulation of Rac and cell migration by LPA1 receptor in Gi-inactivated CHO cells. *Experimental cell research*; VOL: **312(10)**: p. 1899-908.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. In: *Physiol. Rev.* **81**: 153–208.
- Tanabe KK, Stamenkovic I, Cutler M, Takahashi K (1995) Restoration of CD44H expression in colon carcinomas reduces tumorigenicity. *Ann Surg* **222**: 493-501.
- Thorne RF, Legg JW, Isacke CM (2004) The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci.* **117(Pt 3)**: 373-80.
- Tingulstad S, Skjeldestad FE (2003) Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol* **101**: 885-891.
- Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, Ponta H (1993) Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* **21(5)**: 1225-1229.
- Tsao SW, Mok SC, Fey EG, Fletcher JA, Wan TSK, Chew EC, Muto MG, Knapp RC, Berkowitz RS (1995) Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes. *Experimental Cell Research* **218(2)**: 499-507.

- Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A (1994) ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* **126**: 391-401.
- Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**: 990-4.
- van Beuge MM, Prakash J, Lacombe M, Post E, Reker-Smit C, Beljaars L, Poelstra K (2011) Increased liver uptake and reduced hepatic stellate cell activation with a cell-specific conjugate of the Rho-kinase inhibitor Y27632. *Pharmaceutical research* **840**: 1573-904.
- Vetter I, Wittinghofer A (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *In Scienc.* **294**: 1299–1304.
- Wang CY, Wang M, Wang XY, Zhang SL, Wang YX, Li LK (2006) Inhibitory effect of NS398 on the proliferation of human ovarian cancer cell lines CAOV3 and OVCAR3 in vitro. *Zhonghua fu chan ke za zhi* **38**: 415-8.
- Wang CY, Wang M, Wang XY, Zhang SL, Wang YX, Li LK (2006) Rapamycin by itself and additively in combination with carboplatin inhibits the growth of ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology* **114**: 516-22.
- Wang J, Wang YH, Hou YY, Xi T, Liu Y, Liu JG (2013) The small GTPase RhoA, but not Rac1, is essential for conditioned aversive memory formation through regulation of actin rearrangements in rat dorsal hippocampus. *Acta pharmacologica Sinica* **34(6)**: 811-8.
- Ween MP, Hummitzsch K, Rodgers RJ, Oehler MK, Ricciardelli C (2011) Versican induces a pro-metastatic ovarian cancer cell behavior which can be inhibited by small hyaluronan oligosaccharides. *Clinical & experimental metastasis* **28(2)**: 113-25.

- Wenham RM, Lancaster JM, Berchuck A (2002) Molecular aspects of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **16**: 483-497.
- Whittemore AS (1994) Characteristics relating to ovarian cancer risk: implications for prevention and detection. *Gynecol Oncol* **55**: 15-19.
- Whittemore AS, Wu ML, Paffenbarger RS, Jr., Sarles DL, Kampert JB, Grosser S, Jung DL, Ballon S, Hendrickson M (1988) Personal and environmental characteristics related to epithelial ovarian cancer. II. Exposures to talcum powder, tobacco, alcohol, and coffee. *Am J Epidemiol* **128**: 1228-1240.
- Wilson AP (1984) Characterization of a cell line derived from the ascites of a patient with papillary serous cystadenocarcinoma of the ovary. *J Natl Cancer Inst* **72**: 513-521.
- Yoneda A, Multhaupt HAB, Couchman JR (2005) The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *JCB* **170(3)**: 443-453.
- Zeuthen J, Norgaard JO, Avner P, Fellous M, Wartiovaara J, Vaheri A, Rosen A, Giovannella BC (1980) Characterization of a human ovarian teratocarcinoma-derived cell line. *Int J Cancer* **25**: 19-32.
- Zhao Y, Zong ZH, Xu HM (2010) RhoC expression level is correlated with the clinic-pathological characteristics of ovarian cancer and the expression levels of ROCK-I, VEGF, and MMP9. *Gynecologic oncology* **116(3)**: 563-71.

## **8 Thesen**

1. Tumorzellen bewegen sich über ein multifaktoriell gesteuertes Proteinaktivierungs- und Inaktivierungssystem. Während der Migration laufen transmembranär und zytoplasmatisch verknüpfte Signalkaskaden zur Aktivierung des Aktin-Zytoskeletts unter Proteinbeteiligung mit einer zielgerichteten Fortbewegung und Invasion der Tumorzellen ab.
2. Die Rho-Kinase ist ein essentielles, zytoplasmatisches Promoter- und Signalmolekül, welches intrazelluläre Signalkaskaden für die Phosphorylierung von Tumorzellen unterschiedlicher Genese reguliert. Zum heutigen Zeitpunkt stehen neben Mamma- und Kolonkarzinomen auch verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien im Fokus einer Rho-Kinase-vermittelten Tumormetastasierung.
3. Rho-Kinasen entfalten ihre Wirkung über Bindung an den intrazytoplasmatischen Ezrin-/Moesin-/Radixin-Komplex. Durch Aktivierung des N-terminalen Ende des Ezrin-Moleküls wird die Verknüpfung mit CD44 als Konduktor und der anschließenden Aktin-Zytoskelett-Modulation begünstigt.
4. Y27632 bedingt in einzelnen Ovarialkarzinomzellen, hier speziell SKOV3 und ES2, vergleichbar mit einzelnen Mammakarzinomen und Kolonkarzinomen, eine Hemmung der Rho-Kinase mit einer ERM-Komplex-assoziierten Migrationsaktivitätsminderung.
5. Anderen Ovarialkarzinomzellen OVCAR3, OAW42 und CAOV3 zeigten eine Aktivierung der Migrationsfähigkeit durch ROCK-Inhibition mit gesteigerten Migrationsgeschwindigkeiten und -maximalweiten. Dies war Folge einer multifaktoriellen, nicht allein über ROCK-gesteuerten Signalkaskade.
6. Auch in Ovarialkarzinomzellen konnten Ezrin und CD44 mittels IF-Methoden nachgewiesen werden. Eine Reduktion von membranständigem Ezrin bei SKOV3 und ES2 sowie zytoplasmatisch-inaktivierte Umlagerung waren Folgen der Y27632-vermittelten ROCK-Inhibition.



7. Insbesondere eine verstärkt membranäre Ezrin-Aktivität ließ sich bei OVCAR3, OAW42 und CAOV3 darstellen, was auf durch vermehrt phosphoryliertes Ezrin im ERM-Komplex mit Aktivierung des Aktin-Zytoskeletts schließen lässt.
8. CD44 als membranständiges Protein wird sekundär nicht durch Y27632 beeinflusst. Ferner scheint es neben dem ERM-Komplex weitere Signalmoleküle zur Stimulation in Anspruch zu nehmen, da eine Universalität der ERM-bedingten Wirkung nicht zu verzeichnen ist.
9. Verdeutlicht man sich multifaktorielle Modulation von Fortbewegungseigenschaften von Tumorzellen und unterstellt ihnen *in vitro* ein ähnliches Verhalten in der Einzel- und Sphäroidzellmigration, ist primär von einer multizentrischen Signalkaskade für die Fortbewegung von Tumorzellen auszugehen.
10. Die Einzelzellmigrationen von SKOV3 und ES2 legen einen bevorzugt Rho-Kinase-vermittelten Migrationsmechanismus der Tumorzellen entsprechend Untersuchungen in Mamma- und Kolonkarzinomzelllinien nahe.
11. Rho-Kinase-Inhibitoren führen zu einer signifikanten Migrationssenkung, welches in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie zu einer mittel- bis langfristigen Reduktion von Tumorrezidiven führen kann.

## **9 Anlagen/ Anhang**

### **9.1 Eingesetzte Chemikalien**

AEC Substratlösung	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Agarose 2%	Biozym, Oldendorf
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck KGaA, Darmstadt
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt
Avidin/Biotin Blocking Kit	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Cy3	Jackson Immunoresearch, Lab. Inc., USA
DAPI	AppliChem GmbH, Darmstadt
DMEM/HAM's	Biochrom, Berlin
EDTA	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
FITC polyclonal goat antibody	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
FITC polyclonal mouse antibody	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
FITC polyclonal swine antibody	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt
37% HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Hyaluronidase(5mg/ml)	Merck KGaA, Darmstadt
Invitrogen Matrixgel	Cohesion Technologies, Palo Alto, USA
MCDD105	Hoechst sanofi-aventis, Frankfurt
Medium199	Hoechst sanofi-aventis, Frankfurt
MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Mausserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Mounting medium	Hoechst sanofi-aventis, Frankfurt
NaCl 0,9%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Biochrom AG, Berlin
NaOH	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PBS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Propanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Schafserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Schweineserum	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

TBS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TRITC polyclonal mouse antibody	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
TRITC polyclonal rabbit antibody	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid 30%ig	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Y27632 - (R)-(+)- <i>trans</i> -N-(4-Pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide	Merck Chemicals Ltd., Beeston, UK

## 9.2 Gebrauchswaren und Geräte

Absaugpumpe	HLC, Bovenden
Autoklav	Schütt Labortechnik, Göttingen
Brutschränke	Forma /Series II Water Jacketed CO <sub>2</sub> -Incubation), Karlsruhe
Cryocut	Reichert-Jung, Lauda-Königshofen
Deckgläschen 20x20mm	Marienfeld GmbH & Co., Lauda-Königshofen
Diamond-Crystal-PEN	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Digital-Kamera	Sony Cyber Shot DSC-F717, Osaka, Japan
Einweg-Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS 100	Nikon AG, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop VHX-600	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Filterpapier	Schleicher und Schüll, Dassel
Filterpapierscheibchen	Whatman, Dassel
Grab4PCI, Tracking-software	PHYTEC Technologie Holding AG, Mainz
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg
HistoBond Adhesion Micro Slides	Marienfeld GmbH Co., Lauda-Königshofen
Kühlschrank	AEG electrolux GmbH, Ulm
Küvetten	Heraeus GmbH, Hanau
Mikroliterpipetten	Gilson International B.V., Middleton, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH Co., Lauda-Königshofen
Objektträger „Starfrost“	Marienfeld GmbH Co., Lauda-Königshofen
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Softtubes	Biozym, Oldendorf
Petrischalen	Greiner bio-one, Solingen
Photomikroskop (Axioplan)	Carl Zeiss AG, Jena
Pipette 5, 10, 50ml	Greiner bio-one, Solingen
Pipettenspitzen, kristall 0,5 – 10µl	Biozym, Oldendorf

Pipettenspitzen, gelb 5 – 100µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Pipettenspitzen, blau 100 – 1000µl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Pipettenspitzen (diverse)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Quick Time Player Pro	Apple, Cupertino, USA
Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Stericankanüle, grau	B. Braun Melsungen AG, Berlin
Sterilbänke	Thermo electon corporation Holton Lamin Air NuAire Inc., Waltham, USA
Sterilfilter	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer	Heidolph GmbH & Co. KG, Kelheim
Waagen	Sartorius AG, Göttingen
6-Well-Platten	TPP, Transadingen, Schweiz
24-Well-Platten	TPP, Transadingen, Schweiz
96-Well-Platten	TPP, Transadingen, Schweiz
Zählautomat (Coulter T840)	Beckmann AG, München
Zellkulturflaschen (50ml)	Greiner bio-one, Solingen
Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Solingen
Zentrifuge (Centrifuge 5415C)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus GmbH, Hanau
Zentrifuge (EBA 12 R)	Hettich AG, Tuttlingen

### 9.3 Tabellenanhang

Tabelle 1: Vergleich der einzelnen Komponenten des ERM-Komplexes

Tabelle 2: Herkunft der Ovarial-Karzinom-Zelllinien, unterschieden in Primärtumor und Aszites-Punktat

Tabelle 3a/3b: Arbeitsschritte Motilitätsassay/Einzelzellmigration

Tabelle 4: IF mit spezifischen Angaben betreffend die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 5: Farbschemata der Primär-AK Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6

Tabelle 6: Arbeitsschritte Immunfluoreszenzfärbung

- Tabelle 7: IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie SKOV3 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6
- Tabelle 8: Einfluss des ROCK-Inhibitors Y27632 auf die Lokalisierung von Ezrin und CD44 der Zelllinie SKOV3
- Tabelle 9: IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie OVCAR3 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6
- Tabelle 10: Einfluss des ROCK-Inhibitors Y27632 auf die Lokalisierung von Ezrin und CD44 der Zelllinie OVCAR3
- Tabelle 11: IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie ES2 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6
- Tabelle 12: IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie OAW42 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6
- Tabelle 13: IF-Nachweis der molekularen Veränderungen in den einzelnen Zellkompartimenten der Zelllinie CAO3 vor und nach Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 bei Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6
- Tabelle 14: Gesamtmigrationsweiten in  $\mu\text{m}$  über die Versuchsdauer von 48h
- Tabelle 15: Schematische Darstellung der Änderung des Migrationsverhaltens
- Tabelle 16: Hauptlokalisationsorte der Proteine Ezrin (H), Ezrin353, Ezrin566, CD44 (H), CD44v3 und CD44v6 nach Rho-Kinase-Inhibition mit Y27632 und dessen unterschiedliche Gewichtung
- Tabelle 17: Übersicht der Y27632-Signalaktivität der Tumorzelllinien bei Ezrin (H), Ezrin353 und Ezrin566

#### 9.4 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Exonstruktur von CD44 und dessen Transkripten/ Spleißvarianten CD44s, CD44v3 und CD44v6
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des CD44-Moleküls und dessen Interaktion mit dem ERM-Komplex
- Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur eines heterotrimeren G-Proteins
- Abbildung 4: Wirkungsweise der Rho-GTPasen, Signalweg von extrazellulär bis zur genetischen Modifikation
- Abbildung 5: Funktionsmechanismus der ROCK's
- Abbildung 6: CD44 und ERM-Komplex in phosphorylierter und dephosphorylierter Form durch ROCK sowie Hemmung der Phosphorylierung von ROCK durch Y27632
- Abbildung 7: Strukturformel des ROCK-Inhibitors Y27632
- Abbildung 8: Interaktion der Rho-GTPase, ROCK, des ERM-Komplexes und deren spezifische Inhibition mittels Y27632
- Abbildung 9: Bestücken der Migrationskammer
- Abbildung 10: Versuchsaufbau der Migrationseinrichtung
- Abbildung 11: A-D: Beispiel der getrackten Tumorzelllinie SKOV3 unter Zugabe von HA und/ oder Y27632 nach 48 Stunden
- Abbildung 12: Beispiel eines Speedhistogramms
- Abbildung 13: Zellreihen für die IF-Reaktion
- Abbildung 14: DAPI-Kernfärbung
- Abbildung 15: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie SKOV3 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$
- Abbildung 16: A-T: IF der Tumorzelllinie SKOV3
- Abbildung 17: Schema der Zellbestandteile bei der Immunfluoreszenzverteilung
- Abbildung 18: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie OVCAR3 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$
- Abbildung 19: A-T: IF der Tumorzelllinie OVCAR3
- Abbildung 20: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie ES2 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$
- Abbildung 21: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie OAW42 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$
- Abbildung 22: Mittlere Migrationsgeschwindigkeiten der Zelllinie CAO3 bei Zugabe von Y27632 und Hyaluronsäure in  $\mu\text{m}/\text{min}$
- Abbildung 23: Prozentuale Darstellung der Gesamtmigrationsweite der Zelllinien nach 48h
- Abbildung 24: Sphäroidzellmigration am Beispiel einer Tumorzellkolonie von SKOV3

## **10 Anhang**

### 10.1 Lebenslauf

Geburtsdatum: 08.12.1982 in Wolfen  
Wohnhaft: Römerstr. 40a, 56323 Waldesch  
Familienstand: verheiratet

#### **Schulische Ausbildung**

1989 – 1993 Grundschule Delitzsch West  
1993 – 2001 Oskar-Reime-Gymnasium Delitzsch

#### **Beruflicher Werdegang**

- 2001 – 2002: FWDL bei der Bundeswehr im SanRgt 32 in Halle/Saale
- 2002 – 2008: Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität zu Halle/Wittenberg
- 2009 – 2010: Assistenzarzt Orthopädie/Unfallchirurgie, BWK Berlin
- 2010 – 2012: Assistenzarzt für Pathologie, BwZK Koblenz, Abt. XIII
- 2012 – 2013 Truppenarzt Sanitätsstaffel Donaueschingen/ Neben tätigkeit als Arzt DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg
- seit 2013 Assistenzarzt für Pathologie, BwZK Koblenz, Abt. XIII/ Neben-tätigkeit als Arzt DRK Blutspendedienst Rheinland-Pfalz

#### **Zusatzbezeichnungen**

- seit Juni 2010: DEGUM1-Zertifikat Sonografie Schilddrüse, Thorax, Abdomen
- seit Januar 2011: Strahlenschutzkundige Person

---

Gunnar Müller

## 10.2 Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Gunnar Müller

## 10.3 Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

---

Gunnar Müller



## 10.4 Danksagung

Herrn PD Dr. rer. nat. **Frank Bartel**, Universität Halle/Wittenberg und Dr. med. **Wolfgang Schmitt**, Charité Berlin danke ich für die langzeitige Betreuung, den engen beratenden sowie freundschaftlichen Kontakt.

Herrn Prof. Dr. med. **Steffen Hauptmann** gilt mein Dank für das Überlassen des Promotionsthemas und Betreuung im fachlich-wissenschaftlichen Bereich.

Herrn Dr. med. Dr. med. dent. **Daniel Pfütze**, Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für seine unermüdlichen fachlichen und motivierenden Anregungen.

Meiner Ehefrau **Claudia Müller** danke ich für geduldigen Beistand, manch aufmunterndes Wort und Rat bezüglich Orthografie und Gestaltung.

Herrn Dr. med. **Frederik Frenzen**, Universitätsklinikum Dresden, Abteilung für Innere Medizin, möchte ich insbesondere für fachlich-kritische Anmerkungen und Anregungen danken.

Meinen **Eltern** danke ich für die Geduld, Nachsicht und den zeitlichen geschaffenen Freiraum zur Fertigstellung dieser Arbeit.