

**Funktionelle Analysen  
des *armadillo repeat* Proteins ARVCF**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15 Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Andreas Pfaff  
aus Schwenningen am Neckar

Frankfurt am Main, 2004

(D F 1)

vom Fachbereich 15 Biologie und Informatik der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz Osiewacz

1. Gutachter: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

2. Gutachter: Prof. Dr. Stefanie Dimmeler

Datum der Disputation:.....

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz durchgeführt.

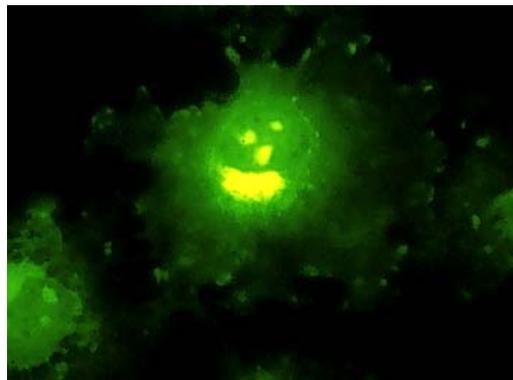
## Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für die Überlassung des Themas der Dissertation und der dafür notwendigen Mittel.

Ein Dankeschön geht an das HUGEL-Team, welches mir die Arbeit im Labor angenehm gemacht hat: Bernd, René, Nadine, Beata und last *but not least* Zoe.

Frank danke ich für die Computerunterstützung in jeglicher Hinsicht und für ein gutes Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und an meine Freunde, die mich unterstützt haben und mir immer beiseite standen.



Für meine Eltern

1.	EINLEITUNG	1
1.1	CADHERINE	1
1.2	DIE <i>ARMADILLO REPEAT</i> PROTEINE	3
1.2.1.	Die p120(ctn) verwandten Proteine	4
1.2.2.	p120(ctn)	6
1.2.3.	ARVCF	7
1.3.	REZEPTOR TYROSINKINASEN UND DIE PROTEINE DER <i>ADHERENS JUNCTIONS</i>	8
1.4.	DIE PROTEINKINASE C (PKC) FAMILIE	10
1.5.	KENNTNISSTAND ZU BEGINN UND ZIEL DIESER ARBEIT	12
2.	MATERIAL	13
2.1.	CHEMIKALIEN	13
2.2.	LÖSUNGEN, PUFFER, ZUSÄTZE UND SEREN	13
2.3.	ENZYME	23
2.4.	BAKTERIENSTÄMME	23
2.5.	ZELLINIEN	23
2.6.	GRÖßENMARKER	24
2.7.	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	24
2.8.	PLASMIDE	26
2.9.	ZUGRIFFSNUMMERN FÜR NUKLEOTIDSEQUENZEN (ACCESSION NUMBER)	26
2.10.	ANTIKÖRPER	27
2.11.	KITS UND TRANSFEKTIONSREAGENZIEEN	28
2.12.	GERÄTE	28
2.13.	VERBRAUCHSMATERIALIEN	29
3.	METHODEN	31
3.1.	FÄLLUNG VON NUKLEINSÄUREN	31
3.2.	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN	31
3.3.	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER NUKLEINSÄURE-KONZENTRATION	31
3.4.	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER PROTEIN-KONZENTRATION	32
3.5.	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	33
3.6.	GELELEKTROPHORESE (MANIATIS ET AL., 1982)	33
3.6.1.	Native Gelelektrophorese	34
3.6.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)	34
3.7.	FÄRBen VON PROTEINEN IN POLYACRYLAMIDGELN MIT COOMASSIE-BLAU	35
3.8.	AUTORADIOGRAPHIE	35
3.9.	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	36
3.10.	TRANSFORMATION VON PLASMID-DNA IN KOMPETENTE BAKTERIENZELLEN	36
3.11.	ANLEGEN EINES GLYCEROLSTOCKS	37
3.12.	ENZYMKATALYSIERTE MODIFIKATIONEN VON DNA	37
3.13.	POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR) (SAIKI ET AL., 1985)	38
3.14.	ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN	40
3.14.1.	Kulturbedingungen von eukaryotischen Zellen	41

3.14.2. Lagerung von Zellen	41
3.14.3. Passagieren von Zellen	42
3.14.4. Auftauen von Zellen	42
3.14.5. Einfrieren von Zellen	43
3.15. IMMUNOFLUORESZENZ	43
3.16. LYSE VON ZELLEN MITTELS RIPA-PUFFER	44
3.17. WESTERN BLOT	45
3.18. PROTEINNACHWEIS DURCH ANTIKÖRPER	45
3.19. <i>IN VITRO</i> GST <i>PULL DOWN</i> ASSAY	46
3.19.1. Expression rekombinanter Proteine in Bakterien	46
3.19.2. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	47
3.19.3. <i>In vitro</i> Transkription und Translation	48
3.19.4. <i>Pull Down Assay</i>	48
3.20. KULTIVIERUNG UND LAGERUNG VON HEFESTÄMMEN	49
3.20.1. Transformation von Hefezellen mit DNA	49
3.20.2. Galaktosidase-Filtertest	53
3.20.3. Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe	53
3.21. STATISTISCHE ANALYSEN	54
4. ERGEBNISSE	55
4.1. INTERAKTIONSSTUDIEN MIT ARVCF	55
4.1.1. Auswahl der Köder für das Durchmustern einer cDNA- Bank	55
4.1.2. Überprüfung des Expressionsmusters von murinem ARVCF	56
4.1.3. Ergebnis des Hefe zweihybrid <i>screen</i>	58
4.1.4. <i>In vitro</i> Transkription und Translation der Deletionsmutanten von ARVCF	61
4.1.5. Bakterielle Expression des Proteins $\alpha$ -actinin	62
4.1.6. <i>Pull- Down Assay</i>	63
4.1.7. Subzelluläre Lokalisation der Proteine	64
4.1.8. Coimmunopräzipitation	65
4.2. ARVCF ALS POTENTIELLES EFFEKTORMOLEKÜL DER PROTEINKINASE C	67
4.2.1. Potentielle Phosphorylierungsstellen in ARVCF	67
4.2.2. Änderung der subzellulären Lokalisation von ARVCF nach Cytokinbehandlung der Zellen	70
4.2.3. Einfluss der Proteinkinase C auf die Translokation von ARVCF von der Plasmamembran in das Cytoplasma	73
4.2.4. Translokation von ARVCF durch PMA in unterschiedlichen Zelltypen.	75
4.2.5. TNF- $\alpha$ , EGF und PMA induzieren eine abgeschwächte Cadherinbindung von ARVCF	78
4.2.6. Die Rolle des N-Terminus von ARVCF bei der Antwort des Proteins auf PMA und Cytokin-behandlung.	80
4.2.7. p120(ctn) mit dem N-Terminus von ARVCF reagiert auf PMA-Stimulation.	82
4.2.8. Abgeschwächte Cadherinbindung von ARVCF/p120(ctn) nach PMA-Behandlung	84

4.2.9. T50A Mutante von ARVCF reagiert auf PMA Stimulation	85
5. DISKUSSION	89
5.1. DER HEFE ZWEIHYBRID SCREEN	89
5.2. ARVCF ALS POTENTIELLES EFFEKTORMOLEKÜL DER PKC	91
6. ZUSAMMENFASSUNG	97
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
8. LITERATURVERZEICHNIS	101

# 1. Einleitung

## 1.1 Cadherine

Cadherine sind eine Familie transmembraner Glycoproteine, welche, vermittelt über Ihre extrazelluläre Domäne, homophile Wechselwirkungen eingehen. Sie dienen somit der Zelladhäsion und der Zell-Zellerkennung. Da sie bei der Gestaltung und Entwicklung von Geweben und Organen eine wichtige Rolle spielen, werden sie auch als morphoregulatorische Moleküle bezeichnet (Takeichi, 1991). Cadherine werden gewebespezifisch und entwicklungsabhängig exprimiert, die homophile Wechselwirkung kommt calciumabhängig zustande (Ringwald et al., 1987; Takeichi, 1991). Bei Calciummangel erfahren sie eine Konformationsänderung und werden proteolytisch abgebaut (Huber et al., 1996; Ringwald et al., 1987; Takeichi, 1991).

Cadherine besitzen, nachdem sie als Vorläufermoleküle mit N-terminalem Signal- und Propeptid synthetisiert und prozessiert worden sind, ein Molekulargewicht von 120-130 kD.

Die Reifung der Moleküle ist notwendig, um adhäsionskompetente Moleküle zu erhalten (Ozawa und Kemler, 1990).

Sie werden als Transmembranproteine in drei Domänen unterteilt:

Eine N-terminale, extrazelluläre Domäne (EC), eine Transmembranregion (TM) und eine C-terminale, cytoplasmatische Domäne (CPD).



Eine weitere wichtige Funktion der Cadherine, die intrazelluläre Interaktion mit den Cateninen bzw. *armadillo repeat* Proteinen übernimmt die cytoplasmatische Domäne (CPD), welche eine Größe von etwa 150 bis 160 Aminosäuren aufweist. Sie wird noch einmal unterteilt in die Juxtamembrandomäne (JMD) und die cateninbindende Domäne (CBD).

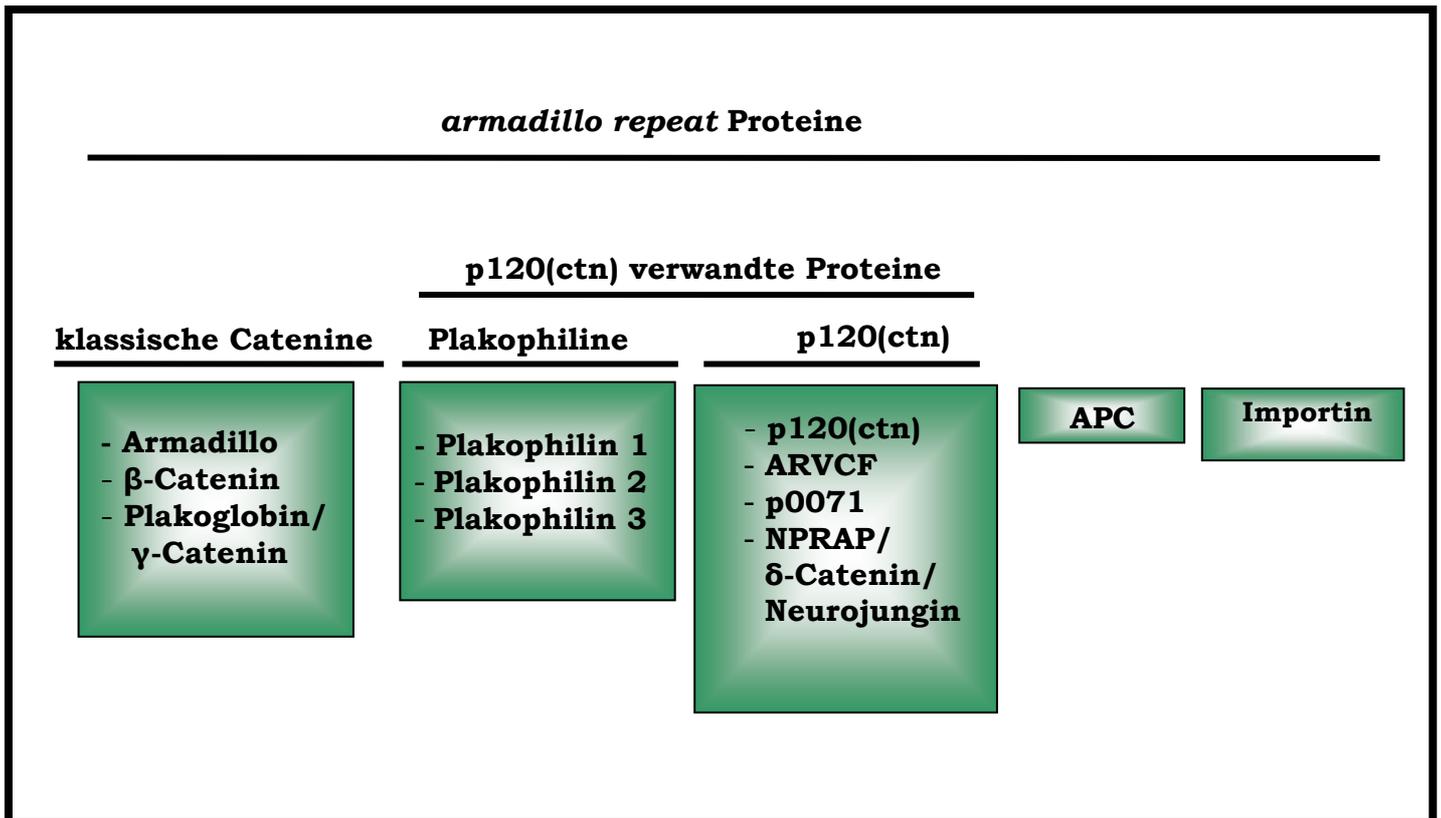
## 1.2 Die *armadillo repeat* Proteine

Die Bezeichnung *armadillo repeats* stammt von dem Motiv des Segmentpolaritätsgen *Armadillo*, welches in *Drosophila Melanogaster* entdeckt wurde (Peifer et al., 1994; Peifer und Wieschaus, 1990; Wieschaus und Riggleman, 1987).

Als *armadillo repeats* bezeichnet man eine Domäne von Proteinen, die aus einer Serie imperfekter Wiederholungen eines 42 AS langen Sequenzmotivs besteht. Zusammen bilden diese Wiederholungen eine positiv geladene Furche, über welche die Interaktion mit der sauren CBD der Cadherine stattfindet, wie es für  $\beta$ -Catenin anhand von Kristallstrukturanalysen gezeigt werden konnte (Huber et al., 1997).

Die Bindung der *armadillo repeat* Proteine Plakoglobin (Cowin und Burke, 1996; Sacco et al., 1995), p120(ctn) (Daniel und Reynolds, 1995) und ARVCF (Kaufmann et al., 2000) an Cadherine findet ebenfalls über diese zentrale Region statt.

Die Unterteilung der *armadillo repeat* Proteine in verschiedene Untergruppen fand durch Hatzfeld und Nachtshiem statt und wurde in der Literatur übernommen und akzeptiert.



**Abb. 2.:** Schematische Darstellung der Untergruppen der *armadillo repeat* Proteine ( Verändert nach Hatzfeld und Nachtseim, 1996).

Die Sequenzhomologie der Mitglieder einer Untergruppe ist größer als die zu anderen Untergruppen. Zudem ist die Anzahl und Organisation der *armadillo repeats* innerhalb einer Untergruppe identisch. Weiterhin wird mittlerweile auch das Vorhandensein von Splicevarianten als Klassifizierung herangezogen.

### 1.2.1. Die p120(ctn) verwandten Proteine

Grundsätzlich werden die p120(ctn) verwandten Proteine nochmals in zwei Untergruppen geteilt, zum einen in die Plakophiline und zum zweiten in die p120(ctn) Subfamilie.

Sie alle zeigen Gemeinsamkeiten in der Organisation der *armadillo repeat* Region, unterscheiden sich jedoch sowohl im Grad der Ähnlichkeit zu p120(ctn) als auch in ihrer Subzellulären Lokalisation.

Plakophiline werden über ihren N-Terminus in Desmosomen eingebunden, wo sie Intermediärfilamente koordinieren (Bonne et al., 1999; Hatzfeld et al.,

1994; Heid et al., 1994; Kowalczyk et al., 1999; Schmidt et al., 1999; Schmidt et al., 1997; Smith und Fuchs, 1998).

Die p120(ctn) Subfamilie enthält, neben p120(ctn) selbst, mehrere Proteine. Im einzelnen sind dies ARVCF (**a**rmadillo **r**epeat **g**ene **d**eleted in **v**elo **c**ardio **f**acial **s**yndrome) (Sirotkin et al., 1997), p0071 (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996) und NPRAP/ $\delta$ -Catenin/ Neurojungin (Paffenholz und Franke, 1997; Zhou et al., 1997).

Diese Proteine besitzen in ihrer *armadillo repeat* Region eine Identität von über 45% und binden an die klassischen Cadherine (Huber et al., 1997; Kaufmann et al., 2000; Lu et al., 1999; Mariner et al., 2000; Paffenholz et al., 1999). Sie verfügen über 10 *armadillo repeats*, wobei diese Struktur in *repeat* 4, 6 und 9 unterbrochen ist. Solche Unterbrechungen wurden in  $\beta$ -Catenin anhand von Kristall-Strukturanalysen als so genannte *looped out* Strukturen identifiziert (Huber et al., 1997).

Innerhalb des *loop outs* in *armadillo repeat* 6 weisen die Mitglieder der p120(ctn) Subfamilie ein potentiell NLS (**n**uclear **l**ocalisation **s**ignal) auf. Zudem enthalten diese Proteine innerhalb des N-Terminus ein Motiv, welches als *coiled-coil* Domäne beschrieben wird und generell Protein-Protein Interaktionen vermittelt. Außer p120(ctn) selbst enthalten ARVCF, p0071 und NPRAP/ $\delta$ -Catenin/ Neurojungin die konservierte Proteinsequenz DSWV, welche als PDZ-Bindemotiv vom Typ I identifiziert wurde (Fanning und Anderson, 1998).

Alle Mitglieder der p120(ctn) Subfamilie werden, außer gebunden an die Cadherine, auch im Nukleus beobachtet (Bonne et al., 1999; Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000; Schmidt et al., 1997), was als Hinweis auf eine mögliche Funktion als Signalüberträger zwischen *adherens junctions* und Zellkern gewertet werden kann.

### 1.2.2. p120(ctn)

p120(ctn) wurde ursprünglich als Substrat der Src-Kinase identifiziert, was zunächst zum Namen p120CAS (*cadherin associated substrate*) führte (Reynolds et al., 1992).

Auch p120 ohne Zusatz und p120(ctn) (für: Catenin) bezeichnen dasselbe Protein.

Das Protein wird in verschiedenen Isoformen exprimiert. Es gibt vier N-terminale Startcodons, wobei nur Isoform 1 die coiled-coil Domäne enthält. Im C-Terminus des Proteins gibt es zwei weitere alternative Exons, Exon A und B (Keirsebilck et al., 1998), wobei Exon B zu einem funktionellen NES (*nuclear export signal*) im Protein führt.

Die Bindung von p120(ctn) an die Cadherine erfolgt über deren JMD der cytoplasmatischen Domäne (Daniel und Reynolds, 1995; Reynolds et al., 1996; Shibamoto et al., 1995; Staddon et al., 1995).

Sehr unterschiedlich stellt sich die Rolle von p120(ctn) in Bezug auf die durch Cadherine vermittelte Zelladhäsion dar. Die Befunde sind je nach Art der Wechselwirkung (cis oder trans), untersuchtem Cadherin oder Zelltyp sehr unterschiedlich.

Einerseits scheint die JMD und p120(ctn) einen positiven Effekt auf die Zelladhäsion zu haben. In einem cadherindefizienten Zellsystem unterdrückte eine E-cadherinmutante, welche nicht mehr in der Lage war, p120(ctn) zu binden im Vergleich zu Wild-Typ E-Cadherin die Ausbildung starker Zell-Zelladhäsion in Kultur (Thoreson et al., 2000). Außerdem trägt p120(ctn) in Verbindung mit der JMD zum Cadherin-clustering an den *adherens junctions* bei, welches Voraussetzung für die Zelladhäsion ist (Anastasiadis und Reynolds, 2000), wobei die JMD den größeren Anteil zu haben scheint. Eine JMD-Mutante von N-Cadherin, an welche p120(ctn) nicht mehr binden konnte war, im Gegensatz zur komplett deletierten JMD immer noch in der Lage cadherinabhängige Myotomformation im Embryo zu vermitteln.

Andererseits führen die Deletion der JMD und p120(ctn) Mutanten, welche keine Cadherine mehr binden können in einigen Zelltypen auch zur

Aktivierung der Zell-Zelladhäsion (Thoreson et al., 2000). Dies spricht für eine inhibierende Wirkung von p120(ctn) auf die cadherinvermittelte Zelladhäsion.

Auch bei der Signaltransduktion spielt p120(ctn) eine Rolle, was durch das Vorhandensein eines putativen NLS und eines funktionellen NES sowie der Entdeckung des Proteins als Substrat einer Kinase vermutet werden kann. Im Nukleus konnte eine Interaktion des Proteins mit Kaiso, einem Transkriptionsfaktor der POZ/ZF (*Pox virus and zinc finger*) Superfamilie, nachgewiesen werden (Daniel und Reynolds, 1999). Weiterhin reguliert p120(ctn) die kleinen GTPasen RhoA, Rac und Cdc42, welche ihrerseits eine Rolle bei der Etablierung von cadherinvermittelten Zell-Zellkontakten spielen (Braga et al., 1997). RhoA wird hierbei von p120(ctn) inhibiert (Anastasiadis et al., 2000; Noren et al., 2000), Cdc42 und Rac werden aktiviert (Noren et al., 2000). Somit kann also für p120(ctn) eine duale Rolle in Bezug auf Zelladhäsion/Signaltransduktion, wie sie für andere Catenine wie z.B.  $\beta$ -catenin auch existiert, festgestellt werden.

### 1.2.3. ARVCF

Humanes ARVCF (**A**rmadillo **R**epeat Gene Deleted in **V**elo-**C**ardio **F**acial *Syndrome*) wurde ursprünglich auf Chromosom 22q11 bei einer Suche nach Genen, die in Zusammenhang mit Velo-Cardio-Facialen Syndrom bzw. DiGeorge Syndrom stehen, entdeckt. Dieser Bereich ist bei erkrankten Patienten auffällig häufig deletiert (Desmaze et al., 1993; Kelly et al., 1993; Morrow et al., 1995; Sirotkin et al., 1997). Sowohl humanes als auch murines ARVCF zeigen den für die p120(ctn) Subfamilie typischen Aufbau mit 10 *armadillo repeats* und einer N-terminal gelegenen *coiled-coil* Region. Die Homologie zu p120(ctn) selbst beträgt 56% innerhalb der *armadillo repeats*, Intron-Exon Grenzen sind fast identisch, was auf eine enge evolutive Relation schließen lässt (Keirsebilck et al., 1998). Allerdings ist der Expressionslevel von ARVCF sehr viel geringer als der von p120(ctn) (Mariner et al., 2000).

ARVCF bindet an die JMD verschiedener Cadherine und konnte auch im Nukleus nachgewiesen werden (Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000), wobei die Funktion des Proteins bislang noch weitgehend ungeklärt ist. Das Protein ist ubiquitär in Herz, Plazenta, Lunge, Hirn, Skelettmuskel, Leber, Pankreas und Niere exprimiert und innerhalb der Spezies Huhn, Hamster, *Drosophila*, Schwein und Maus konserviert (Sirotkin et al., 1997).

Es gibt vier humane und acht murine Splicevarianten des Proteins (Sirotkin et al., 1997; Waibler et al., 2001). Im humanen ARVCF kann die *coiled-coil* Domäne durch Nutzung eines alternativen Startcodons herausgespliced werden, zudem kann ein 18 bp langes Exon in *armadillo repeat 6* eingefügt werden, wodurch das NLS modifiziert wird (Sirotkin et al., 1997).

Im murinen Protein gibt es ebenfalls zwei N-terminale Varianten aufgrund alternativer Startcodons, der Splicevariante 5'alt ARVCF fehlt dadurch gegenüber der *Full Length* (FL) Variante die *coiled-coil* Domäne.

Zudem gibt es, im Unterschied zum humanen Protein, vier C-terminale Splicevarianten, welche alle mit den beiden N-terminalen frei kombinierbar sind.

Die beiden am häufigsten auftretenden C-terminalen Varianten sind ARVCF C11 und ARVCF 3/7, wobei in der letzteren Variante durch ein alternatives Exon das PDZ-Bindemotiv DSWV entsteht. In der Variante 3/5 ist ein Exon (Exon 19) herausgespliced, was zu einem veränderten Leserahmen und dadurch zu einem früheren Stopcodon führt. Die längste Variante ist Isoform Y, in welcher ein zusätzliches Exon Y eingefügt ist (Waibler et al., 2001).

### **1.3. Rezeptor Tyrosinkinasen und die Proteine der *Adherens junctions***

Rezeptor Tyrosinkinasen sind Transmembranproteine, welche als Rezeptoren für extrazelluläre Signale und deren Weiterleitung innerhalb der Zelle zuständig sind. Dies wird durch ihre intrazelluläre Tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität gewährleistet.

In vielen Fällen sind bei dieser Signalweiterleitung die *Adherens junctions* bzw. die darin enthaltenen Proteine beteiligt. Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität wie z.B. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), HGFR (Hepatocyte Growth Factor Receptor) c-met, PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) und der *colony stimulating factor* sind als Regulatoren des Adhäsionskomplex bekannt (Fujii, 1996; Hoschuetzky et al., 1994; Shibata et al., 1996).

Die an der Ausbildung von *Adherens junctions* beteiligten Proteine sind in unterschiedlicher Weise in die Weiterleitung dieser Signale involviert.

So ist z.B. E-cadherin direkt, während der Ausbildung von Zell-Zellkontakten, nach einer EGFR Aktivierung für die Signalübertragung zum MAP-Kinaseweg verantwortlich (Pece und Gutkind, 2000).

Weiterhin reduziert der EGFR nach Inkubation von Zellen mit EGF die Interaktion von E-cadherin mit dem Actin-Cytoskelet ohne Einfluss auf die Cateninexpression oder -verteilung zu nehmen. Die Bindung des Cadherin/Catenin Komplexes an Actin,  $\alpha$ -actinin und Vinculin wird durch die erhöhte EGF-Konzentration gelöst, wobei dies mit einer Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -catenin, Plakoglobin und p120(ctn) durch den EGFR einhergeht (Hazan und Norton, 1998).

In den meisten Fällen wird das Signal über die cadherinassoziierten Catenine p120(ctn),  $\beta$ -catenin oder Plakophilin weitergeleitet.

So korreliert eine Phosphorylierung von p120(ctn) durch die Tyrosinkinase pp60 src mit einer Transformation von Zellen, wobei der cytoplasmatische p120(ctn) Anteil in den Zellen gegenüber dem membrangebundenem erhöht ist (Jawhari et al., 1999).

Durch eine Stimulation von Zellen mit VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) konnte eine Dephosphorylierung von p120(ctn) gezeigt werden (Wong et al., 2000). Dieser Effekt trat auch bei einer Aktivierung der PKC auf, was nahe legt, dass diese verschiedenen Stimuli über ein gemeinsames Signalelement weitergeleitet werden (Wong et al., 2000).

Zudem konnte gezeigt werden, dass p120(ctn) beim „scattering“ von Epithelzellen durch die Rezeptor Tyrosinkinase c-met, welche als Signal für die Auflösung der cadherinvermittelten *junctions* bekannt ist, als Coregulator beteiligt ist (Cozzolino et al, 2003).

In Zellen, welche nicht in einem Zellverband stehen kann  $\beta$ -catenin mit dem EGFR assoziieren und es erfolgt eine Tyrosinphosphorylierung des Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung notwendig ist  $\alpha$ -catenin aus dem Cadherin/Catenin Komplex fernzuhalten, bis die Zellen eine bestimmte Konfluenz erreichen und eine Anbindung an das Cytoskelett nötig wird (Takahashi und Suzuki, 1996).

Die Tyrosinphosphorylierung von Plakoglobin hat einen dem  $\beta$ -catenin entgegengesetzten Effekt.

Wird Plakoglobin von Src phosphoryliert, so wird eine verstärkte Anbindung an Desmoplakin, dem  $\alpha$ -catenin Äquivalent in Desmosomen, beobachtet. Dazu passt die Entdeckung, dass bei einer Phosphorylierung von Plakoglobin durch die Tyrosinkinase Fer, die Bindung des Proteins an  $\alpha$ -catenin verstärkt wird (Miravet et al., 2003).

Diese und andere Studien machen deutlich, dass die Aktivierung einzelner Komponenten der *Adherens junctions* eine wichtige Rolle bei der Regulation der Dynamik von Zellen in Bezug auf cadherinvermittelte Zelladhäsion spielt. Eine Änderung der Lokalisation und/oder des Phosphorylierungsstatus als Konsequenz einer Rezeptor Tyrosinkinase vermittelten Aktivierung ist für ARVCF bislang noch nicht bekannt.

#### **1.4. Die Proteinkinase C (PKC) Familie**

Mitglieder der PKC Familie, eine Serin-Threonin Kinase, werden in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Sie spielen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. Zellwachstum und -differenzierung, Remodellierung des Cytoskeletts oder auch Genexpression als Antwort auf unterschiedliche Stimuli, eine Rolle.

Die breite Gewebeverteilung und die Redundanz der *in vitro* Funktionen machen die Zuordnung definitiver Aufgaben für die einzelnen Mitglieder der PKC-Familie schwierig (Tan und Parker, 2003).

Die gesamte PKC-Familie besteht aus mindestens 12 Kinasen, welche aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Calcium und Lipiden in drei Untergruppen eingeteilt werden.

Klassische PKC Isoformen (PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta_1$ , PKC- $\beta_2$  und PKC- $\gamma$ ) werden durch Phosphatidylserin,  $\text{Ca}^{2+}$  und Diacylglycerol (DAG), oder das synthetische DAG Analogon Phorbol myristat acetat (PMA), aktiviert. Die so genannten Neuen PKC Isoformen (PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\eta$ , PKC- $\theta$  und PKC- $\mu$ ) sind  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, brauchen aber DAG (oder PMA). Atypische PKC Isoformen (PKC- $\zeta$ , PKC- $\iota$ , und PKC- $\lambda$ ) brauchen weder  $\text{Ca}^{2+}$  noch DAG, ihr Regulationsmechanismus ist noch unklar (Vlahos et al., 2003).

Viele physiologische Stimuli sind in der Lage, PKC zu aktivieren. Diese PKC-Aktivierung hat einen unterschiedlichen Einfluss auf die Proteine der *adherens junctions*.

So konnte einerseits klar gezeigt werden, dass PKC Isoformen über EGFR aktiviert werden und so einen Einfluss auf die Verteilung und Expression von E-cadherin in Caco-2 Zellen nehmen können, wobei die Struktur der *tight junctions* nicht beeinflusst wird, die *adherens junctions* und somit auch die Zell-Zelladhäsion jedoch negativ reguliert werden (Barbosa et al., 2003). Hierzu passt, dass PKC-Aktivierung die Endocytose von E-cadherin hervorrufen kann, wobei eine Depolymerisation von Actin diesen Vorgang begünstigt. Wird das Cytoskelettprotein Actin hingegen stabilisiert, so wird die Endocytose von E-cadherin reduziert (Le et al., 2002).

Andererseits konnte auch erhöhte Zell-Zelladhäsion durch PKC-Aktivierung beobachtet werden.

In  $\alpha$ -catenin negativen Zellen konnte eine PKC-Aktivierung die Formierung von Desmosomen und eine erhöhte interzelluläre Adhäsion hervorrufen (van Hengel et al., 1997). Zudem konnte die normale epitheliale Morphologie von Kolonkarzinomzellen, bei welchen die Cadherinvermittelte Zell-Zelladhäsion gestört ist, durch Aktivierung der PKC wiederhergestellt werden (Cowell und Garrod, 1999). Stimmig dazu ist die Beobachtung, dass E-cadherin, auch in calciumarmem Medium nach PKC-Aktivierung an den *adherens junctions* zu finden ist und dort an der Rekrutierung und Organisation der anderen *junction* Komponenten beteiligt ist (Lewis et al., 1994).

Auch eine Aktivierung der PKC durch den Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  Rezeptor (TNF- $\alpha$ ) wird beschrieben. Hierbei wird beobachtet, dass es zu einer konstitutiven Aktivierung von ICAM-1 kommt, welches die endotheliale Adhäsivität erhöht. (Javaid et al., 2003). Weiterhin konnte eine Inhibierung des Insulinrezeptor Signalweges durch TNF- $\alpha$  induzierte Aktivierung der PKC beobachtet werden (Rosenzweig et al., 2002).

## **1.5. Kenntnisstand zu Beginn und Ziel dieser Arbeit**

Murines ARVCF wurde mit Hilfe der cytoplasmatischen Domäne von M-cadherin als Köder beim Durchmustern einer cDNA Bank aus i28 Mausmyoblasten, 30h nach Induktion zur Fusion, identifiziert.

Die Domänen, welche für die Interaktion von ARVCF und M-cadherin wichtig sind konnten charakterisiert werden (Kaufmann et al., 2000).

Es wurden zwei N-terminale und vier C-terminale Splicevarianten entdeckt, welche alle frei kombinierbar sind (Waibler et al., 2001).

Weiterhin wurde eine Lokalisation des Proteins sowohl an der Zellmembran als auch im Zellkern beobachtet, wobei es einem effektiven Export-Mechanismus unterliegt (Waibler, 2002).

Da noch nichts über die Funktion von ARVCF bekannt ist, sollte zunächst ein Hefe Zweihybrid *screen* mit zwei Deletionsmutanten des Proteins als Köderprotein durchgeführt werden, um über neue Interaktionspartner eventuell auf eine Funktion von ARVCF schließen zu können.

Im Hinblick auf die duale Rolle von p120(ctn) in Adhäsion bzw. Signaltransduktion und der dualen Verteilung von ARVCF an der Zellmembran und im Nukleus sollte untersucht werden, ob ARVCF eine Rolle als Signalmolekül in der Zelle einnehmen kann.

## **2 Material**

### **2.1. Chemikalien**

Alle Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Merck Eurolab Darmstadt, Roth Karlsruhe, Sigma-Aldrich Steinheim, Amersham Pharmacia Freiburg, Fluka Buchs Pharmacia LKB, Freiburg und Roche, Mannheim bezogen. Andere Bezugsquellen sind vermerkt.

### **2.2. Lösungen, Puffer, Zusätze und Seren**

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser (aqua bidest; ddH<sub>2</sub>O) aus der Anlage „Milli-Q-Water-System“ (Fa. Millipore, Eschborn) hergestellt.

Für das Arbeiten mit Nukleinsäuren und Bakterien wurden alle Lösungen und Puffer, wenn nicht anders angegeben, autoklaviert (20 min. bei 121°C und 2,0 bar) oder im Falle der Hitzeinstabilität steril filtriert (Sterilfilter: 0,22µm Porenweite, Fa Millipore). Dies gilt auch für Puffer und Lösungen, die in der Zellkultur Verwendung finden.

Alle Medien und Lösungen, die in der Zellkultur eingesetzt werden, wurden nach dem Autoklavieren bzw. Sterilfiltrieren einer Sterilitätskontrolle unterzogen.

**A****X%ige Agaroselösung**

X g Agarose  
 In 100 ml 0,5 X  
 TBE mit 0,2µg/ml EtBr  
 aufkochen

**Ampicillin-Stammlösung**

100 mg/ml Ampicillin  
 in ddH<sub>2</sub>O  
 lösen, bei  
 -20°C lagern

**B****Blocking-Puffer für Western****Blots**

1X PBS  
 0,2% Tween 20  
 4% Milchpulver

**Blotting Puffer für Western Blots**

25mM Tris-HCL, pH8,8  
 150mM Glycin  
 5/10% Methanol

**C****Chloramphenicol-Stammlösung**

10 mg/ml Chloramphenicol  
 in 70%igem  
 Ethanol lösen,  
 bei 4°C lagern.

**Coomassie-Färbelösung**

30% Methanol (v/v)  
 10% Essigsäure  
 0,125% Coomassie  
 Brilliantblau

**D****DEPC-H<sub>2</sub>O**

0,1% Diethylpyrocarbonat  
 (v/v)  
*ad* 1L H<sub>2</sub>O bidest  
 12h nach DEPC Zugabe  
 autoklavieren

**6x DNA-Probenpuffer**

0,1% Bromphenolblau  
 (w/v)  
 0,1% Xylencyanol  
 (w/v)  
 10 mM EDTA  
 40% Glycerin (v/v)  
 nicht autoklavieren

**DNA-Größenmarker**

15µl 1Kb DNA- *ladder*  
 60µl 6x DNA-Probenpuffer  
 225µl H<sub>2</sub>O bidest

**DMEM (Medium für die Zellkultur)**

13,38 g/l DMEM  
Trockenmedium  
(Dulbecco's  
modified Eagles  
Medium)(4500  
mg/ml Glucose,  
Fa. Gibco BRL).

3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub> pH mit  
1 M HCL einstellen,  
sterilfiltrieren,  
bei 4°C lagern.

**E  
Entwicklungspuffer für Western  
Blots**

100mM NaCl  
50mM MgCl<sub>2</sub>  
100mM Tris-HCL pH 9,5

**Ethidiumbromid-Stammlösung**

10 mg/ml EtBr in 0,5x TBE  
lösen. Nicht  
autoklavieren,  
lichtgeschützt  
unter dem Abzug  
lagern.

**Ethidiumbromid Färbelösung**

20µl EtBr  
Stammlösung  
ad1L 0,5x TBE

**F****F10 (Medium für die Zellkultur)**

9,8 g/l Nutrient Mixture  
Ham's F 10 (Fa.  
Gibco BRL)

1,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> pH mit  
1M HCL  
einstellen,  
sterilfiltrieren,  
bei 4°C lagern

**FCS (Serum für die Zellkultur,  
Fa. Costar)**

Vom Hersteller auf  
Mycoplasmen- und  
Virenkontamination  
getestet.  
Langzeitlagerung bei -  
80°C; Aliquots bei 4°C  
lagern.

**G****Gefrier-Medium (für die  
Zellkultur)**

65% DMEM bzw. F10 (v/v)  
20% FCS (v/v)  
15% DMSO (v/v), frisch  
ansetzen.

**H****Hoechst 33258- Stammlösung  
(10mg/ml)**

0,5 mg/ml Hoechst 33258  
bei 4°C lichtgeschützt lagern.

**Hoechst 33258-Gebrauchslösung  
(2µg/ml)**

Hoechst 33258-Stammlösung  
1:5000 in 1x PBS verdünnen.

**Hefe-Lysepuffer**

2%(v/v) Triton-X100  
1%(w/v) SDS  
100 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl pH 8  
1 mM EDTA  
autoklavieren

**I****IPTG-Stammlösung**

1 M Isopropyl-β-D-thio-  
Galaktopyranosid  
in ddH<sub>2</sub>O lösen.  
Sterilfiltrieren,  
lichtgeschützt bei 4°C  
lagern.

**K****Kanamycin-Stammlösung**

30 mg/ml Kanamycin in  
ddH<sub>2</sub>O lösen,

bei 4°C lagern.

**L****Lysozym**

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
10 mg/ml Lysozym.  
Nicht  
autoklavieren,  
aliquotieren, bei  
-20°C lagern.

**LB-Medium (1Liter)**

10 g NaCl  
10 g Casein  
Hydrolysat  
5 g Hefeextrakt  
add 1l ddH<sub>2</sub>O.  
pH 7,0 mit 5N

NaOH einstellen,  
autoklavieren.

**LB-Agar**

20g Agar zu LB  
Medium, nach  
dem  
autoklavieren  
auf 55°C  
abkühlen lassen,  
Platten gießen.

**LB-Selektionsmedien**

1 Liter	LB-Medium (55°C)
30 mg/1	Chloramphenicol bzw. Kanamycin bzw.
100 mg/1	Ampicillin zugeben.

**LB-Selektionsplatten**

1 Liter	LB-Agar (55°C)
30 mg/1	Chloramphenicol bzw. Kanamycin bzw.
100 mg/1	Ampicillin zugeben, Platten gießen.

**M****10x MOPS**

0,2 M	3-(N-morpholin)- propansulfon- säure
80 mM	Na-Acetat
10 mM	EDTA pH 7 mit NaOH einstellen. Sterilfiltrieren, lichtgeschützt bei 4°C lagern.

**N****3M Na-Acetat pH 5,2**

Na-Acetat in  
ddH<sub>2</sub>O lösen, pH  
5,2 mit 96%iger  
Essigsäure  
einstellen,  
autoklavieren.

**NBT/BCIP-Lösung**

2,5ml	Entwicklungs- puffer
50µl	NBT/BCIP- Stammlösung, Fa.Roche, Mannheim

**NENT-Puffer**

100mM	NaCl
20mM	Tris-HCl pH 8
1mM	EDTA
0,5%	NP40

Steril filtrieren und bei 4°C lagern.

**P****Penicillin/Streptomycin Lösung  
(Antibiotikum für die Zellkultur,  
Fa. Gibco BRL)**

10.000 U/ml	Penicillin (50 U/ml)
100.000 µg/ml	Strepto- mycin (100 µg/ml),

aliquotieren, bei 4°C lagern.

**Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol**  
(25:24:1; Fa. Roth)

**10X PBS**

80g	NaCl
2g	KCl
14,42g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2
	H <sub>2</sub> O
2g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2

bis 7,4 mit HCL einstellen.

**4% Paraformaldehydlösung**

4g	Paraformaldehyd
100ml	1x PBS

bei 60°C inkubieren bis PFA gelöst ist, in Aliquots zu 50ml bei -20°C lagern.

**PAA-Stammlösung (Fa. Biorad)**

145 g	Acrylamid
5 g	Bis (N,N'-Methylen-bis-Acrylamid)

**PAA-Sammelgel**

0,4ml	50%(w/v) PAA-Stammlösung
0,8ml	0,62M Tris-HCl pH 6,9
0,16ml	2,5% SDS
2,64ml	H <sub>2</sub> O bidest
20µl	10% APS
4µl	Temed

**PAA-Trenngel 8%**

1ml	KCl
1,2ml	1,88M Tris-HCl pH 8,8
0,25ml	2,5% SDS
3,5ml	H <sub>2</sub> O bidest
30µl	10% APS
5µl	Temed

**50% PEG<sub>4000</sub>**

(Polyethylenglycol)  
50% (w/v) PEG  
50% ddH<sub>2</sub>O

**R**

**RIPA-Puffer**

0,5%	Na-Desoxychelat
1%	(v/v) NP40
0,1%	SDS
1mM	EDTA

in 1x PBS lösen und pro 50ml 1 Tablette Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Fa. Roche, zugeben. Lagerung max. 1 Monat bei 4°C.

**S****Stripping-Puffer für Western****Blots**

100 mM	β-Mercaptoethanol
2%	SDS
62,5 mM	Tris-HCL pH 6,7

**5 x SDS Probenpuffer**

5%	SDS
20%	Glycerin(v/v)
0,2%	Bromphenolblau
250 mM	DTT
26 mM	Tris-HCl pH 6,8

**1 x SDS Elektrophoresepuffer**

25 mM	Tris HCl
250 mM	Glycin
0,1%	SDS

**STET-Lösung (Holmes & Quigley, 1981)**

50 mM	Tris-HCl
50 mM	EDTA
0,5%	Triton-X-100 (v/v)
8%	Saccharose (w/v)
	sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.

**SD-Medium**

5 g	Ammoniumsulfat
1,7 g	Nitrogenbase ohne Amminosäuren
20 g	Glucose
900 ml	ddH <sub>2</sub> O
100 ml	Dropoutlösung
pH 6,3	mit KOH einstellen, autoklavieren

**T****10 x TE-Puffer**

100 mM	Tris-HCl pH 8,8
10 mM	EDTA pH 8

**Trypsin-Lösung (für die Zellkultur)**

0,8 g	NaCl
0,4 g	KCl
1 g	Glucose
0,58 g	NaHCO <sub>3</sub>
1 g	Trypsin (Fa. United States Biochemical Corporation)
0,2 g	EDTA
	add 1 l ddH <sub>2</sub> O
	sterilfiltrieren, aliquotieren, bei 4°C lagern.

**10 x TBE Puffer**

890 mM	Tris-Base
890 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Borsäure)
25 mM	EDTA

**1x TBS**

150mM	NaCl
10mM	Tris-HCl pH 7,5

**1 x TAE**

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	EDTA

**1 M Tris pH X**

Tris Base in ddH<sub>2</sub>O lösen und mit HCl den gewünschten pH einstellen.

**TFB I Puffer**

30 mM	K-Acetat
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
15%	Glycerin (v/v)

mit 0,2 N NaOH auf pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.

**TFB II Puffer**

10 mM	MOPS pH 7,5
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl
15%	Glycerin (v/v)

sterilfiltrieren,

bei 4°C lagern.

**TWB**

20mM	Hepes pH 7,9
60mM	NaCl
6mM	MgCl <sub>2</sub>
8,2%	Glycerin (v/v)
0,1mM	EDTA

Steril filtrieren und bei 4°C lagern

**Y****YPAD-Medium (pro Liter)**

40 mg	Adeninsulfat
10g	Hefeextrakt
20g	Gelatine- hydrolysat
20g	Glucose

mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH 5,89 einstellen, autoklavieren.

**X****X-Gal**

(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid)

20 mg/ml X-Gal in N/N-Dimethylformamid lösen. Bei -20°C lagern

**Z****Z-Puffer**

16,1 g	NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
--------	--

5,5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,75 g  $\text{KCl}$

0,246 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

auffüllen mit dd  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7  
einstellen, autoklavieren, bei  $4^\circ\text{C}$   
lagern

**10 x Dropout Medium**

Nachstehend erfasst die Tabelle alle notwendigen Aminosäuren und organischen Basen zur Herstellung eines *Dropout Mediums*. Komponenten, welche im Hefe Zweihybrid System eine Selektion ermöglichen, wurden entsprechend zugefügt oder weggelassen. Es handelt sich hierbei um die Aminosäuren Tryptophan, Leucin und Histidin, sowie um die anorganische Base Adenin.

Komponente	Menge (mg/L)
L-Isoleucin	300
L-Valin	1500
L-Adenin Hemisulfat <sup>a</sup>	200
L-Arginin HCl	200
L-Histidin HCl- Monohydrat <sup>a</sup>	200
L-Leucin <sup>b</sup>	1000
L-Lysin HCl	300
L-Methionin	200
L-Phenylalanin	500
L-Threonin	2000
L-Tryptophan <sup>c</sup>	200
L-Tyrosin	300
L-Uracil	200
L-Glutaminsäure	1000
L-Asparaginsäure	1000
L-serin	400

<sup>a</sup> weglassen selektioniert Interaktionen im Zweihybrid System

<sup>b</sup> weglassen selektioniert den pAD-GAL4 Vektor

<sup>c</sup> weglassen selektioniert den pBD-GAL4 Cam Vektor

### 2.3. Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und Nukleinsäure-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Gibco BRL, MBI-Fermentas, Stratagene bzw. Amersham Pharmacia bezogen. Die Enzyme werden in einem Glycerinhaltigen Puffer bei -20°C geliefert und gelagert. Sie kommen unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen, unter Verwendung der mitgelieferten Puffer, zum Einsatz.

### 2.4. Bakterienstämme

<b>Stamm</b>	<b>Referenz</b>
E.coli BL21 (DE3) pLysS	(Studier und Moffatt, 1986)
E.coli DH5 $\alpha$	(Bachmann, 1983)
E.coli stb12	Gibco BRL
E.coli XL I Blue	(Bullock et al., 1987)

### 2.5. Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
MCF7	Humane Brustkrebszelllinie	ATCC:HTB 22
C2C12	Maus Myoblasten	(Yaffe and Saxl, 1977)
MDCK	Hundenierenepithel	ATCC:CCL34

## 2.6. Größenmarker

### 1 kb- DNA-ladder Größenstandard (Fa. Gibco BRL)

Fragmentgrößen (bp)

12.216; 11.198; 10.180; 9.162; 8.144; 7.126; 6.108; 5.090; 4.072; 3.054;  
2.036; 1.636; 1.018; 517/506; 396; 344; 298; 201; 154; 134; 75

### SDS-Molecular Weight Marker (7B; Fa. Sigma)

<u>Protein</u>	<u>MW (DA)</u>
$\alpha$ -Makroglobulin	180.000
$\beta$ -Glucosidase	116.000
Fructose-6-Phosphatkinase	84.000
Pyruvatkinase	58.000
Fumarase	48.500
Lactat-Dehydrogenase	36.500
Triosephosphat-Isomerase	26.600

## 2.7. Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys bezogen.

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben.

Fettgedruckte Nukleotide wurden im Primer gegenüber der Originalsequenz ausgetauscht.

**ARVCF-spezifische Oligonukleotide für einzelne Aminosäure-substitutionen in potentiellen PKC-sites**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Nukleotidsequenz</u>
T 34A 5´	CAGAAGATGGT <b>G</b> CAACCCGGCGGACTG
T 34A 3´	CAGTCCGCCGGGTTG <b>C</b> ACCATCTTCTG
T 35A 5´	GAAGATGGTACAG <b>G</b> CCCGGGCGGACTGAG
T 35A 3´	CTCAGTCCGCCGGG <b>C</b> TGTACCATCTTC
T 45A 5´	AAGGTCACTAAG <b>G</b> CGGTCAAGACTGTG
T 45A 3´	CACAGTCTTGACCG <b>C</b> CTTAGTGACCTT
T 50A 5´	GTCAAGACTGTG <b>G</b> CCACAAGGACAGTAC
T 50A 3´	GTA <b>C</b> TGTCCTTGTGG <b>C</b> CACAGTCTTGAC
T 53A 5´	GTGACCACAAGG <b>G</b> CAGTACGCCAGGTG
T 53A 3´	CACCTGGCGTACTG <b>C</b> CCTTGTGGTCAC
S165A 5´	TCCGGACCACCAG <b>G</b> CCGGCCGCTCTCTG
S165A 3´	CAGAGAGCGGCCG <b>G</b> CTGGTCCGGA
T205A 5´	CTATAGCACGGCAG <b>G</b> CCCGGAGAAGACCTG
T205A 3´	CAGGTCTTCTCCGGG <b>C</b> TGCCGTGCTATAG
S247A 5´	CCTTCAGTGGAT <b>G</b> CCACCCGCAAGGAG
S247A 3´	CTCCTTGCGGGT <b>G</b> GCATCCACTGAAGG
T248A 5´	CCTTCAGTGGATAG <b>C</b> CCCGCAAGGAGCCAC
T248A 3´	GTGGCTCCTTGC <b>G</b> GGCGCTATCCACTGAAGG

**Flankierende ARVCF-Oligonukleotide**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Nukleotidsequenz</u>
5´alt EcoRI	AAAA <b>GAATTC</b> ATGCCAGAGGCACCC
3´SalI	TTT <b>GTCGACT</b> CAAGATGGCGGGCC

**p120(ctn) spezifische Oligonukleotide**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Nukleotidsequenz</u>
P120 5´EcoRI	AAAA <b>GAATTC</b> ATGGACGACTCAGAG
P120 3´KpnI	AAAA <b>AGTACC</b> CCTAAATCTTCTGCAT

### **Oligonukleotide für die Herstellung chimärer Moleküle**

<u>Bezeichnung</u>	<u>Nukleotidsequenz</u>
Rest ARVCF 5´	CAGCCTGAGAGGGGCAGCCTGGGCAGCTTG
Rest p120(ctn) 5´	CAGCATGAGCGGGGCAGTTTAGCAAGCTTG
NT ARVCF 3´	CAGGCTGCCCTCTCAGGCTGGGCCAGAGG
NT p120(ctn) 3´	TAAACTGCCCCGCTCATGCTGAGCTAAAGG

### **2.8. Plasmide**

<u>Plasmid</u>	<u>Herkunft/Referenz</u>
pGEX5X1	Fa. Pharmacia
pEGFP- C1, -C2, -C3	Fa. Clontech
MOM 70 E-cad	M. Rüdiger, Abt. Prof. Jockusch, TU Braunschweig
pBD GAL4 Cam	Fa. Stratagene
pAD GAL4	Fa. Stratagene

### **2.9. Zugriffsnummern für Nukleotidsequenzen (accession number)**

Mit Hilfe der unten aufgeführten Zugriffsnummern für Nukleotidsequenzen lassen sich in der Genbank oder der EMBL-Datenbank die entsprechenden Sequenzdateien laden.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Organismus</u>	<u>Zugriffsnummer</u>
ARVCF	murin	AJ243418
Beta-catenin	murin	M90364
BiP	murin	AJ002387
M-cadherin	murin	M74541
E-cadherin	murin	X06115
p120(ctn)	murin	Z17804

## 2.10. Antikörper

### Primäre Antikörper

Antikörper		WB	IP	IF	Herkunft/Referenz
Maus- $\alpha$ -E-cadherin 5H9	mono			1:40	Fa. Monosan
Maus- $\alpha$ -p120(ctn)	mono	1:1000		1:100	Fa. Transduction Laboratories
Maus- $\alpha$ - $\beta$ -catenin	mono	1.500		1:100	Fa. Transduction Laboratories
Maus- $\alpha$ -Birkenprofilin	mono			1:50	M. Rüdiger, Abt. Prof. Jockusch, TU Braun- schweig
Maus- $\alpha$ -GFP	mono	1:1000	1:1000		Fa. Clontech
Maus- $\alpha$ -alpha-actinin	mono	1:1000		1:400	Fa. Dianova

WB=Western Blot; IP=Immunopräzipitation; IF=Immunofluoreszenz

### Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung		Herkunft/Referenz
Ziege- $\alpha$ -Maus IgG (H+L) Alkalische Phosphatase-konjugiert	1:15.000	WB	Fa. Jackson
Ziege- $\alpha$ -Maus IgG (H+L) Alexa Fluor™ 594 (Rot)	1:400	IF	Fa. Molecular Probes
Ziege- $\alpha$ -Maus IgG (H+L) Alexa Fluor™ 488 (Grün)	1:400	IF	Fa. Molecular Probes

## 2.11. Kits und Transfektionsreagenzien

CONCERT™ High Purity Plasmid Midiprep System (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe)

CONCERT™ High Purity Plasmid Miniprep System (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe)

CONCERT™ Rapid Gel Extraction System (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe)

Effectene™ Transfection Reagent (Fa. Qiagen, Hilden)

Polyfect® Transfection Reagent (Fa. Qiagen, Hilden)

TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System (Fa. Promega)

## 2.12. Geräte

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
Autoklav	Bioklav/ Fa. Schütt
Brutschränke	Cytoperm, Fa. Heraeus
Elektrophorese-Kammern	Gelelektrophoresesystem HE 33, Fa. Hofer Biometra-Multigel, Fa. Biometra
Filmentwicklermaschine	Curix 60, Fa. Agfa-Gevaert
Geltrockner	Fa. Biometra
Heizblöcke	DRI-Block DB3, Fa. Techne
Inkubationsschüttelschrank	Fa. Heraeus
Magnetrührer	Ika-Combimag RCO
Mikroskope	Axiophot, Fa. Zeiss Axiovert 135, Fa. Zeiss
Netzgeräte	Biometra P22, Fa. Braun MultiDrive XL, Fa. Pharmacia LKB
PCR-Cycler	PTC-100 Programmable Thermal Controller, Fa. MJ Research Mini Cycler™, Fa. MJ Research
pH-Meter	Mikroprozessor pH-Meter pH537, Fa. WTW

Photodokumentationssystem	Cybertech Image Documentation system, Fa. Cybertech
Pipetierhilfe	Fa. Hirschmann
Schüttelgerät	Swip, Fa. Edmund Bühler
Schüttelwasserbad, Heizbar	CERTOMAT WR, Fa. Braun
Schwenkgerät	Fa. Heidolph
Spektrometer	Ultraspec Plus Spectrophotometer, Fa. Pharmacia LKB
Sterilbänke	Lamin Air HB2448, Fa. Heraeus
Vortex-Gerät	Fa. Bender und Hobein, Zürich
Waagen	Laborwaage LC 4200, Fa. Sartorius Laborwaage LC 420, Fa. Sartorius
Wasserbäder	MGW, Lauda C20
Zentrifugen	Biofuge 13, Fa. Heraeus Biofuge 15R, Fa. Heraeus Biofuge 28RS, Fa. Heraeus Megafuge 1.0R, Fa. Heraeus Varifuge 20RS, Fa. Heraeus DIGIFUGE, Fa. Heraeus

---

### 2.13. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser, 22mm	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Einmalspritzen	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Einweghandschuhe	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Kunststoffwaren	Fa. Greiner, Solingen
Nitrozellulosefilter	Fa. Amersham, Buckinghamshire
Hybond C extra®	
Objektträger	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Papiertücher	Fa. Fisher Scientific, Nidderau

Parafilm "M"

Fa. American National Can., Neenah

---

## 3 Methoden

Die unter 2.11. aufgeführten *Kits* und Transfektionsreagenzien wurden nach Herstellerangaben eingesetzt und werden deshalb in den Methoden nicht weiter beschrieben.

### 3.1. Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung von Nukleinsäuren erfolgte nach Sambrook et al., 1989.

### 3.2. Reinigung von Nukleinsäuren

#### Sephadex G50-Säulenchromatographie

Mit Hilfe der Sephadex G50-Säulenchromatographie ist es möglich, hochmolekulare wässrige DNA-Lösungen aufzureinigen. Hierbei bildet Sephadex G50 (Fa. Pharmacia) ein Molekularsieb, in welchem kleine Moleküle, Salze und freie Nukleotide zurückgehalten werden. Die gereinigte DNA befindet sich im Eluat. Die Sephadex G50-Säulenchromatographie erfolgt nach Maniatis et al., 1982.

### 3.3. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Für die Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration macht man sich folgende Tatsachen zu Nutze:

- Moleküle besitzen ein charakteristisches Absorptionsspektrum
- Die Stärke der Absorption hängt von der Konzentration der Moleküle ab, wenn bei gleich bleibender Schichtdicke die Absorption des Lösungsmittels abgezogen wird.

Für die Absorption gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$I = I_0 e^{-kd}, \text{ wobei gilt:}$$

I= Intensität der Wellenstrahlung beim Durchlaufen der Schichtdicke d

$I_0$  = Intensität des eingestrahlten Lichts

$d$  = Schichtdicke

$k$  = Absorptionskoeffizient

Das Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren liegt bei 260nm. Ihr Spektrum unterscheidet sich von dem der Proteine, so dass Verunreinigungen durch Überlagerung der Spektren festgestellt werden kann. Nach der Messung kann die Konzentration der Nucleinsäuren mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Nucleinsäure Konzentration} = \frac{\text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Formfaktor}}{1000}$$

Der Formfaktor für DNA beträgt 50, für RNA 40.

### **3.4. *Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration***

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach Bradford, 1976. 5µl einer Proteinlösung werden mit 200µl BIO-RAD Protein-Assay Reagenz (Fa. Biorad) und 800µl ddH<sub>2</sub>O vermischt, 5 min. inkubiert und anschließend bei 595nm im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Proteinkonzentration} = \frac{\text{Extinktion}_{595\text{nm}} \times 19,88\mu\text{g}/\mu\text{l}}{\text{Eingesetzte Proteinlösung in } \mu\text{l}}$$

### **3.5. Präparation von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* stehen je nach Verwendungszweck und benötigtem Reinheitsgrad verschiedene Methoden zur Verfügung.

#### Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Diese Technik erlaubt eine schnelle Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Der Reinheitsgrad der DNA ist hierbei jedoch gering. Die Schnellpräparation erfolgt nach Holmes und Quigley, 1981.

### **3.6. Gelelektrophorese (Maniatis et al., 1982)**

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, welche eine Auftrennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld nach Ihrer Größe ermöglicht. Sie kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden. Nukleinsäuren weisen aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Gerüsts bei allen pH-Werten eine negative Gesamtladung auf und wandern somit zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist bei konstanter Feldstärke, Agarosekonzentration und Geldicke proportional zu Ihrer Molekülgröße. Um die absolute Größe der Nukleinsäuren bestimmen zu können, wird neben diesen ein definierter Größenstandard im Gel aufgetrennt.

### 3.6.1. Native Gelelektrophorese

Die Agarosekonzentration des verwendeten Gels richtet sich nach der erwarteten Größe der zu trennenden Moleküle.

Agarosekonzentration (%w/v) des Gels	Größe der zu trennenden DNA-Fragmente in kb
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

- Die Agarose wird durch aufkochen in 0,5 x TBE-Puffer (mit Ethidiumbromid) gelöst und flüssig in eine horizontale Gelkammer gegossen.
- Nach dem Erstarren der Agarose wird das Gel mit 0,5 x TBE überschichtet.
- Die Proben werden mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Anschließend wird eine Spannung von 5V/cm angelegt und die Proben elektrophoretisch aufgetrennt.
- Die mit Ethidiumbromid versetzte DNA wird durch Bestrahlung mit UV-Licht (ca. 300nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis mittels eines Photodokumentationssystems festgehalten.

### 3.6.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses Natriumdodecylsulfat (SDS) und denaturierenden Reagenzien wie z.B.

Harnstoff entsprechend Ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich in einem konstanten Verhältnis an die Proteine und kompensiert die Ladung, so dass alle Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, wodurch diese sich zu gestreckten Polypeptidketten entfalten. Einzelne Proteine werden aus ihren Assoziationen mit anderen Molekülen freigesetzt. Je nach Proteingröße lässt sich die Porengröße des Gels variieren, indem unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid eingesetzt werden. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert und wandern von dort in das Trenngel ein. Die beiden Gelschichten unterscheiden sich in ihrem pH-Wert.

### **3.7. Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau**

Zur Detektion von Proteinen in PAA-Gelen im  $\mu\text{g}$  Bereich werden die Gele für ca. 30min. in Coomassielösung inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung entfärbt. Das Entfärben wird unter mehrmaligem Badwechsel durchgeführt, bis die angefärbten Proteinbanden sichtbar werden.

### **3.8. Autoradiographie**

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen werden zunächst für ca. 15 min. in Entfärbelösung fixiert. Anschließend werden sie auf Whatman-Papier (Fa. Amersham) überführt, mit Haushaltsfolie bedeckt und auf einem Geltdrockner unter Vakuum bei ca.  $80^{\circ}\text{C}$  für mindestens 1h getrocknet. Es wird ein Röntgenfilm aufgelegt, welcher nach geeigneter Expositionszeit entwickelt wird.

### 3.9. Herstellung kompetenter Bakterienzellen

- Aus einem Glycerolstock werden 3ml LB-Medium angeimpft und ü/N bei 37°C mit 200rpm geschüttelt
- 1ml der Übernachtskultur wird mit 99ml LB-Medium überimpft (1:100) und 2-3h bei 37°C und 200rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht ist.
- Die Kultur wird für 10min. auf Eis abgekühlt und anschließend 5 min. bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 30 ml TFBII-Puffer (4°C) resuspendiert.
- 30 min. auf Eis inkubieren und anschließend 5 min. bei 4°C und 3000 rpm zentrifugieren.
- Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml TFBII-Puffer (4°C) resuspendiert.
- Je 200 µl dieser Suspension werden auf vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und in Aliquots sofort bei -80°C eingefroren.
- Die Transformationseffizienz wird durch Transformation von 1 ng zirkulärer Plasmid-DNA bestimmt und wie folgt errechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Kolonienzahl} \times \text{Verdünnung} \times 1000 \times 10}{\text{Eingesetzte Plasmid-DNA in ng}}$$

Faktor 1000 = Umrechnungsfaktor von ng auf µg

Faktor 10 = aufgrund 100 µl ausplattierter Bakteriensuspension

Die Transformationseffizienz sollte mindestens  $1 \times 10^6$  Transformanden/µg DNA betragen.

### 3.10. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen erfolgt nach Hanahan, 1985.

### 3.11. Anlegen eines Glycerolstocks

826 µl einer frischen Übernachtskultur werden mit 174 µl einer 87%igen sterilen Glycerinlösung versetzt und in einem Eppendorf-Gefäß bei -80°C gelagert.

### 3.12. Enzymkatalysierte Modifikationen von DNA

#### Restriktionsspaltung (Nathans und Smith, 1975)

Restriktionsendonukleasen spalten Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Man unterscheidet Restriktionsenzyme vom Typ I, II und III. In der Molekularbiologie werden im Allgemeinen die Restriktionsenzyme vom Typ II eingesetzt, bei welchen die Erkennungssequenz auf dem DNA-Doppelstrang auch der Schnittstelle entsprechen. Es entstehen entweder stumpfe (*blunt ends*) oder kohäsive (*sticky ends*) Enden.

Die Reaktion wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die eingesetzte DNA-Menge sollte maximal 1/3 des gesamten Restriktionsansatzes betragen. Pro µg DNA werden mindestens 2 U Enzym eingesetzt, wobei die Enzymmenge aufgrund der inhibierenden Wirkung des Glycerins, 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten sollte. Es werden die von den Herstellern gelieferten 10 x Reaktionspuffer verwendet. Wenn nicht anders angegeben werden die Reaktionen für 1 h bei 37°C durchgeführt.

#### Dephosphorylierung

Das einbringen eines DNA-Fragments in einen Vektor, der zwei gleiche Enden aufweist, kann durch die Religation des Vektors erschwert werden. Durch eine hydrolytische Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe des Vektors mittels alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIAP, Fa. MBI Fermentas) kann diese Religation verhindert werden. Hierfür wird der Vektor

mit 1 U des Enzyms für 30 min. bei 37°C im zugehörigen Puffer inkubiert. Nach Abschluss der Reaktion muss die Phosphatase durch Gelelektrophorese von der DNA getrennt werden.

### Phosphorylierung

Zum klonieren von PCR-Produkten ist es notwendig, diese vorher zu phosphorylieren. Dies erfolgt mit Hilfe der Polynukleotidkinase /PNK, Fa. MBI Fermentas) unter Einsatz von ATP (nicht dATP!!) nach Herstellerangaben.

### Auffüllreaktion

Mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I lassen sich 5´ überhängende Enden doppelsträngiger DNA-Moleküle mit dNTP's auffüllen. Die Reaktion erfolgt nach Herstellerangaben.

### Ligation von DNA-Doppelsträngen

Die T4-DNA-Ligase katalysiert ATP-abhängig die Verbindung von 3´-hydroxyl- und 5´-Phosphatgruppen zu Phosphodiesterbindungen. Die Ligation wird in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Menge an linearisiertem Vektor beträgt 50 bis 100 ng. Das zu klonierende DNA-Fragment wird in 2-5fachem (*sticky ends*) bzw. 10fachem (*blunt ends*) molarem Überschuss eingesetzt.

Ligationsansatz:

- x µl linearisierter Vektor
- X µl linearisiertes *Insert*
- 4 µl 5 x Ligasepuffer incl. ATP (Fa. MBI Fermentas)
- 1 µl T4-DNA-Ligase 1 U/µl (Fa. MBI Fermentas)
- add. 20 µl ddH<sub>2</sub>O

## **3.13. Polymerase Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985)**

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren, das die Amplifikation definierter Nukleinsäuresequenzen ermöglicht. Für die Reaktion werden hitzebeständige

Polymerasen eingesetzt. Die Synthese erfolgt in drei Reaktionsschritten, welche zyklisch wiederholt werden:

1. Denaturierung der Doppelsträngigen Matritzen-DNA
2. Hybridisierung der Oligonukleotidprimer
3. Synthese des Doppelstrangs

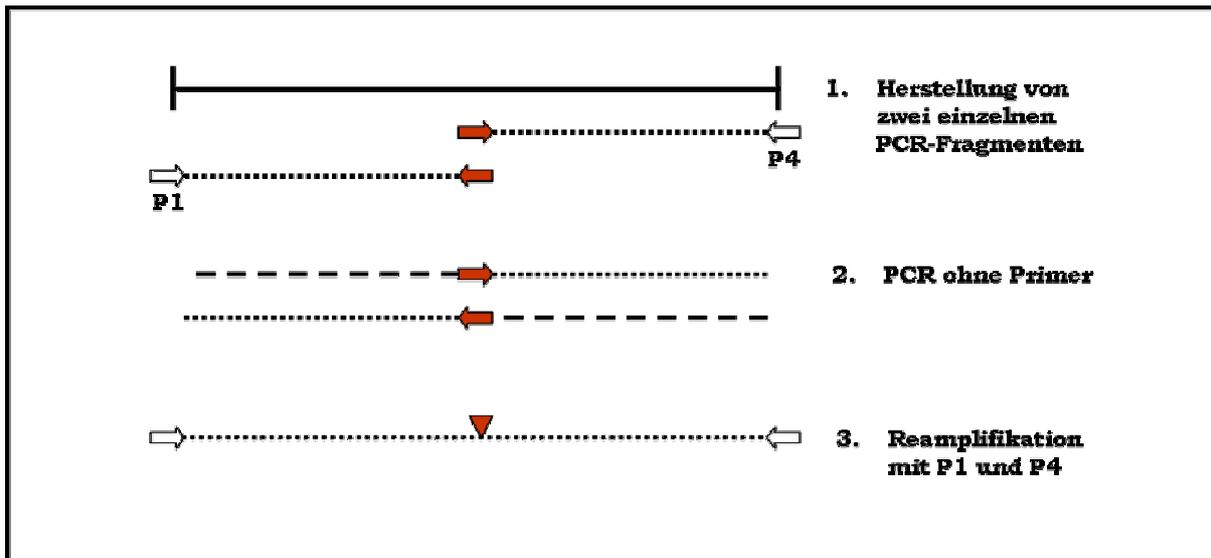
Reaktionsansatz für 50 µl Gesamtvolumen:

5 µl 10 x PCR-Puffer  
2 µl MgCl<sub>2</sub>  
4 µl 5´ Primer (5 pmol/µl)  
4 µl 3´ Primer (5 pmol/µl)  
1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)  
0,2 µl Polymerase (5 U/µl)  
1 µl Matritzen-DNA (1 bis 100 ng)  
*add.* 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Alle Parameter der PCR müssen für jede Reaktion individuell eingestellt werden.

#### „PCR ohne Primer“

Die „PCR ohne Primer“ wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Herstellung von Punktmutanten und chimären Proteinen herangezogen. Diese Technik wird in Abb. 3 erläutert.



**Abb. 3.:** Schematische Darstellung der „PCR ohne Primer“.

- 1.) Herstellung zweier überlappender PCR-Fragmente, die an der überlappenden Stelle durch *Primer* (hier in Rot) die gewünschte Mutation tragen.
- 2.) Die aufgereinigten Fragmente aus Schritt 1 werden in dieser zweiten PCR eingesetzt. Hierbei dienen die sich überlappenden Fragmente als *Primer*.
- 3.) Reamplifikation mit den beiden äußeren *Primern* P1 und P4 mit dem Produkt aus 2. als Matrize. Dieser Schritt dient der Anreicherung des Produktes.

### 3.14. Arbeiten mit Zellkulturen

#### Technische Voraussetzung für die Arbeit mit eukaryotischen Zellen

- Die Arbeiten werden unter einer sterilen Werkbank (Fa. Heraeus) mit vertikalem Luftstrom durchgeführt.
- Die Arbeitsfläche und die benutzten Geräte werden vor Beginn und nach Beendigung der Arbeit mit 70%igem Ethanol gereinigt.
- Glaspipetten, Pasteurpipette, Kulturflaschen und Lösungen werden autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen werden sterilfiltriert.
- Pipetten werden vor dem Autoklavieren mit Watte gestopft.

- Pipetten und Glasgefäße, die in der Zellkultur benutzt werden, werden von solchen des mikrobiologischen Arbeitsbereichs getrennt aufbewahrt.
- Kulturschalen, Mediumflaschen und Pipettendosen werden nur unter der Sterilbank geöffnet.
- Brutschränke sind in regelmäßigen Abständen zu reinigen.
- Brutschränke müssen regelmäßig auf Veränderung des CO<sub>2</sub> Drucks, der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur hin untersucht werden.
- Die verwendeten Medien und Zusätze werden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.
- Alle Medien, Zusätze und Lösungen, die in der Zellkultur zum Einsatz kommen, müssen einer Sterilitätskontrolle unterzogen werden. Dazu wird ein Aliquot in einer Kulturschale 3 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend auf Kontaminationen untersucht.

### **3.14.1. Kulturbedingungen von eukaryotischen Zellen**

Zelllinie	Wachstumsmedium
C2C12	DMEM+ 10% FCS
MCF7	DMEM+ 10% FCS
MDCK	DMEM+ 10%FCS

Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>. Der Mediumwechsel erfolgt bei Bedarf, spätestens jedoch alle drei Tage.

### **3.14.2. Lagerung von Zellen**

Eukaryotische Zellen können in einem speziellen Gefriermedium in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert und bei Bedarf reaktiviert werden.

### **3.14.3. Passagieren von Zellen**

Die verwendeten Zelllinien sind kontaktinhibiert. Sobald eine Zelldichte erreicht ist, bei welcher sich die Zellen gegenseitig berühren, stellen sie ihr Wachstum ein. Diese Tatsache macht es notwendig, die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70-80% zu Passagieren.

- Das alte Medium wird mit einer Pasteurpipette abgenommen
- Die Zellen werden mit 1 x PBS gewaschen, da das im Medium enthaltene Calcium die Wirkung des anschließend gegebenen Trypsins herabsetzen kann
- Die Zellen werden mit 1 ml Trypsin überschichtet und im Brutschrank für ca. 5 min. inkubiert.
- Die Kulturschale wird mehrmals geklopft, um das Ablösen der Zellen zu gewährleisten.
- Unter dem Mikroskop wird das Ablösen der Zellen von der Unterlage kontrolliert.
- Die Zellen werden in 9 ml Medium aufgenommen und in einem geeigneten Verdünnungsverhältnis auf vorbereitete Zellkulturschalen verteilt.

### **3.14.4. Auftauen von Zellen**

Das im Gefriermedium enthaltene DMSO ist ein Zellgift. Deshalb ist es notwendig, dieses so schnell wie möglich nach dem Auftauen zu entfernen, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden.

- Die Zellsuspension wird aufgetaut und in 5 ml Medium aufgenommen.
- Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 Minuten.
- Das Pellet wird in 10 ml Medium vorsichtig resuspendiert und auf Kulturschalen verteilt.

### **3.14.5. Einfrieren von Zellen**

- Die Zellen werden wie zum Passagieren trypsinisiert, in 5 ml Medium aufgenommen und bei 1200 rpm für 3 min. zentrifugiert
- Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in Gefriermedium resuspendiert
- Die Suspension wird sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

### **3.15. Immunfluoreszenz**

#### Fixierung der Zellen auf Deckgläschen

##### Fixierung mit Paraformaldehyd

- Das Kulturmedium wird abgenommen und die Zellen werden 2 x mit 1 x PBS gewaschen.
- Die Zellen werden für 10 min. in einer 4%igen Paraformaldehydlösung fixiert.
- Die Zellen werden für 10 min. in PBS mit 0,2% TritonX100 permeabilisiert.
- Die so behandelten Zellen werden 2x in 1 x PBS gewaschen und entweder zur Immunfluoreszenz eingesetzt oder direkt in einem Tropfen Fluoromount G (Fa. Southern Biotechnology Associates inc.) eingebettet.

##### Fixierung mit Methanol oder Aceton

- Das Kulturmedium wird abgenommen und die Zellen werden 2 x mit 1x PBS gewaschen.
- Anschließend werden die Zellen 5-10 min. in eiskaltem Aceton oder Methanol (-20°C) fixiert. Die so behandelten Zellen werden kurz in 1 x PBS gewaschen und anschließend zur Immunfluoreszenz eingesetzt. Eine Permeabilisierung ist bei dieser Methode nicht notwendig.

### Indirekte Immunofluoreszenz

Mit der Methode der Immunofluoreszenz kann die Lokalisation eines Antigens von *in vitro* kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Man verwendet einen primären Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist und spezifisch an das Antigen bindet. Durch Zugabe eines sekundären Antikörpers, der an den primären bindet und der kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, können spezifische Moleküle durch Fluoreszenzmikroskopie aufgezeigt werden.

- Die Zellen werden mit 100 µl des primären Antikörpers, gelöst in PBS+ 10% FCS, für 1 h inkubiert.
- Die Zellen werden 3x 5 min. in PBS gewaschen.
- Anschließend werden 100 µl des sekundären Antikörpers, gelöst in PBS+ 10% FCS, auf die Zellen gegeben und 45 min. inkubiert.
- Die Zellen werden 3 x 5 min. in PBS gewaschen und in einem Tropfen Fluoromount G (Fa. Southern Biotechnology Associates inc.) eingebettet.
- Bei einer Kernfärbung wird beim letzten Waschschrift das PBS durch Hoechst33258-Lösung ersetzt.

### **3.16. Lyse von Zellen mittels RIPA-Puffer**

Um Proteinextrakt aus Zellen zu gewinnen müssen diese lysiert werden. Eine Methode hierfür ist die Lyse mittels RIPA-Puffer.

- Die Zellen aus dem Brutschrank werden zweimal mit 1X PBS gewaschen.
- Pro Zellkulturschale werden 300 µl RIPA-Puffer zugegeben.
- 30 min bei 4°C inkubieren
- Die Zellkulturschalen werden mit einem *Rubber-Policeman* abgeschabt und das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.
- 30 min Zentrifugation bei 4°C und 10.000 rpm.

- Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 10% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

### **3.17. Western Blot**

Bei dieser Methode findet der Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Trägermembran mittels eines elektrischen Feldes statt (*blotten*). Das im Gel erhaltene Trennmuster der Proteine bleibt hierbei erhalten, so dass man eine Kopie des Gels erhält.

Nach dem Blotten kann die Membran mit Antikörpern behandelt werden, wodurch eine Identifikation einzelner Proteine möglich ist.

- Vor dem Blotten werden Blottingpapier und Nitrozellulosemembran (Hybond™ ECL™-Nitrozellulosemembran, Fa. Amersham) auf Gelgröße zugeschnitten und mit Transferpuffer befeuchtet.
- Anschließend werden zwei Lagen Whatman Papier, Nitrozellulosemembran, Gel und erneut zwei Lagen Whatman Papier luftblasenfrei übereinander gelegt.
- Die Blottingkammer wird geschlossen und Spannung wird angelegt.
- Die Transferzeit der Proteine ist abhängig vom Molekulargewicht und beträgt unter Standardbedingungen 1 h bei 5 mA/cm<sup>2</sup>.

### **3.18. Proteinnachweis durch Antikörper**

#### Alkalische Phosphatase Nachweis

- Die Nitrozellulosemembran wird nach dem Blotten für 1 h bei RT in einem Blockingpuffer inkubiert, um noch offene Proteinbindungen auf der Membran abzusättigen. So werden unspezifische Reaktionen der Antikörper vermieden.
- Anschließend wird die Membran 2 x mit TBS+ 0,2% Tween20 gewaschen.
- Der primäre Antikörper wird auf die Membran gegeben und für 1 h unter schütteln bei RT inkubiert.

- Die Membran wird 3 x 15 min. mit TBS+ 0,2% Tween20 gewaschen.
- Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgt für 45 min.
- Um den sekundären Antikörper vollständig zu entfernen, wird die Membran 3 x 10 min. in TBS+ 0,2% Tween20 gewaschen.
- Zur Detektion der Antigen-Antikörper Komplexe wird die Membran mit 2,5 ml Detektionslösung + 50µl NBT/BCIP (Fa. Roche) lichtgeschützt inkubiert.
- Die Reaktion wird durch Zugabe von Wasser abgestoppt

### **3.19. *In vitro* GST Pull Down Assay**

Mit Hilfe des *In vitro* GST Pull Down Assays kann die direkte Bindung zweier Proteine nachgewiesen werden. Das eine Protein wird hierzu als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und über eine Affinitätsmatrix (Glutathion-Sepharose 4B *Beads*, Fa. Pharmacia) aufgereinigt. Das zweite Protein wird in einem *in vitro* Transkriptions- und Translationskit (TNT®, Fa. Promega) synthetisiert und dabei mit <sup>35</sup>S-Methionin (Fa. Amersham) radioaktiv markiert. Nach der Reaktion der potentiellen Interaktionspartner wird der Reaktionsansatz mittels SDS-PAGE getrennt.

Die GST-Fusionsproteine können durch Färbung mit Coomassie Blau, die *in vitro* Translate mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

#### **3.19.1. Expression rekombinanter Proteine in Bakterien**

Die zu exprimierenden Gene müssen in den Vektor pGEX kloniert werden, die Expression findet im *E.coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS statt.

- 20 ml LB-amp werden angeimpft und ü/N bei 37°C und 220 rpm inkubiert.
- Zugabe von 180 ml LB-amp und erneute Inkubation bei 37°C und 220 rpm für 1 h.
- Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,2 mM im Medium. Dadurch wird der *lac*-Promotor des Vektors induziert. Weiter Inkubation für 3 h bei 37°C und 220 rpm.

- Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C und mit vorgekühlten Lösungen.
- Nach Abschluss der Inkubation werden die Bakterien bei 4000 rpm für 15 min. abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml NENT-Puffer (+ 1 mM DTT) resuspendiert.
- Der Zellaufschluss erfolgt durch dreimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und auftauen bei 37°C.
- Inkubation mit 3 µl Benzonase (Reinheitsgrad II, Fa. Merck) für 5 min.
- Zentrifugation bei 4°C und 8000 rpm für 30 min.
- Der Überstand (Proteinextrakt) wird mit 10% Glycerin versetzt und zu je 1 ml aliquotiert bei -80°C gelagert.

### **3.19.2. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

#### Vorbereiten der Glutathion-Sepharose 4B Beads

- 1,33 ml *Beads* in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführen und 5 min. bei 500 rpm zentrifugieren.
- Überstand abnehmen und das Pellet mit 5 ml NENT-Puffer waschen.
- Nach Zugabe von 1 ml NENT-Puffer erfolgt die Lagerung bei 4°C.

#### Aufreinigung

- Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wird ein aliquotiertes Vol. Bakterienextrakt mit 20 µl der Affinitätsmatrix für 30 min. bei RT inkubiert.
- Die immobilisierten Fusionsproteine werden bei 800 rpm für 5 min. zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.
- Die pelletierte Sepharosematrix wird 3 x mit je 1 ml NENT-Puffer (ohne DTT) gewaschen.
- Das gewaschene Pellet wird in einem geeigneten Vol Probenpuffer aufgenommen, 5 min. bei 95°C inkubiert und zur Kontrolle der Expression bzw. Aufreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt.
- Das SDS-Gel wird anschließend mit Coomassie Blau gefärbt.

Eine Kontrolle der Expression und Bestimmung der Proteinmenge ist notwendig, um in der Interaktionsstudie jeweils gleiche Mengen an Fusionsprotein einzusetzen.

### **3.19.3. *In vitro* Transkription und Translation**

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Transkriptions- und Translationsystem (Fa. Promega) erfolgen Transkription und Translation in einem entsprechend aufbereiteten Zellextrakt (Kaninchen-Retikulozyten Lysat). Hierbei ist die Synthese großer Proteine (> 60 kD) möglich. Zudem werden in diesem System eine Vielzahl posttranslationeller Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, durchgeführt.

Vorraussetzung für die Zellfreie Synthese ist die Klonierung der DNA in einen entsprechenden Expressionsvektor. In dieser Arbeit wurde der Vektor pcDNA 3.1+/- der Firma Invitrogen verwendet.

Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Kontrolle der Translationsprodukte wurden 2 µl des Ansatzes in Probenpuffer aufgenommen, mittels SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht.

### **3.19.4. *Pull Down Assay***

Zum *in vitro* Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen werden durch Glutathion-Sepharose 4B immobilisierte Fusionsproteine mit *in vitro* translatierten und <sup>35</sup>S-markierten Proteinen inkubiert. Im Falle einer Interaktion des bakteriell exprimierten Fusionsproteins mit dem *in vitro* translatierten Proteins wird letzteres beim Zentrifugieren Kopräzipitiert. Die so behandelten Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine über Autoradiographie sichtbar gemacht.

- Ein geeignetes Vol Bakterien Extrakt wird aufgetaut, mit 20 µl *Beads* 30 min. bei RT inkubiert und anschließend bei 800 rpm für 5 min. zentrifugiert

- Um unspezifische Proteinbindungsstellen des GST-Fusionsproteins abzusättigen, erfolgt eine Inkubation des Extrakts mit 1 ml NENT-Puffer + 20% Milchpulver für 15 min. bei RT.
- Nach Zentrifugation bei 800 rpm für 5 min wird das Pellet 2 x mit NENT und 1 x mit TWB (+ 1 mM DTT) gewaschen.
- Nach Abnahme des Überstandes wird ca. 50-100  $\mu$ l TWB (+ 1mM DTT) zugegeben und mit 3-5  $\mu$ l *in vitro* Translat vermischt.
- Inkubation für mindestens 1,5 h bei RT
- Zentrifugation 5 min bei 1000 rpm. Anschließend wird das Pellet 5 x mit NENT gewaschen.
- Das Pellet wird in einem geeigneten Vol Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C inkubiert und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die darin enthaltenen Proteine werden mittels SDS-PAGE getrennt und durch Autoradiographie detektiert.

### **3.20. Kultivierung und Lagerung von Hefestämmen**

Hefezellen wurden, wie Bakterien, als Flüssigkultur oder im Kolonienwachstum auf Agarplatten kultiviert.

Die optimale Inkubationstemperatur liegt bei 30°C und durch ihre gegenüber Bakterien dreimal kleinere Teilungsrate verlängert sich die Wachstumszeit entsprechend.

Hefestämme und transformierte Hefezellen können dauerhaft bei -80°C als Glycerolstock mit 25% (v/v) Glycerin gelagert werden.

#### **3.20.1. Transformation von Hefezellen mit DNA**

Hefezellen wurden nach der von Ito (Ito et al., 1983) entwickelten und von Schiestl und Gietz (Schiestl und Gietz, 1989) modifizierten LiAc-Methode mit den Zweihybridvektoren transformiert.

##### Schnelle Transformation mit einem Plasmid

Die folgende Methode erlaubt es, ein Plasmid effizient in Hefezellen einzuschleusen.

- 3 ml YPAD-Medium mit je einer Hefekolonie (nicht älter als eine Woche) von einer YPAD-Agarplatte mittels Impföse animpfen
- Inkubation 18-24 h bei 30°C und 200 rpm
- 1,5 ml der saturierten ü/N-Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Medium entfernen
- Pellet in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, Überstand entfernen
- Zellpellet für Transformation einsetzen

#### Vorbereitungen:

1 Aliquot 10 mg/ml Heringssperma (Träger-DNA) 10 min bei 95°C denaturieren und auf Eis abkühlen lassen

#### Transformationsansatz:

5 µl denaturiertes Heringssperma

2-6 µg Plasmid-DNA

500 µl 40% PEG-Mix

- vorsichtig mischen; nicht vortexen
- 15 min bei RT inkubieren
- 15 min Hitzeschock bei 42°C
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand entfernen
- Pellet in 1 ml 1 x TE-Puffer resuspendieren
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und 800 µl Überstand entfernen
- Pellet in 200 µl verbleibendem Flüssigkeitsrest resuspendieren und auf einer SD-Agarplatte entsprechender Aminosäureselektion ausstreichen

#### Sequentielle Zweihybrid Transformation

Mit dieser Transformationsmethode wurden die Vektoren für einen Hefe Zweihybrid *screen* in Hefezellen eingeschleust. Das Protokoll reicht für 100 SD-<sup>WLH</sup> Platten.

- 3 x 5 ml SD-Medium (entsprechende AS-Selektion) mit je einer transformierten Hefekolonie von einer SD-Agarplatte animpfen

- Inkubation 18-24 h bei 30°C und 200 rpm
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand entfernen
- Hefezellen in 100 ml YPAD (30°C) resuspendieren ( $OD_{600} = 0,2-0,3$ )
- Wachstum bei 30°C und 200 rpm für 3-4 h bis eine  $OD_{600}$  von 0,7-1 (~2 x 10<sup>7</sup> Zellen) erreicht ist.
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellpellet in ½ Vol ddH<sub>2</sub>O waschen
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellen in 3 ml 100 mM LiAc resuspendieren
- 15 min bei 30°C inkubieren
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen

#### Transformationsansatz:

7,2 ml 50% PEG<sub>4000</sub>  
 1,08 ml 1 M LiAc  
 1,5 ml frisch denaturiertes Heringssperma  
 x µl Plasmid-DNA  
 1,02 ml ddH<sub>2</sub>O

- 1-2 min vortexen bis die Hefezellen resuspendiert sind
- 30 min bei 30°C inkubieren
- 40 min Hitzeschock bei 42°C; alle 5 min 15 sec schwenken
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- auf 100 SD<sup>WLH</sup>-Platten je 200 µl Zellsuspension ausstreichen

#### Zweihybrid Kotransformation

Retransformation zur Bestätigung einer Hefe Zweihybrid Interaktion wurde mittels Kotransformation durchgeführt. Das Protokoll reicht für 20 Transformationen (100 ml YPAD).

- 3 x3 ml YPAD-Medium mit je einer Hefekolonie (nicht älter als eine Woche) von einer YPAD Agarplatte animpfen
- Inkubation 18-24 h bei 30°C und 200 rpm
- Überimpfen in 100 ml YPAD-Medium bis eine  $OD_{600} = 0,1-0,2$  erreicht ist

- Wachstum bei 30°C und 200 rpm für 3-4 h bis eine OD<sub>600</sub> von 0,7-1 (~ 2 x 10<sup>7</sup> Zellen) erreicht ist
- Zellen zu je gleichen Teilen in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführen
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellpellet in ½ Vol ddH<sub>2</sub>O waschen
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zellpellet in 1 ml 100 mM LiAc resuspendieren
- Inkubation für 30 min bei 30°C

Je Transformationsansatz:

50 µl Zellen

600 µl frisch angesetzter 40% PEG-Mix

10 µl frisch denaturiertes Heringssperma

0,1-1 µg Köderplasmid

0,1-1 µg Zielplasmid

- Transformationsansatz vorsichtig mischen
- Inkubation bei 30°C und 200 rpm für 30 min
- 30 min Hitzeschock bei 42°C; alle 5 min schwenken
- Kurz auf Eis abkühlen
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellets in 500 µl 1 x TE-Puffer je Ansatz waschen (vorsichtig resuspendieren)
- 5 min bei 3000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellets in je 150 µl 1 x TE-Puffer resuspendieren
- Ansätze auf SD<sup>-WLH</sup>-Platten ausstreichen
- Inkubation der Selektionsplatten für 3-5 Tage bis Kolonien (Durchmesser ≥ 2 mm) sichtbar werden

### 3.20.2. Galaktosidase-Filtertest

Dieser Test ermöglicht es, die Expression des Reportergens *lacZ* (codierend für die  $\beta$ -Galaktosidase) nachzuweisen. Der Reporter kann durch seine Aktivität, die als Blaufärbung sichtbar wird, angezeigt werden.

Vorbereitung der Hefe:

Hefekolonien auf frische SD<sup>WLH</sup>-Platten ausstreichen und 3-5 Tage bei 30°C inkubieren.

- Whatman 3 MM-Papier Kreisrund auf Größe einer Kulturschale schneiden (~ 94 mm) und in diese legen
- 3 ml frisch angesetzte Z-Puffer/X-Gal Lösung in die Kulturschale geben
- Nitrozellulose-Filter (Fa. Amersham) auf die SD<sup>WLH</sup>-Platte legen, damit die Hefezellen adhärieren
- Filter mit Hefekolonien dreimal in flüssigem Stickstoff frieren und tauen
- Filter mit Kolonieseite nach oben in die vorbereitete Kulturschale legen
- Schale mit Parafilm versiegeln und 6-8 h bei 30°C inkubieren

### 3.20.3. Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe

Plasmide putativer Interaktionspartner wurden nach folgendem Protokoll isoliert:

- 5 ml SD-Medium mit einer Hefekolonie (nicht älter als eine Woche) von einer SD Agarplatte animpfen
- Inkubation 18-24 h bei 30°C und 200 rpm
- 3 ml saturierte Hefelösung 1 min bei 13000 rpm pelletieren
- Überstand entfernen und Pellet in 200  $\mu$ l Hefe-Lysepuffer resuspendieren
- 200  $\mu$ l Glasperlen (Fa. Sigma, Nr. G8772) und 200  $\mu$ l Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung dazugeben
- 30 sec vortexen und 30 sec auf Eis abkühlen, Vorgang wiederholen

- Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm
- Obere Wässrige Phase (~ 200 µl) in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Ethanolische DNA-Fällung durchführen
- DNA-Pellet in 25 µl ddH<sub>2</sub>O aufnehmen und mit 5-10 µl DNA-Lösung kompetente Bakterien transformieren

### **3.21. Statistische Analysen**

Die Quantifizierung der Translokation von ARVCF in cytoplasmatische Aggregate sowie die Abschwächung der Cadherinbindung im MOM-recruitment *assay* wurde wie folgt durchgeführt:

300 transfizierte Zellen wurden für jede angegebene Behandlung ausgezählt. Die Anzahl der Zellen mit membrangebundenem ARVCF wurde mit denen mit cytoplasmatischem ARVCF verglichen. Mit den Werten wurden mit Hilfe des Pearson's Chi Quadrat Test sowie mit Fisher's exaktem Test p-Werte ermittelt, um einen Aufschluss über die Signifikanz zu erhalten.

Dieselben Tests wurden für die Quantifizierung des MOM-recruitment *assay* angewendet, wobei mitochondriale Kolokalisation von MOM-M-cadherin mit ARVCF (oder p120(ctn)) mit Zellen verglichen wurde, in welchen diese Kolokalisation abgeschwächt war.

Statistische Analysen wurden mit freundlicher Hilfe von Dirk Metzler durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Interaktionsstudien mit ARVCF

#### 4.1.1. Auswahl der Köder für das Durchmustern einer cDNA- Bank

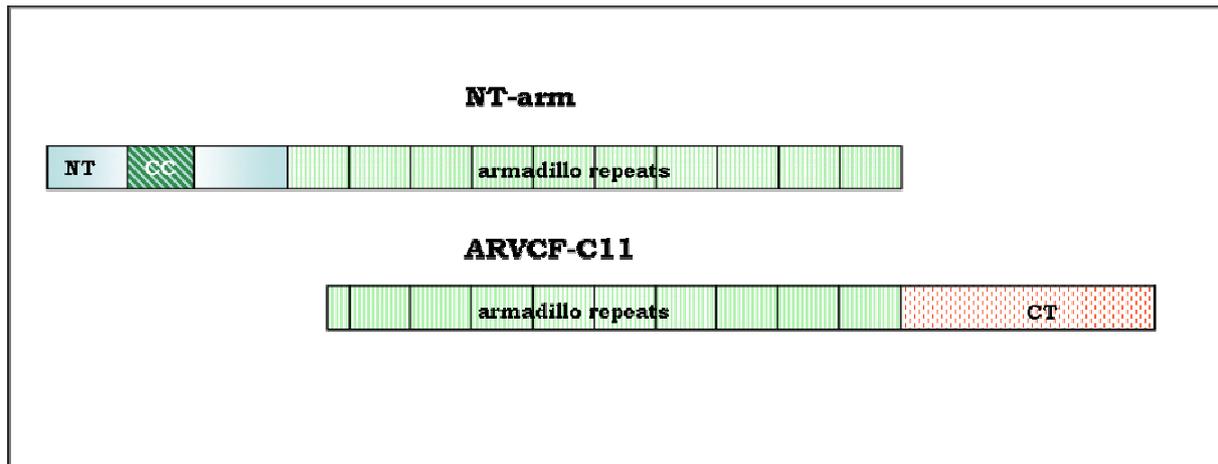
ARVCF, ein Mitglied der p120(ctn) Subfamilie der *Armadillo repeat* Proteine ist ein cadherinbindendes Catenin (Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000). Über die Funktion dieses Proteins in Bezug auf Adhäsion und Signaltransduktion liegen, anders als bei anderen Mitgliedern der catenin Superfamilie, noch keine Erkenntnisse vor.

Um Hinweise auf die Funktion von ARVCF zu erlangen, wurde ein Hefe-zweihybrid *screen* mit mARVCF durchgeführt. Über potentielle Interaktionspartner, deren Aufgaben in der Zelle bereits bekannt sind, können oft Aussagen über die Funktion des zu untersuchenden Proteins getroffen werden.

Als Köder von ARVCF wurden zwei Deletionsmutanten hergestellt.

NT-arm ist eine Deletionsmutante welcher der C-Terminus des Proteins fehlt und ARVCF-C11 ist ein Konstrukt welchem der N- Terminus fehlt.

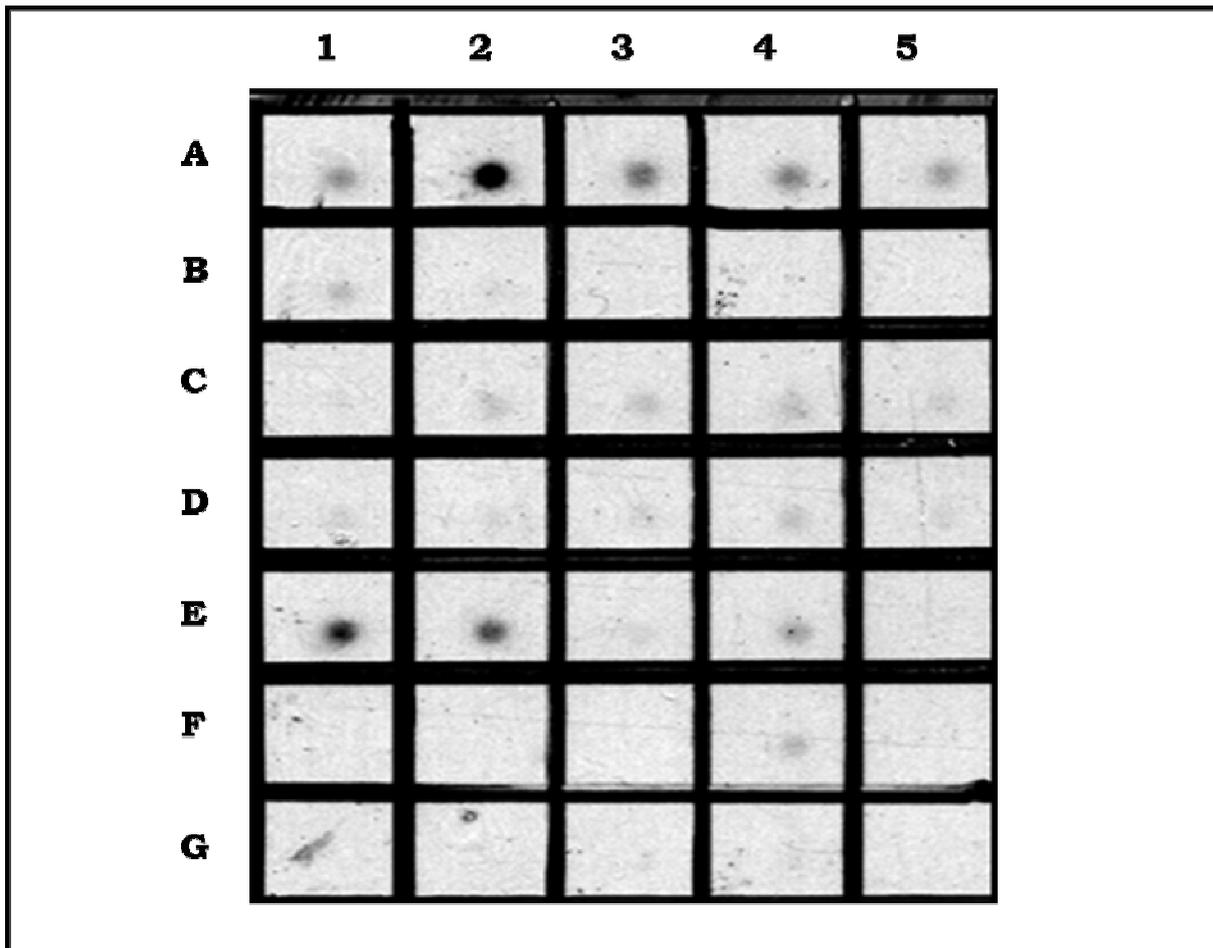
In Klon NT-arm ist innerhalb des N-Terminus eine coiled-coil Region enthalten, welche potentiell Protein-Protein Interaktionen vermitteln kann. Hierdurch wurde gewährleistet, dass sowohl der N- und der C-Terminus, sowie die *armadillo repeats* von ARVCF beim durchmustern einer c-DNA Bank enthalten waren (Abb. 4).



**Abb. 4.:** *Baits* für den Hefe zweihybrid screen. Klon NT-arm, welcher den N-Terminus mit *coiled-coil* Region sowie die *armadillo repeats* enthält und Klon ARVCF-C11, beginnend innerhalb der *armadillo repeats* mit C-Terminus. NT- N-Terminus, CT- C-Terminus, CC- *coiled-coil* Region.

#### 4.1.2. Überprüfung des Expressionsmusters von murinem ARVCF

Es wurde zunächst ein Maus *Northern-Blot* der Firma Clontech verwendet, um Hinweise auf das Expressionsmuster von murinem ARVCF zu bekommen und die entsprechende cDNA-Bank für den Hefe Zweihybridtest zu wählen. Als Sonde diente ein 700 bp langes,  $^{32}\text{P}$  markiertes cDNA-Fragment von ARVCF aus der Region der *armadillo repeat* Domäne mit einem Teil des N-Terminus.



**Abb. 5.: Mouse Master RNA Blot der Firma Clontech®, inkubiert mit einer  $^{32}\text{P}$  markierten 700 bp Sonde von ARVCF.**

Hierbei zeigte sich eine starke Expression in Geweben wie Auge (A2), Herz (B1), sowie aus sieben bzw. elf Tage alten Embryonen (E1 bzw. E2). Eine etwas schwächere Expression der mRNA konnte in Gehirn (A1), Leber (A3), Lunge (A4), Niere (A5), 17 Tage altem Embryo (E4) und Skelettmuskel (B2) beobachtet werden.

Schwache Bindung der Sonde war sichtbar bei glattem Muskel (B3), Schilddrüse (C2), Thymus (C3), Milz (C5), Prostata (D3), Nebenhoden (D4) sowie E.coli DNA (F4).

Keine Expression der untersuchten mRNA war sichtbar in Pankreas (C1), Testis und Ovar (D1 bzw. D2), Hefe gesamt RNA (F1), Hefe tRNA (F2) und E.coli rRNA (F3).

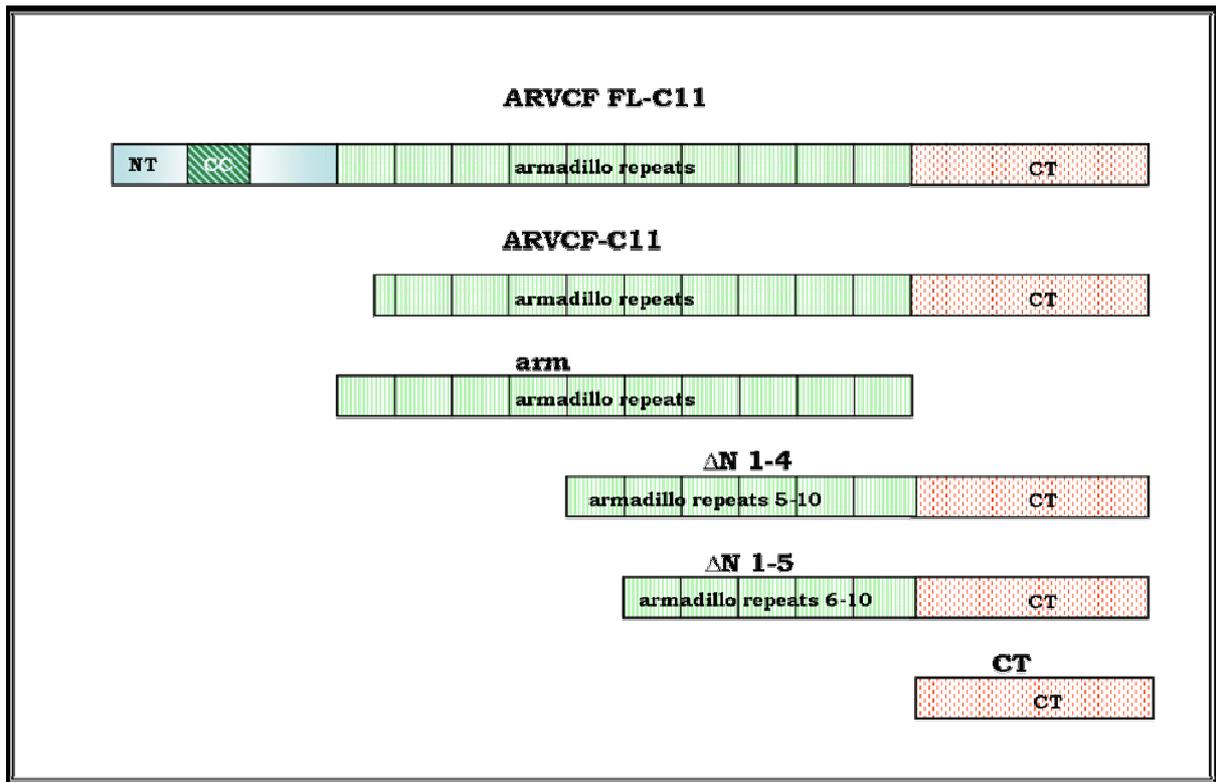
### 4.1.3. Ergebnis des Hefe zweihybrid screen

Nachdem das Expressionsmuster der mRNA des Proteins überprüft war und gezeigt werden konnte, dass sie in Muskelgewebe wie Herz und Skelettmuskel vorhanden ist, wurde eine c-DNA Bank aus postnatalen Skelettmuskelzellen, i28 Mausmyoblasten 30h nach Induktion zur Fusion, durchmustert.

Hierbei wurde  $\alpha$ -actinin, ein Cytoskelettprotein, welches Actinfilamente quervernetzt (Pelletier et al., 2003), als Bindungspartner von ARVCF festgestellt.

Weiterhin wurde versucht, die Bindungsstellen von ARVCF für  $\alpha$ -actinin in einem zweiten Hefe zweihybrid Test festzustellen. Hierfür wurden diverse Deletionsmutanten von ARVCF hergestellt und in den zweihybrid Vektor pBD GAL4-CAM einkloniert.

Untersucht wurden eine *full length* Variante von ARVCF, FL-C11, ARVCF C11 ohne den N-Terminus des Proteins, die *armadillo repeats* (arm) alleine, zwei Deletionsmutanten, welchen der N-Terminus und jeweils *repeats* 1-4 respektive 1-5 fehlen, sowie der C-Terminus (CT) des Proteins alleine (Abb.6).



**Abb. 6.:** Schematische Darstellung der *Baits* für das Eingrenzen der Bindungsstellen von ARVCF für  $\alpha$ -actinin. Splicevariante ARVCF FL-C11, ARVCF C11 ohne N-Terminus, die *armadillo repeats* (arm),  $\Delta N$  1-4 ohne N-Terminus und *repeats* 1-4,  $\Delta N$  1-5 ohne N-Terminus und *repeats* 1-5 sowie der C-Terminus (CT) wurden für den Hefetest eingesetzt. Alle *Baits* wurden in den Vektor pBD GAL4-CAM kloniert.

Als Zielprotein für den Test diente eine *full length* Variante von  $\alpha$ -actinin im zweihybrid Vektor pAD.

Die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Hefekclone wurden auf das Wachstum auf Medien ohne Tryptophan, Leucin und Histidin getestet, um eine Interaktion nachzuweisen. Weiterhin wurde als zusätzlicher Marker der  $\beta$ -Galaktosidase Test verwendet.

	pAD $\alpha$ -actinin	
	Wachstum -W/L/H	$\beta$ -Gal
pBD FLC11	+++	+++
pBD C11 ARVCF	+++	+++
pBD arm	+++	+++
pBD $\Delta$ 1-4	++	++
pBD $\Delta$ 1-5	++	+
pBD CT	-	-

**Abb. 7.:** Hefe zweihybrid Test der Interaktion verschiedener Deletionsmutanten von ARVCF mit  $\alpha$ -actinin.  
 +++ Starkes Wachstum, ++ schwächeres Wachstum, + schwaches Wachstum, - kein Wachstum. B-Gal = Blau-Weiß-Selektion.

Der erneute Hefe zweihybrid Test bestätigte die Bindung von ARVCF an  $\alpha$ -actinin.

Splicevariante ARVCF FL-C11, Klon ARVCF-C11 sowie Klon arm zeigten eine starke Interaktion mit dem Cytoskelettprotein, sowohl in Bezug auf Wachstum auf dem Mangelmedium als auch im  $\beta$ -Galaktosidase Test.

Eine etwas abgeschwächte Interaktion konnte im Falle der Deletionsmutante  $\Delta$ N 1-4 beobachtet werden, sichtbar in der geringeren Anzahl an gewachsenen Hefekolonien sowie einer schwächeren Blaufärbung im  $\beta$ -Galaktosidase Test.

Klon  $\Delta$ N 1-5 zeigte ein ähnliches Wachstumsmuster wie Klon  $\Delta$ N 1-4, färbte sich jedoch bei Zugabe von *x-Gal* noch weniger, was auf eine schwächere Interaktion mit  $\alpha$ -actinin schließen lässt.

Gar kein Wachstum auf Mangelmedium konnte bei Verwendung des C-Terminus von ARVCF alleine festgestellt werden (Abb. 7).

#### 4.1.4. *In vitro* Transkription und Translation der Deletionsmutanten von ARVCF

Der Hefe zweihybrid Test ergab eine Interaktion von ARVCF mit dem Cytoskelettprotein  $\alpha$ -actinin. Da es bei Verwendung dieser Methode jedoch oft zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann, wurde die biochemische Methode des *Pull-Downs* gewählt, um diese Interaktion *in vitro* zu bestätigen. Die cDNAs der Deletionsmutanten des Hefe Interaktionstests aus Abb.6 wurden in den Vektor pcDNA 3.1+ kloniert und mit Hilfe des Transkriptions-Translationskits der Firma Promega unter Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -Methionin *in vitro* translatiert. Die korrekte Expression der Proteine wurde mittels SDS-PAGE in einem 12%-igen Gel und anschließender Autoradiographie überprüft (Abb.8).

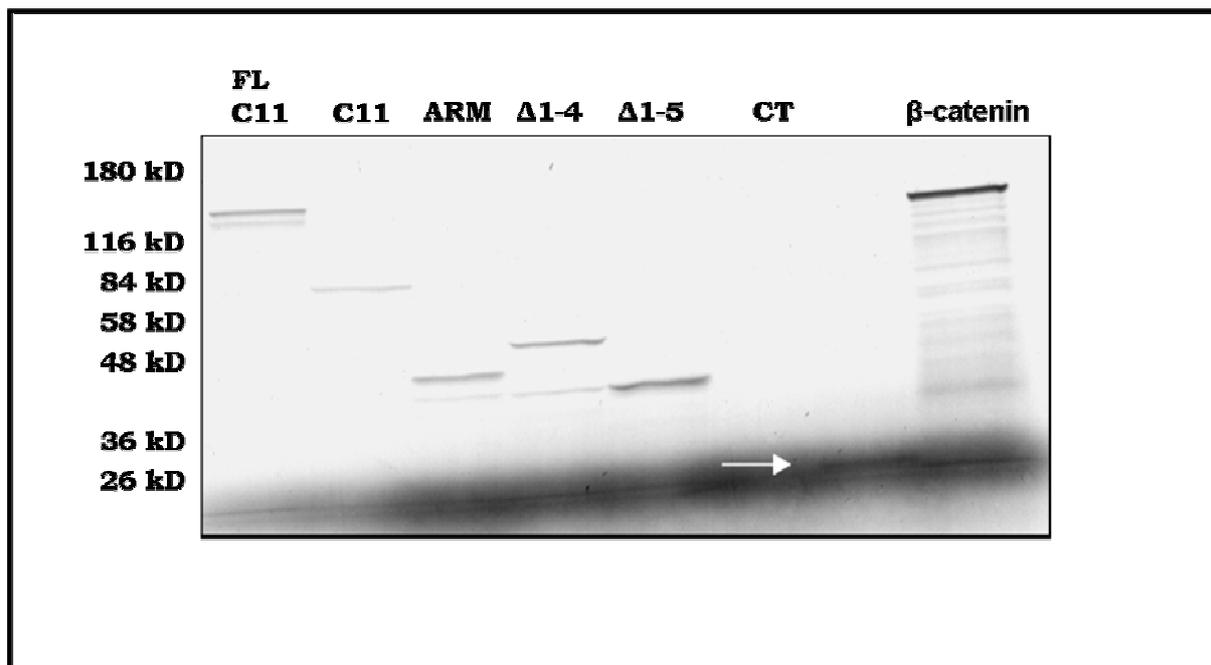


Abb. 8.: *In vitro* Translate der Deletionsmutanten von ARVCF sowie von  $\beta$ -catenin für den *Pull-Down* assay.

Da der C-Terminus von ARVCF auf Höhe des freien  $^{35}\text{S}$ -Methionins liegt und schlecht erkennbar ist, wurde er mit einem weißen Pfeil markiert.

FL C11 = *Full length* ARVCF C11; C11 = ARVCF C11; ARM = armadillo repeats;  $\Delta\text{N}$  1-4 = N-Terminus und repeat 1-4 deletiert;  $\Delta\text{N}$  1-5 = N-Terminus und repeat 1-5 deletiert; CT = C-Terminus.

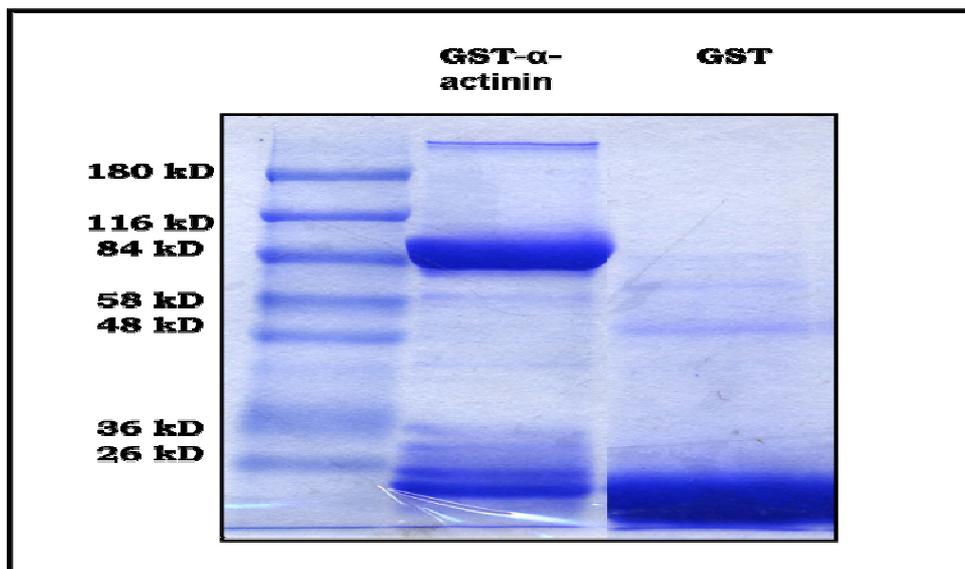
Alle Deletionsmutanten von ARVCF, welche zur Untersuchung der Bindungsregion für  $\alpha$ -actinin dienen wurden in der erwarteten Größe exprimiert und konnten im *Pull-Down assay* eingesetzt werden.

Auch  $\beta$ -catenin wurde in der Richtigen Größe exprimiert.

#### 4.1.5. Bakterielle Expression des Proteins $\alpha$ -actinin

Die cDNA des zweiten Proteins für diesen Versuch,  $\alpha$ -actinin, wurde in den Vektor pGEX 5X-1 kloniert.

Mit Hilfe von Glutathion Sepharose *beads* wurde das hergestellte Fusionsprotein aufgereinigt und für den Versuch eingesetzt. Die Expression wurde anschließend über ein SDS-PAGE in einem 12%igen Gel und eine Coomassie Färbung des Gels nachgewiesen (Abb.9).



**Abb. 9.:** Coomassie Gel des bakteriell hergestellten rekombinanten Proteins  $\alpha$ -actinin fusioniert mit GST in der linken Spalte. Rechts reines GST.

Sowohl GST- $\alpha$ -actinin als auch GST alleine, welches im *Pull-Down* als Negativkontrolle diente wurden in der erwarteten Größe exprimiert und konnten eingesetzt werden.

#### 4.1.6. Pull- Down Assay

Nachdem die Expression der ARVCF-Deletionsmutanten, von  $\beta$ -catenin, GST- $\alpha$ -actinin und GST überprüft war, wurden jeweils die beiden zu untersuchenden Proteine zusammen inkubiert und wiederum über Glutathion Sepharose *beads* aufgereinigt. Anschließend wurde ein SDS-PAGE in einem 12%igen Gel sowie eine Autoradiographie durchgeführt, um direkte Interaktionen zwischen den Deletionsmutanten und  $\alpha$ -actinin sichtbar zu machen (Abb.10).

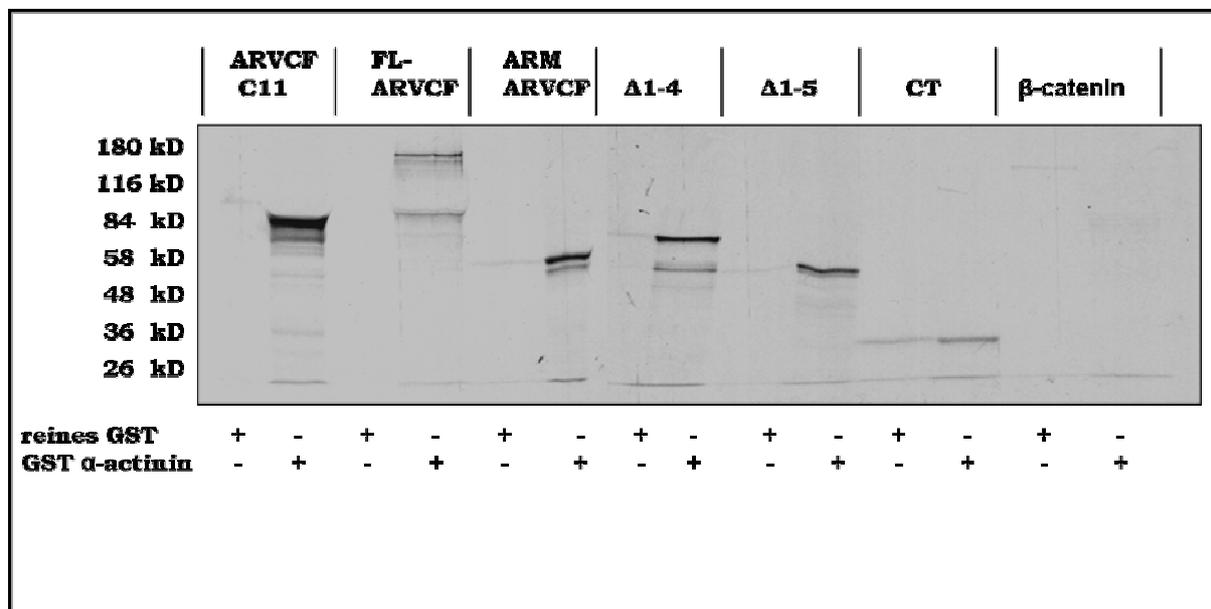


Abb. 10.: Pull-Down assay zwischen den einzelnen Deletionsmutanten von ARVCF und  $\alpha$ -actinin.

*In vitro* translatierte und  $^{35}\text{S}$  markierte ARVCF Konstrukte und bakteriell exprimiertes  $\alpha$ -actinin wurden inkubiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

GST = Glutathion-Sepharose-Transferase; FL-ARVCF = *Full length* ARVCF; ARVCF C11 = ARVCF Klon C11; ARM ARVCF = armadillo repeats von ARVCF;  $\Delta$ 1-4 = N-Terminus und repeat 1-4 deletiert;  $\Delta$ 1-5 = N-Terminus und repeat 1-5 deletiert; CT = C-Terminus von ARVCF.

Alle in diesem Versuch untersuchten Deletionsmutanten zeigten eine Bindung mit rekombinantem GST- $\alpha$ -actinin, jedoch wie erwartet keine

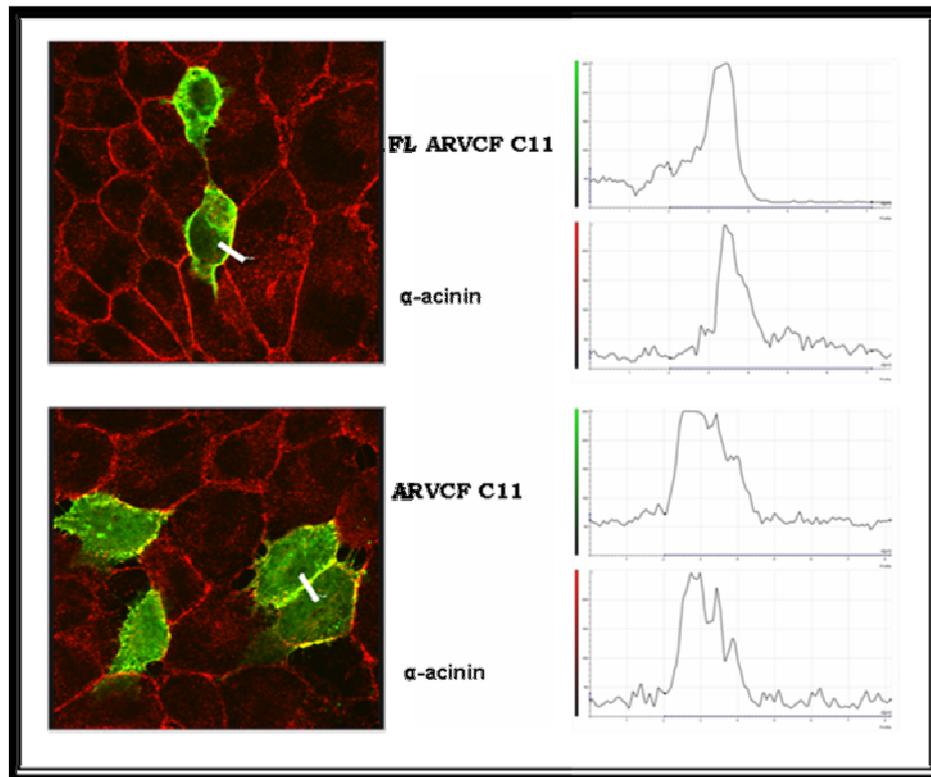
Bindung, wenn die entsprechende Mutante mit GST alleine inkubiert wurde. Weiterhin war keine Interaktion von  $\beta$ -catenin mit  $\alpha$ -actinin sichtbar.

Aufgrund des positiven *Pull-Down assays* ist eine direkte Bindung des untersuchten *armadillo repeat* Proteins ARVCF an ein Element des Cytoskeletts,  $\alpha$ -actinin, *in vitro* festzustellen.

Die Bindungsregion, mit welcher ARVCF mit dem im Hefe zweihybrid *screen* gefundenen Protein interagiert, konnte jedoch nicht eindeutig identifiziert werden, da alle mit  $\alpha$ -actinin inkubierten Deletionsmutanten ein positives Signal in diesem Versuch aufwiesen.  $\beta$ -catenin, welches nur über  $\alpha$ -catenin an  $\alpha$ -actinin binden kann, zeigte in keinem Versuch eine direkte Interaktion mit dem untersuchten Cytoskelettprotein.

#### **4.1.7. Subzelluläre Lokalisation der Proteine**

Es wurden, um einen weiteren Hinweis auf Interaktion der beiden Proteine *in vivo* zu erhalten, MCF7 Zellen mit pEGFP-FL ARVCF C11 oder pEGFP-ARVCF C11 transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde  $\alpha$ -actinin mit dem entsprechenden Antikörper sichtbar gemacht. Somit konnte die Lokalisation der jeweiligen Proteine beobachtet werden. Dies geschah an einem konfokalen Laserscanmikroskop, bei welchem die Fluoreszenzintensität über eine definierte Strecke gemessen werden und in einem Diagramm dargestellt werden kann. Somit kann eine Kolokalisation zweier Proteine in einer Zelle exakt festgestellt werden (Abb. 11).



**Abb. 11.:** Subzelluläre Kolokalisation von ARVCF und  $\alpha$ -actinin in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von MCF7 Zellen.

MCF7 Zellen wurden mit pEGFP FL C11 sowie ARVCF C11 transfiziert.

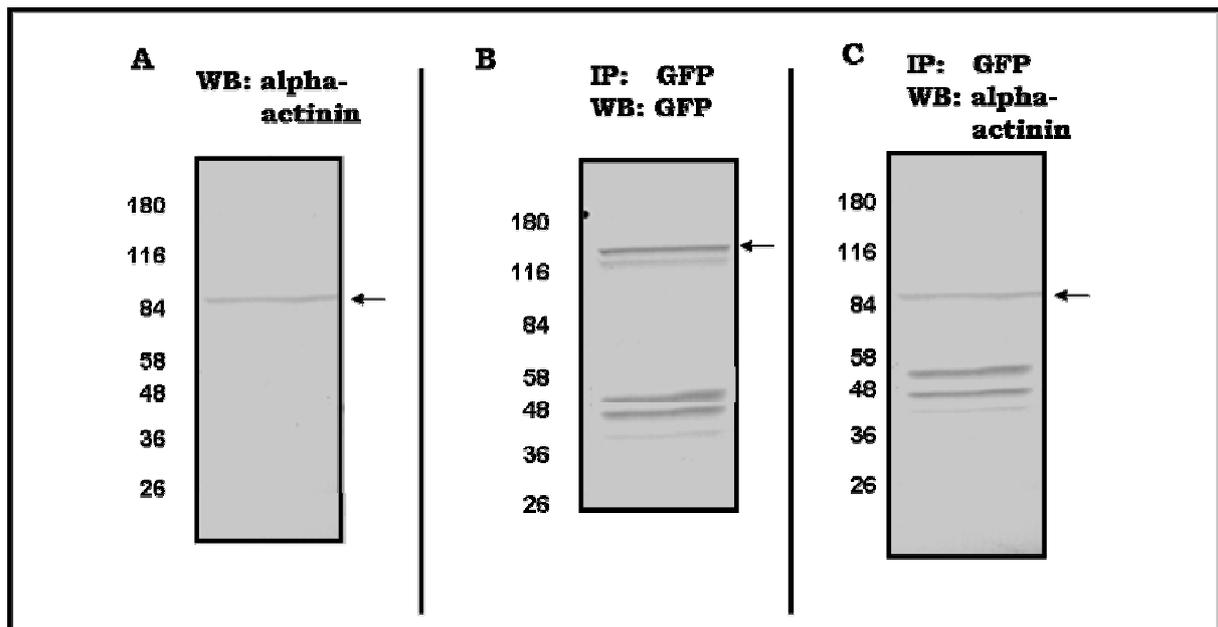
$\alpha$ -actinin wurde mit anti- $\alpha$ -actinin Antikörper visualisiert. Über die Distanz der weißen Balken wurde die Fluoreszenzintensität gemessen, welche im Diagramm auf der rechten Seite angezeigt wird.

Grün = ARVCF, Rot=  $\alpha$ -actinin.

Wie in Abbildung 11 ersichtlich kolokalisierte sowohl GFP-FL ARVCF als auch GFP-ARVCF C11 mit endogenem  $\alpha$ -actinin, was einen Hinweis auf eine *in vivo* Interaktion der beiden Proteine gab.

#### 4.1.8. Coimmunopräzipitation

Nachdem *in vitro* gezeigt worden war, dass ARVCF und  $\alpha$ -actinin direkt miteinander interagieren und eine Kolokalisation *in vivo* bestand, sollte die Bindung nochmals überprüft werden, diesmal mit Hilfe der Coimmunopräzipitation.



**Abb. 12.:** Coimmunopräzipitation von ARVCF mit  $\alpha$ -actinin aus MCF7 Zellen.

**A.:** Endogenes  $\alpha$ -actinin, nachgewiesen mit anti- $\alpha$ -actinin Antikörper;

**B.:** GFP-FL ARVCF nach Fällung mit anti-GFP Antikörper, nachgewiesen mit anti-GFP Antikörper

**C.:**  $\alpha$ -actinin, nachgewiesen mit anti- $\alpha$ -actinin Antikörper nach Fällung mit anti-GFP Antikörper.

**Pfeile** zeigen die gesuchten Proteine  $\alpha$ -actinin (A, C) oder GFP-ARVCF (B).

Es konnte eine Interaktion der beiden Proteine durch Coimmunopräzipitation gezeigt werden. Nachdem das transfizierte GFP-ARVCF mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers präzipitiert war, konnte endogenes  $\alpha$ -actinin im Präzipitat nachgewiesen werden.

Kombiniert mit dem Ergebnis des *Pull- Down Assay* kann man von einer direkten Interaktion der untersuchten Proteine ausgehen.

## **4.2. ARVCF als potentiell effektormolekül der Proteinkinase C**

### **4.2.1. Potentielle Phosphorylierungsstellen in ARVCF**

Die gezeigte Interaktion von ARVCF führt zu der Annahme, dass ARVCF, zumindest partiell, daran beteiligt ist Cadherine, an welche das Protein auch bindet, über  $\alpha$ -actinin mit dem Actincytoskelett zu verankern.

Von  $\alpha$ -actinin ist weiterhin bekannt, dass es unter bestimmten Umständen nicht nur an der Zellmembran, sondern auch im Nukleus zu finden ist.

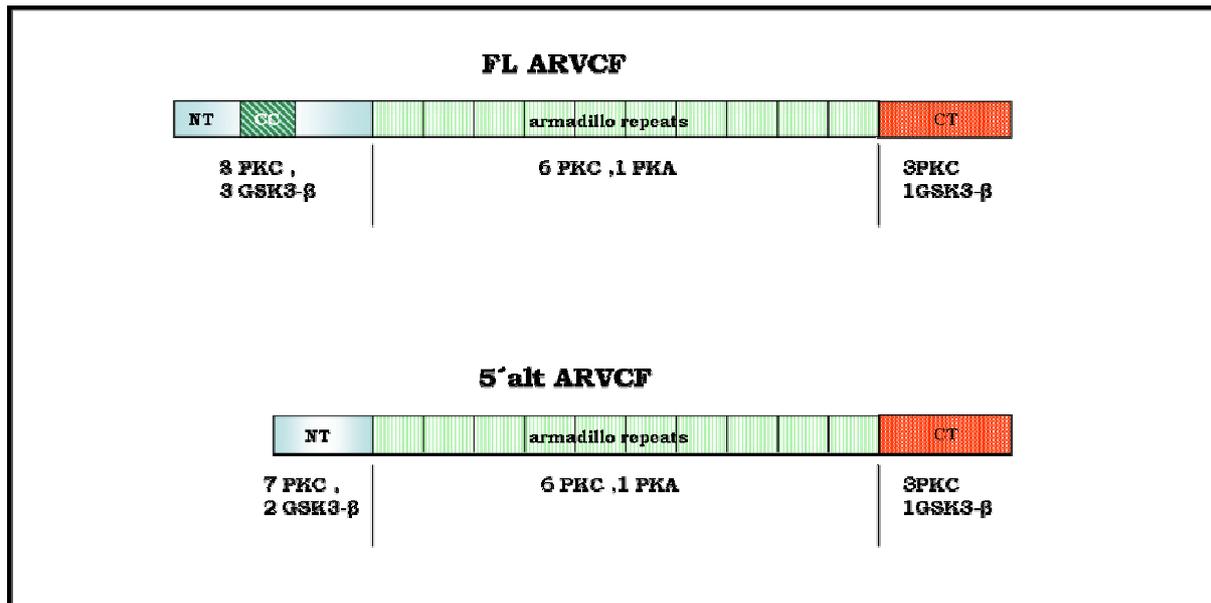
Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn MCF7 Zellen mit dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Inhibitor Wortmanin oder mit Cytochalasin D behandelt werden (Honda et al., 1998). Da ARVCF eine putative Kernlokalisationssequenz besitzt lag die Hypothese nahe, dass ARVCF  $\alpha$ -actinin unter diesen Bedingungen Richtung Nukleus dirigieren kann.

Leider konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Dennoch war es von großem Interesse zu überprüfen, ob ARVCF in irgendeiner Weise an Signaltransduktionsprozessen beteiligt ist.

Da viele dieser Prozesse über Modifikation der beteiligten Proteine, zum Beispiel Phosphorylierung vermittelt werden, wurde die Proteinsequenz von ARVCF in den Vorhersageprogrammen:

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> und <http://www.expasy.ch/scanprosite> auf potentiell im Protein vorhandene Phosphorylierungsstellen untersucht.



**Abb. 13.:** Schematische Darstellung der Lage der potentiellen Phosphorylierungsstellen in ARVCF.

CC = *coiled coil*, CT = C-Terminus, NT = N-Terminus, PKC = Proteinkinase C, PKA = Proteinkinase A, GSK3-β = Glycogen-Synthase-Kinase 3-β. Die Zahlen geben die Anzahl der in der jeweiligen Domäne liegenden potentiellen Phosphorylierungsstellen an.

Hierbei wurden potentielle Phosphorylierungsstellen für drei Kinasen entdeckt, Glycogen-Synthase-Kinase 3β (GSK3β), Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC).

Für die PKC befinden sich 17 potentielle Phosphorylierungsstellen im offenen Leseraster von ARVCF, wovon acht im N-Terminus des Proteins vorhanden sind.

Bei der natürlich vorkommende Splicevariante 5'alt, welche ein alternatives Startcodon besitzt und welcher dadurch die coiled-coil Domäne fehlt, sind immer noch sieben dieser potentiellen Angriffsstellen für die PKC im N-Terminus vorhanden.

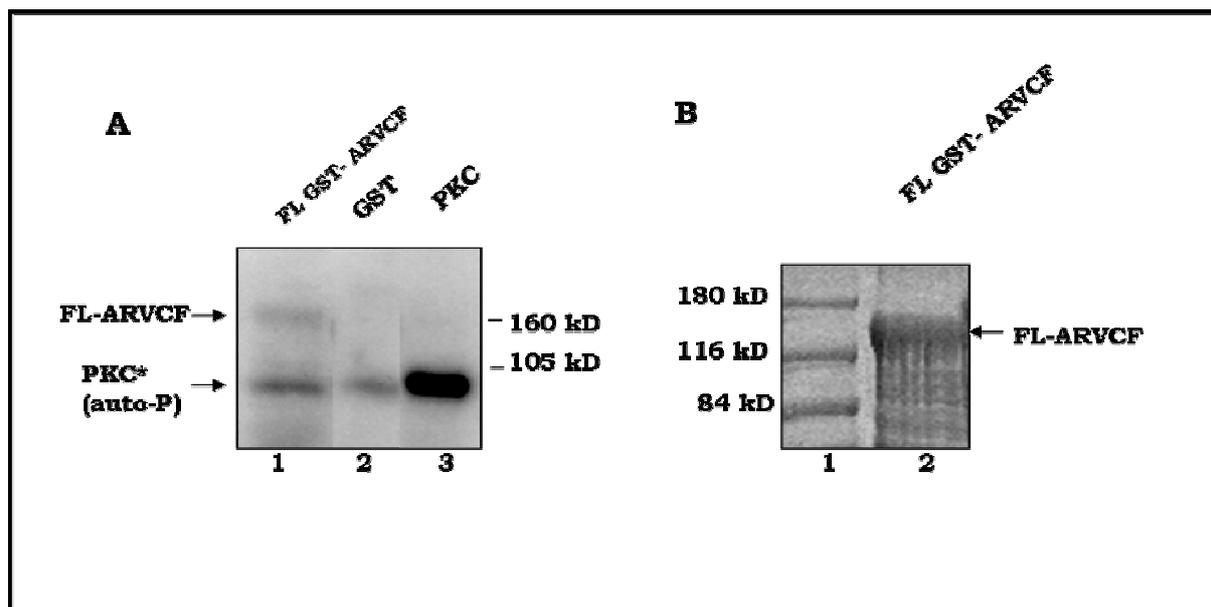
Alle anderen durch das Programm vorhergesagten Stellen für PKC liegen innerhalb der *armadillo repeat* Region sowie im C-Terminus des Proteins.

Für die Proteinkinase A wurde eine potentielle Phosphorylierungsstelle vorhergesagt, welche sich in der *armadillo repeat* Region befindet.

Weiterhin wurden vier potentielle Phosphorylierungsstellen für GSK3-β gefunden, wobei drei davon sich im N-Terminus und eine im C-Terminus des *Full length* Proteins befinden.

Es sollte nun festgestellt werden, ob eine der Kinasen ARVCF phosphorylieren kann. Hierzu wurde das Protein als GST-Fusionsprotein exprimiert und in einem *in-vitro* Kinase assay eingesetzt.

Die Durchführung des *in-vitro* Kinase assays fand an der Universitätsklinik in der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler statt.



**Abb. 14.:** **A.:** Kinase Assay mit FL GST-ARVCF in Spur 1, reinem GST in Spur 2 und PKC in Spur 3.  
**B.:** Nachweis des bakteriell exprimierten ARVCF-GST in einem Coomassie gefärbten 12%-igen PAA Gel (Spur 2). Spur 1 ist der 7B Größenstandard der Firma Sigma.

Das *full-length* Protein wurde, wie in Abbildung 14 A, Spur 1 zu sehen, von PKC phosphoryliert. Die Bande unterhalb von 105 kD entspricht der Autophosphorylierung der PKC, wie aus der Positivkontrolle in Spur 3 hervorgeht. GST alleine als Negativkontrolle wurde nicht phosphoryliert. PKA und GSK3- $\beta$ , welche auch in einem *in vitro* Kinase assay eingesetzt wurden, waren nicht in der Lage, ARVCF zu phosphorylieren (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.2. Änderung der subzellulären Lokalisation von ARVCF nach Cytokinbehandlung der Zellen**

Nachdem ARVCF *in vitro* durch PKC phosphoryliert wurde, sollte eine physiologische Relevanz dieser Phosphorylierung überprüft werden.

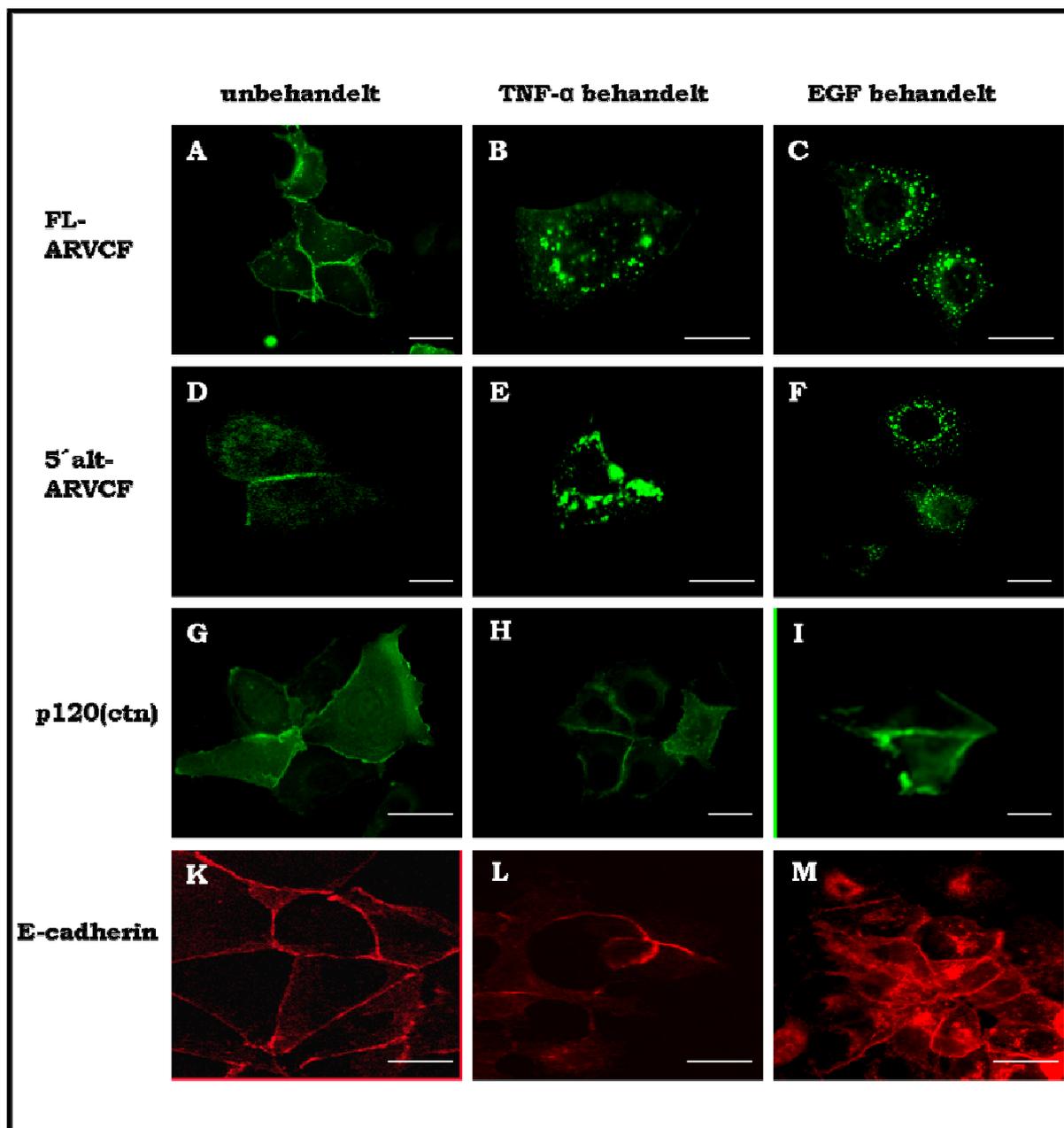
Physiologische Stimuli, wie zum Beispiel Cytokine sind in der Lage, die Architektur cadherinvermittelter *junctions* zu beeinflussen.

Dies geschieht unter anderem über eine Aktivierung der PKC durch diese Stimuli. PKC ihrerseits reguliert die biologische Aktivität einzelner Komponenten dieser *junctions* (Barbosa et al., 2003; Javaid et al., 2003).

Die Effekte von TNF- $\alpha$  und EGF, beides Cytokine mit Einfluss auf PKC (Barbosa et al., 2003; Javaid et al., 2003; Rosenzweig et al., 2002), auf die biologische Aktivität der Proteine ARVCF, p120(ctn) und E-cadherin sollte untersucht werden.

Da für die gesamte Arbeit keine Antikörper gegen ARVCF zur Verfügung standen wurde das Protein in allen folgenden Versuchen als GFP-Fusionsprotein exprimiert.

Zunächst wurden MCF7 Zellen mit FL-ARVCF-GFP, der Splicevariante 5'alt ARVCF-GFP sowie p120(ctn), auch als GFP-Fusionsprotein, transfiziert. Endogenes E-cadherin wurde mithilfe eines anti-E-cadherin Antikörpers nachgewiesen. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Proteine entweder in unbehandelten oder in für drei Stunden mit TNF- $\alpha$  oder EGF behandelten Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Abb. 15).



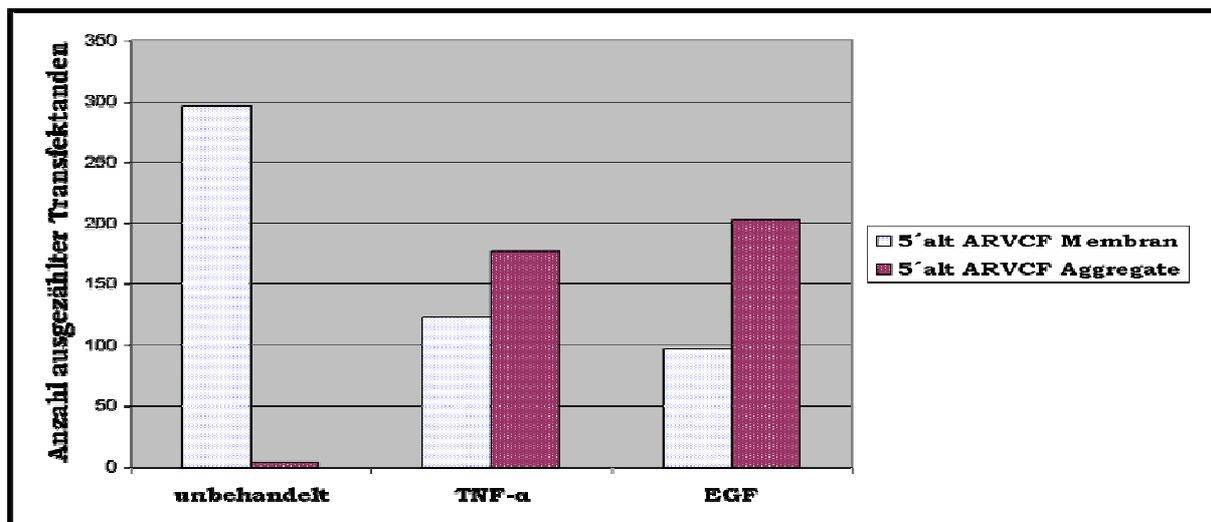
**Abb. 15.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MCF7 Zellen mit FL-ARVCF-GFP (A-C), 5'alt ARVCF-GFP (D-F) und p120(ctn) (G-I) transfiziert. Endogenes E-cadherin wurde mit Hilfe eines anti-E-cadherin Antikörpers nachgewiesen (K-M). Die Zellen wurden nach Transfektion entweder unbehandelt gelassen (A, D, G, K) oder für drei Stunden mit TNF- $\alpha$  (B, E, H, L) oder EGF (C, F, I, M) behandelt. Balken 10  $\mu\text{m}$ .

Fluoreszenzmikroskopische Analysen ergaben eine deutliche Membranlokalisation der beiden ARVCF Splicevarianten in unbehandelten Zellen, wie sie in unserem Labor auch schon in früheren Untersuchungen beobachtet wurde (Kaufmann et al., 2000; Waibler, 2002; Waibler et al., 2001), wohingegen eine Inkubation der Zellen mit TNF- $\alpha$  oder EGF zu einer

drastischen Akkumulation beider Varianten in cytoplasmatischen Aggregaten führte (Abb. 15, B, C, E, F).

Im Gegensatz dazu zeigten das *armadillo repeat* Protein p120(ctn) und E-cadherin auch in TNF- $\alpha$  und EGF behandelten Zellen eine Membranlokalisation (Abb. 15, H, I, L, M). Durch die Behandlung mit den Cytokinen ist die Membranstruktur in diesen Zellen allerdings nicht mehr so scharf sichtbar wie in unbehandelten Zellen.

Dies spricht dafür, dass die Cytokine TNF- $\alpha$  und EGF spezifisch die Translokation von ARVCF von der Zellmembran hin zu cytoplasmatischen Aggregaten beeinflussen, wobei offensichtlich die coiled-coil Region für diese Translokation nicht notwendig ist, da auch die Splicevariante 5'alt ARVCF, welche diese Region nicht besitzt eine Reaktion auf Cytokinbehandlung der Zellen zeigt.



**Abb. 16.: Auszählung transfizierter Zellen in Bezug auf Membran- bzw. Aggregatlokalisierung von ARVCF in unbehandelten und behandelten Zellen.**

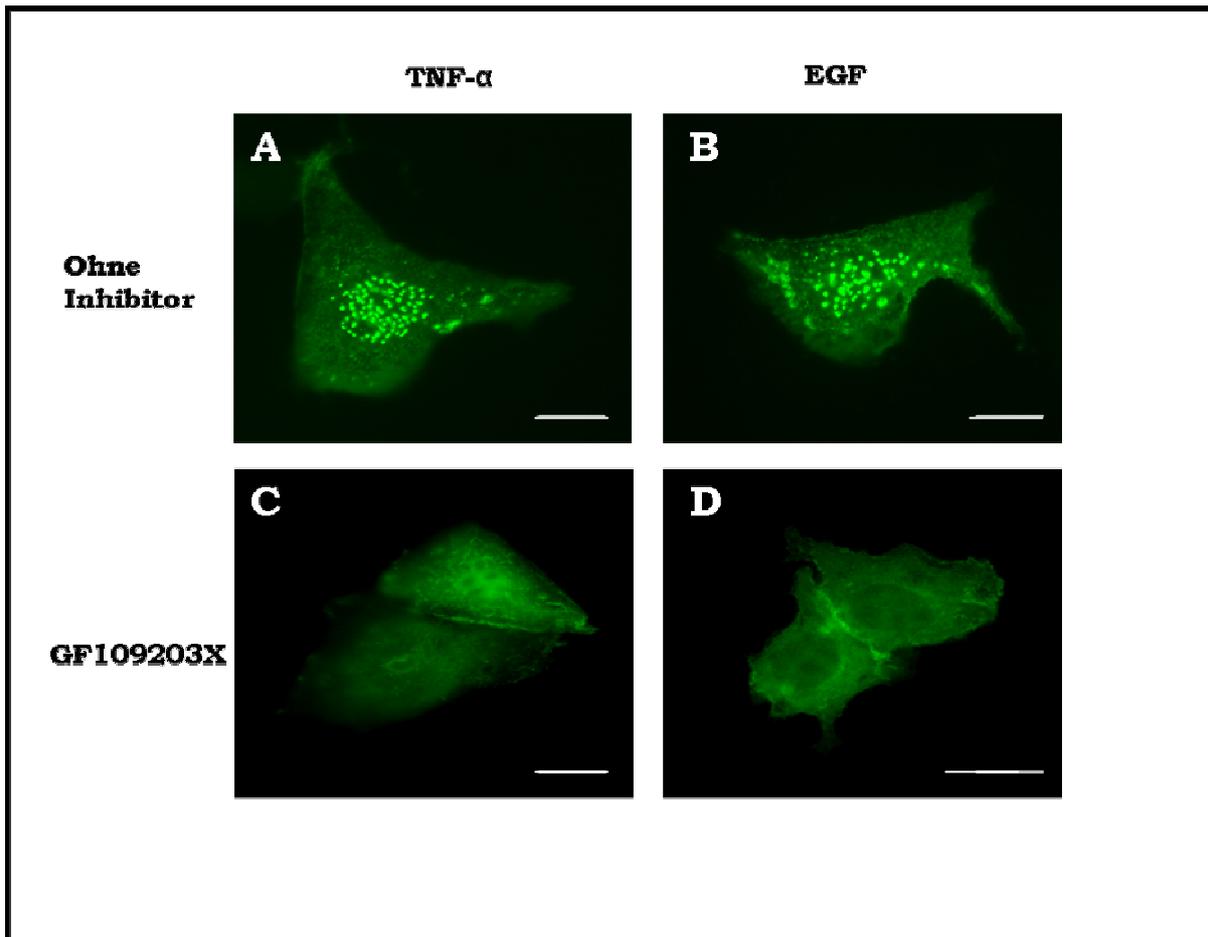
Es sollte eine Aussage über die Häufigkeit von membrangebundenem und cytoplasmatischem ARVCF gemacht werden. Hierzu wurden jeweils 300 mit 5'alt ARVCF transfizierte Zellen in unbehandeltem Zustand bzw. TNF- $\alpha$  oder EGF behandelt ausgezählt (Abb. 16). Mit den so erhaltenen Werten wurden, sowohl hier als auch in den folgenden Quantifizierungen, mit Pearson's Chi Quadrat-Test und mit Fisher's Exaktem Test p-Werte kleiner als  $10^{-9}$

errechnet, was ergab, dass Änderungen in der Lokalisation signifikant für eine Behandlung der Zellen mit TNF- $\alpha$  oder EGF sind.

#### **4.2.3. Einfluss der Proteinkinase C auf die Translokation von ARVCF von der Plasmamembran in das Cytoplasma**

Aufgrund der Tatsache, dass PKC die einzige Kinase war, welche ARVCF *in vitro* phosphorylieren konnte (Abb. 14), wurde untersucht, ob Proteinkinase C bei der cytokininduzierten Translokation von ARVCF eine Rolle spielen könnte.

Hierzu wurden MCF7 Zellen mit der Splicevariante 5'alt ARVCF transfiziert. Die Kulturen wurden nach 24 Stunden mit TNF- $\alpha$  oder EGF behandelt, entweder in Abwesenheit oder in Anwesenheit des spezifischen PKC-Inhibitors 2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimid (Bisindolylmaleimid, GF109203X), welcher eine Stunde vor Cytokinbehandlung zum Einsatz kam.



**Abb. 17.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit 5'alt ARVCF transfizierten MCF7 Zellen. Zellen wurden und mit TNF- $\alpha$  (A, C) oder EGF (B, D) behandelt. Zellen in C und D wurden zuvor für eine Stunde mit dem PKC-Inhibitor GF109203X behandelt. Balken 10  $\mu$ m.

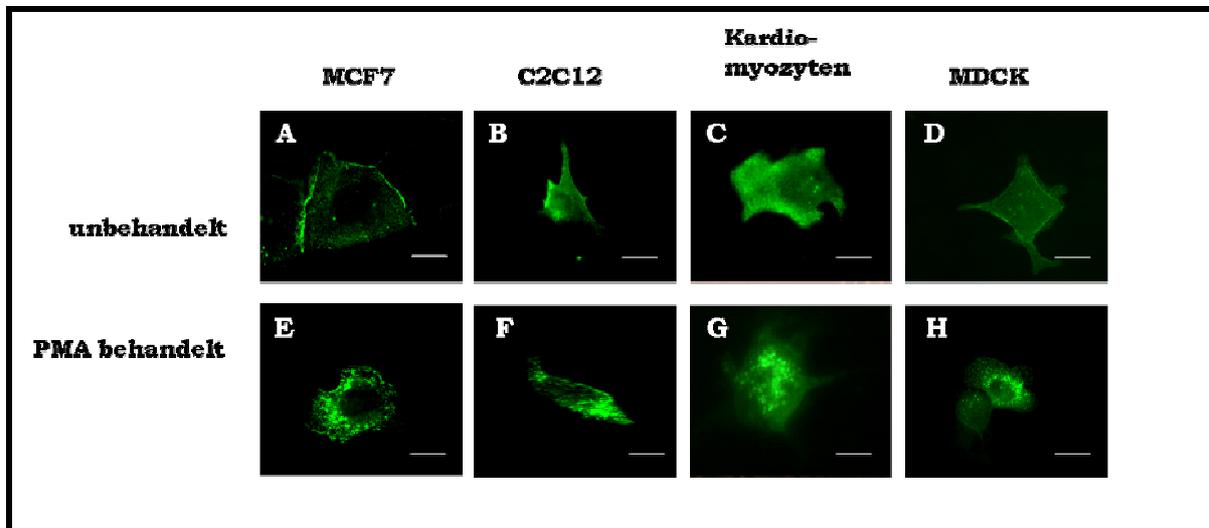
Die auch schon zuvor beobachtete Aggregatbildung von 5'alt ARVCF nach Cytokinbehandlung (A, B) konnte in Zellen, welche zuvor für eine Stunde mit dem Inhibitor GF109203X behandelt wurden, nicht mehr gezeigt werden (C, D). Vielmehr war in diesen Zellen ARVCF wie in unbehandelten Zellen vorwiegend an der Zellmembran zu finden.

Dieser Befund spricht für eine Involvierung der PKC bei der Translokation von ARVCF als Reaktion auf Cytokinbehandlung der Zellen.

#### 4.2.4. Translokation von ARVCF durch PMA in unterschiedlichen Zelltypen.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse konnte eine Beteiligung der PKC bei der Translokation von ARVCF als Reaktion auf Cytokinbehandlung vermutet werden. Es sollte nun herausgefunden werden, ob auch eine direkte Aktivierung der PKC einen der Cytokinbehandlung ähnlichen Effekt auf ARVCF zeigt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Effekt Zelltyp-unabhängig oder auf MCF7 Zellen beschränkt ist.

Hierfür wurde eine direkte Aktivatorsubstanz der Proteinkinase C, der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; TPA) in verschiedenen mit 5'alt ARVCF transfizierten Zelllinien eingesetzt. Es wurden Zelllinien aus unterschiedlichen Spezies gewählt, um zu überprüfen, ob auftretende Effekte Spezies übergreifend sind.

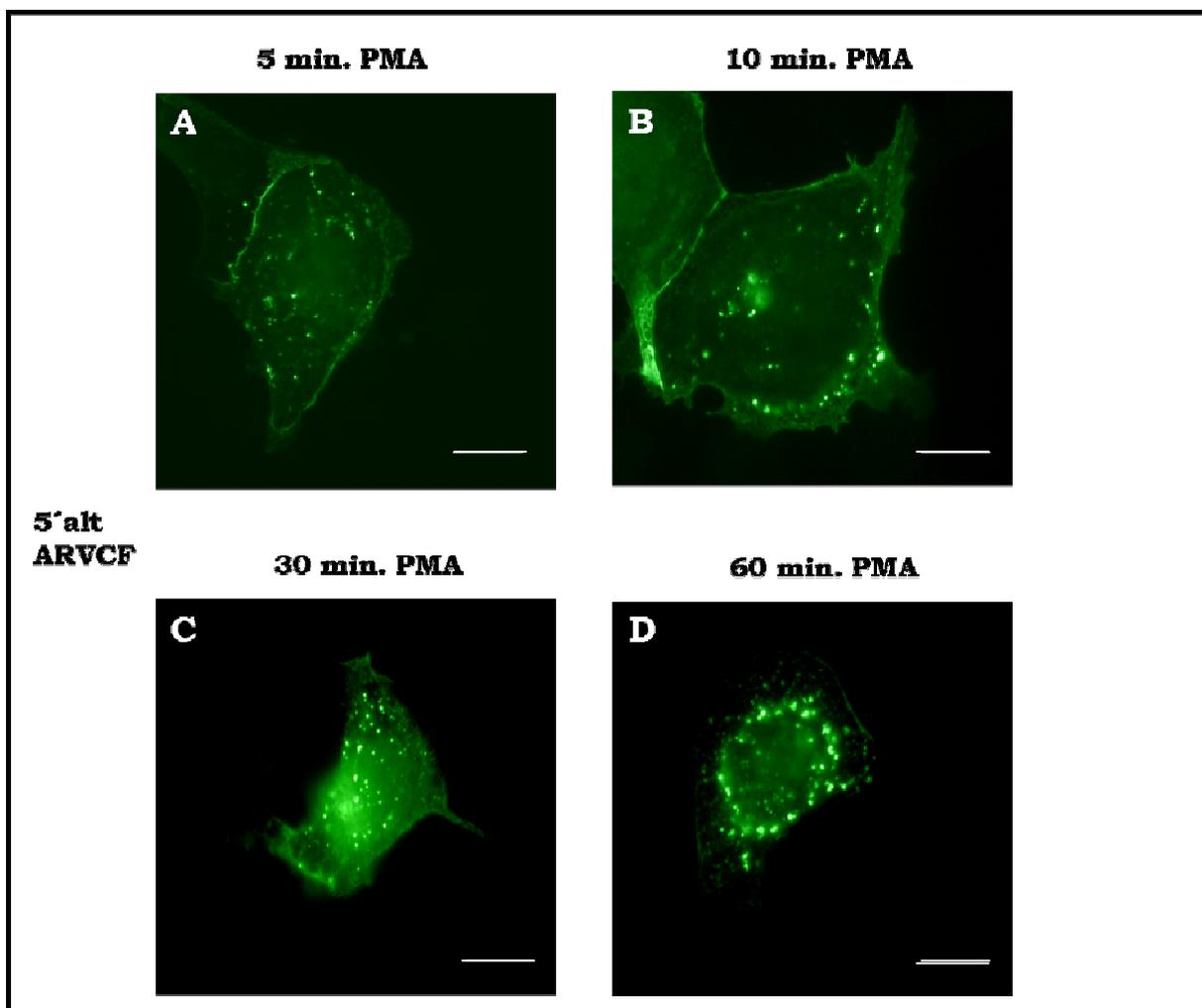


**Abb. 18.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit 5'alt ARVCF transfizierten MCF7-, C2C12-, Kardiomyocyten und MDCK-Zellen. Die Zellen wurden entweder nicht behandelt (A-D) oder für eine Stunde mit PMA behandelt (E-H). Balken 10 µm.

5´alt ARVCF in MCF7-Zellen, C2C12-Zellen sowie MDCK-Zellen war vorwiegend an der Zellmembran zu finden (A, B, D). In unbehandelten primären Kardiomyocyten lokalisierte das Protein über das Cytoplasma verteilt (C). Behandlung der verschiedenen Zellkulturen mit PMA führte zu einer reduzierten Membranfärbung und cytoplasmatischen ARVCF Aggregaten in allen untersuchten Zelltypen (E-H).

Weiterhin war von großem Interesse, wie schnell der durch PMA hervorgerufene Effekt auftritt und wie lange er beobachtet werden kann.

Hierzu wurde 5´alt ARVCF in MCF7 Zellen transfiziert, welche mit dem Phorbolster behandelt wurden.

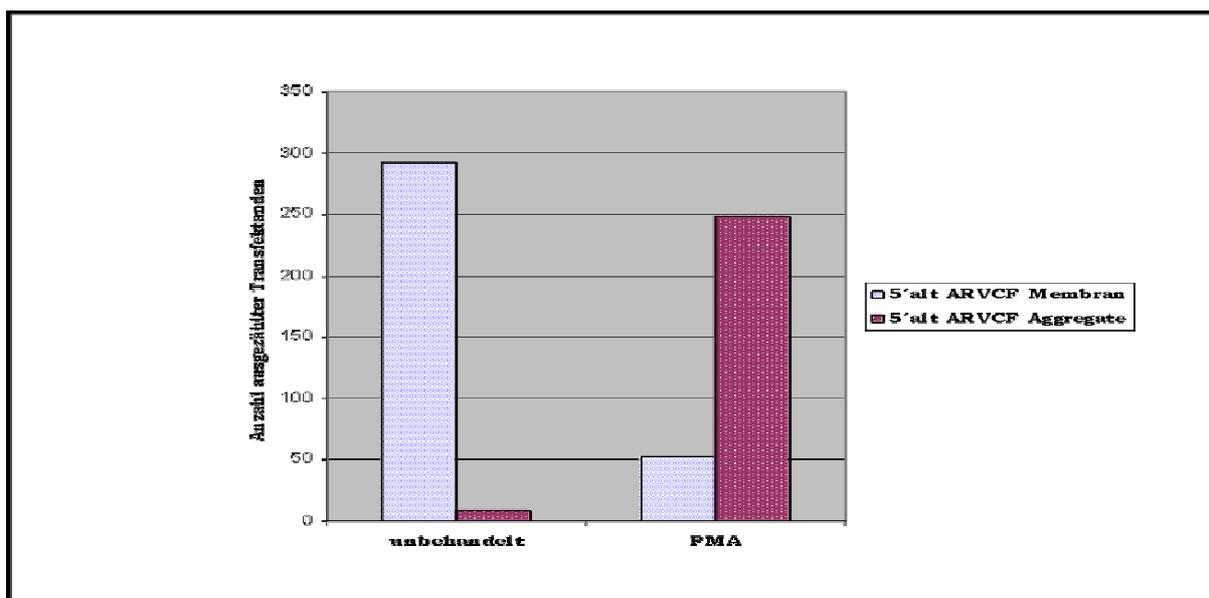


**Abb. 19.:** Zeitabhängige subzelluläre Lokalisation von 5´alt ARVCF nach Inkubation der Zellen mit PMA. Balken 10 µm.

Die Änderung der Lokalisation von ARVCF nach Stimulation der Zellen mit PMA konnte bereits fünf Minuten nach Gabe des Phorbolesters beobachtet werden (Abb. 19, A). Zu diesem Zeitpunkt beginnt sich ARVCF von der Plasmamembran abzulösen und in cytoplasmatischen Aggregaten aufzutauchen. Bereits nach 30 Minuten war fast das gesamte Protein von der Membran abgelöst (Abb. 19, C). Der hier beobachtete Effekt war nicht reversibel, d.h. einmal von der Membran abgelöst war ARVCF auch nach der Wegnahme des Stimulus für 24 Stunden immer noch in cytoplasmatischen Aggregaten lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

Es kann also gesagt werden, dass PMA auf ARVCF denselben Effekt aufweist wie die Cytokine TNF- $\alpha$  und EGF. Diese Tatsache liefert einen weiteren Hinweis auf die Involvierung der PKC bei der Translokation von ARVCF. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass der Effekt in mehreren Zelltypen auftreten kann und nicht auf MCF7 Zellen beschränkt ist.

Anzumerken ist auch, dass der PMA-induzierte Effekt bereits nach kurzer Zeit der Inkubation, etwa 5 Minuten, auftrat, wohingegen der Effekt nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder EGF erst nach einer längeren Stimulation von 2-3 Stunden auftrat.



**Abb. 20.:** Quantifizierung der Ergebnisse durch auszählen von je 300 mit 5'alt ARVCF transfizierter MCF7 Zellen vor und nach PMA-Behandlung.

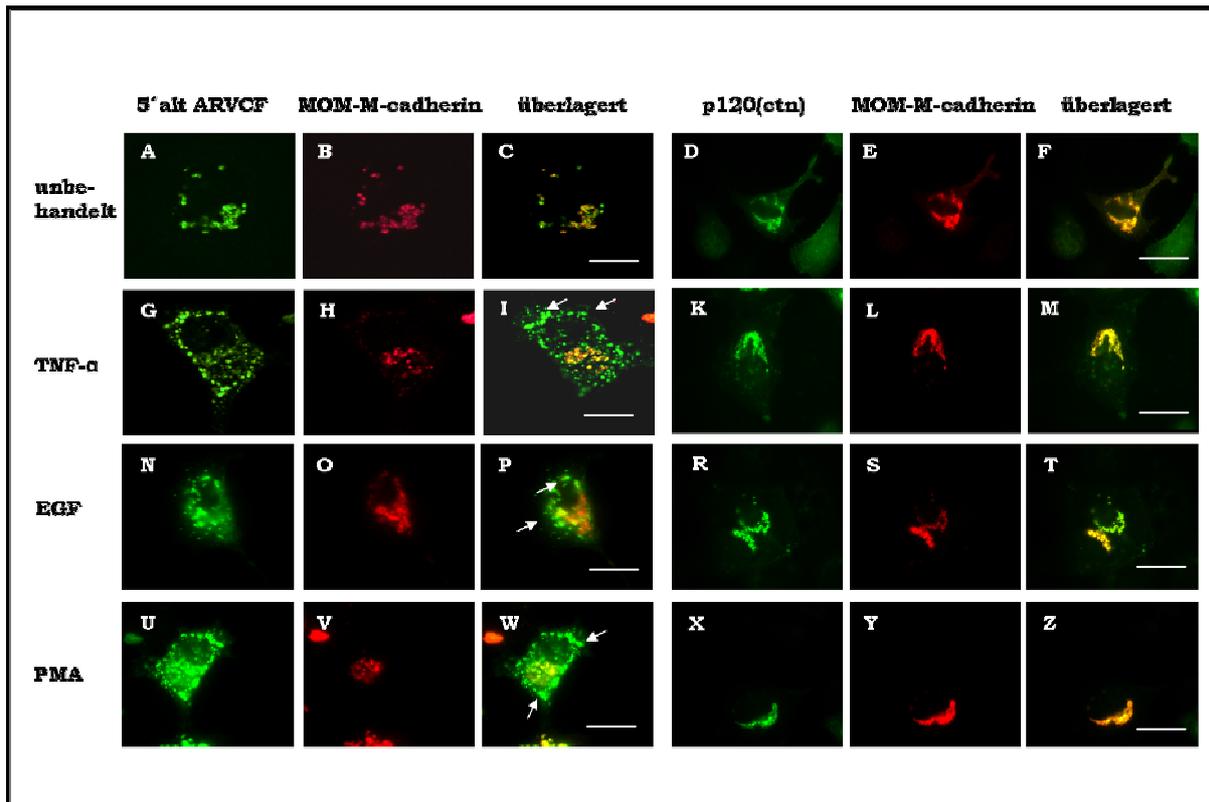
Auch für PMA-Behandlung wurden 300 MCF7-Zellen im Hinblick auf Änderung der Lokalisation von ARVCF nach Behandlung ausgezählt. Mit den Werten wurde wieder eine statistische Analyse durchgeführt, wobei hoch signifikante Änderungen ( $p < 10^{-9}$ ) von Membranfärbung hin zu Akkumulation in cytoplasmatischen Aggregaten nach Behandlung beobachtet werden konnte (Abb. 20). Ähnliche Werte wurden für die anderen Zelllinien ermittelt (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.5. TNF- $\alpha$ , EGF und PMA induzieren eine abgeschwächte Cadherinbindung von ARVCF**

ARVCF bindet an die Juxtamembranregion der Cadherine, wie bereits in Coimmunopräzipitation und im *MOM-recruitment assay* gezeigt werden konnte (Kaufmann et al., 2000).

Die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte Membranlokalisation von ARVCF nach TNF- $\alpha$ -, EGF- und PMA- Behandlung legen eine abgeschwächte Bindung an die Cadherine nahe, zumal die Cadherine selbst bei einer Behandlung der Zellen weiterhin Membranständig blieben (s. Abb. 15).

Es wurde das *MOM-recruitment assay* angewendet, eine Methode, mit welcher Protein-Protein Interaktionen in einem zellulären Kontext getestet werden können, um eine Änderung im Bindungsverhalten sichtbar zu machen (Hatzfeld et al., 2003; Kaufmann et al., 2000; Waibler et al., 2001). MCF7 Zellen wurden mit MOM-M-cadherin und entweder 5'alt ARVCF oder p120(ctn) kotransfiziert. Die Zellen wurden dann entweder nicht behandelt oder mit TNF- $\alpha$ , EGF oder PMA inkubiert.

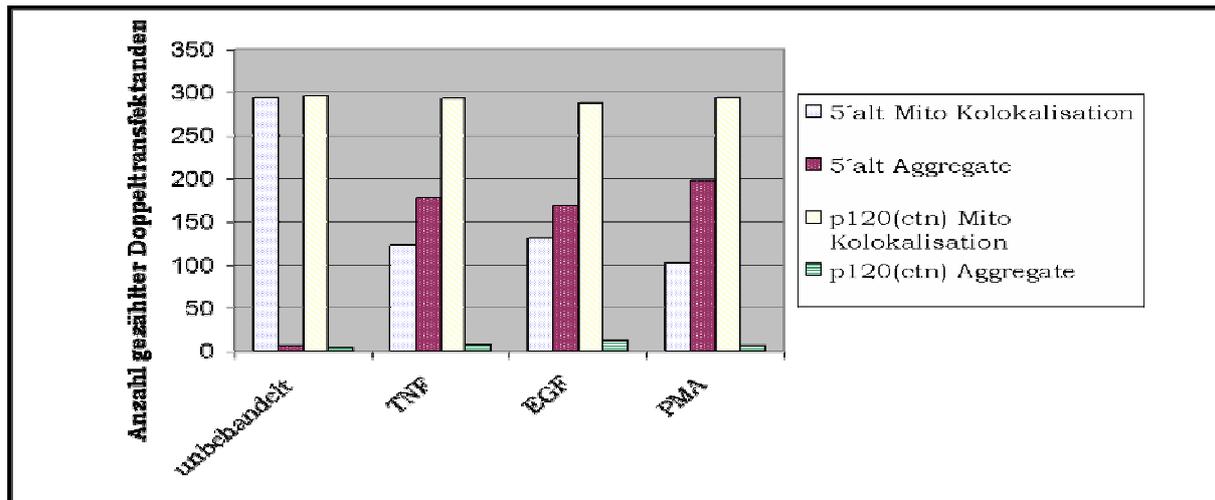


**Abb. 21.:** MOM-recruitment assay in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. MCF7 Zellen wurden mit MOM-M-cadherin und entweder 5'alt ARVCF (A-C; G-I; N-P; U-W) oder p120(ctn) (D-F; K-M; R-T; X-Z) kotransfiziert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (A-F) oder wurden mit TNF- $\alpha$  (G-M), EGF (N-T) oder PMA (U-Z) inkubiert. Weiße Pfeile markieren Regionen, in welchen keine Überlagerung der untersuchten Proteine zu sehen ist. Balken 10  $\mu$ m.

In unbehandelten Zellen konnte eine klare Kolo-kalisation von MOM-M-cadherin sowohl mit 5'alt ARVCF als auch mit p120(ctn) beobachtet werden (A-F). Eine Schwächung der Kolo-kalisation trat für ARVCF bei Behandlung mit allen drei Substanzen ein (G-I; N-P; U-W). p120(ctn) kolo-kalisierte im Gegensatz dazu auch nach Behandlung der Zellen mit MOM-M-cadherin (K-M; R-T; X-Z).

Dies zeigt, dass sowohl die Cytokine TNF- $\alpha$  und EGF als auch der Phorbol-ester PMA in der Lage sind eine Schwächung der Cadherinbindung von ARVCF, nicht jedoch von p120(ctn), herbeizuführen.

Weiterhin ist eine Lokalisation von ARVCF an der Plasmamembran keine Voraussetzung für diese abgeschwächte Cadherinbindung, da sie auch an der Mitochondrienmembran im MOM assay zu sehen ist.



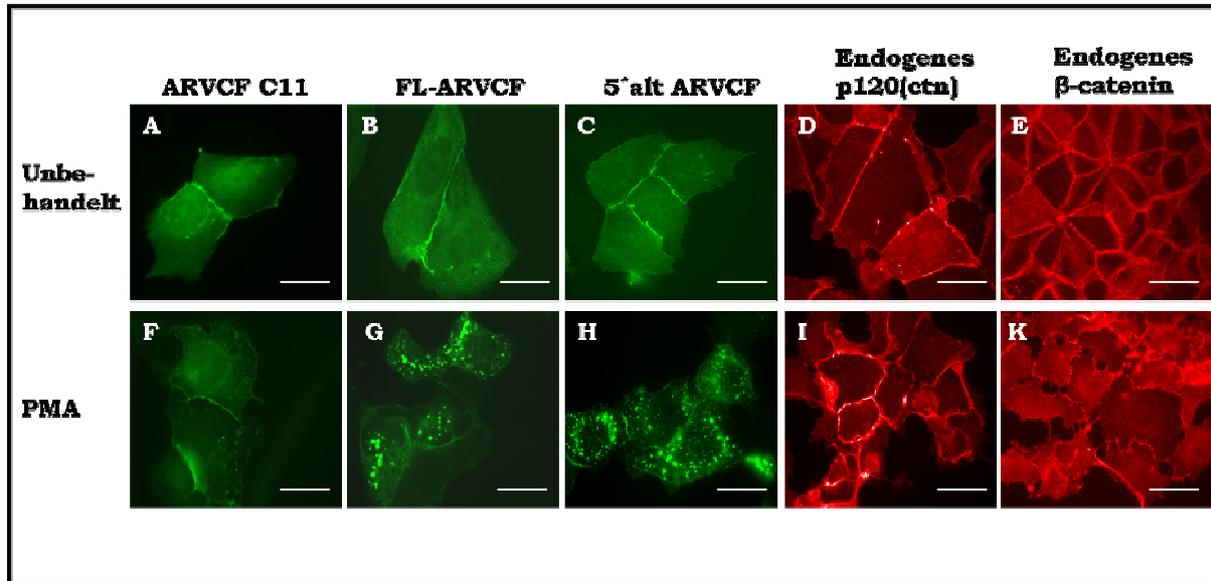
**Abb. 22.:** Quantifizierung der Ergebnisse durch auszählen von je 300 mit 5'alt ARVCF und MOM-M-cadherin oder p120(ctn) und MOM-M-cadherin Doppeltransfizierter MCF7 Zellen vor und nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ , EGF oder PMA.

Die Abschwächung der Cadherinbindung sollte quantifizieren werden. Dazu wurden 300 Doppeltransfektanden von jeder Behandlung ausgezählt und statistisch ausgewertet. Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p < 10^{-9}$ ) zwischen Behandlung der Zellen und abgeschwächter Cadherinbindung von ARVCF.

#### 4.2.6. Die Rolle des N-Terminus von ARVCF bei der Antwort des Proteins auf PMA und Cytokinbehandlung.

Die Proteindomäne von ARVCF, welche die Antwort auf die Behandlung der Zellen mit Cytokinen und PMA vermittelt, sollte eingegrenzt werden. Hierfür wurden die zwei am häufigsten natürlich auftretenden Splicevarianten von ARVCF, FL-ARVCF 3/7 und 5'alt ARVCF 3/7 (Waibler et al., 2001) sowie eine N-terminale Deletionsmutante, ARVCF C11 (Abb. 6) auf die PMA induzierte cytoplasmatische Aggregation untersucht. Von ARVCF C11 ist bekannt, dass diese Variante über Ihre intakte *armadillo repeat* Region an Cadherine binden und mit ihnen kolokalisieren kann (Kaufmann et al.,

2000). Als Negativkontrollen wurden die endogenen Proteine p120(ctn) und  $\beta$ -catenin mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.



**Abb. 23.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MCF7 Zellen. ARVCF C11 ohne N-Terminus (A, F), FL-ARVCF mit *coiled-coil* Domäne (B, G) und 5'alt ARVCF (C, H) wurden transfiziert. Die endogenen Proteine p120(ctn) (D, I) und  $\beta$ -catenin (E, K) wurden mit den entsprechenden Antikörpern visualisiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (A-E) oder wurden für eine Stunde mit PMA behandelt (F-K). Balken 10  $\mu$ m.

Beide untersuchten Splicevarianten von ARVCF zeigten Aggregatbildung nach Behandlung der Zellen mit PMA (G, H). Das einzige ARVCF Protein, welches nicht auf eine Inkubation der Zellen reagierte war die Deletionsmutante ARVCF C11, welcher der komplette N-Terminus fehlt (F). Auch die verwandten Proteine p120(ctn) (I) und  $\beta$ -catenin (K) zeigten keine veränderte Lokalisation nach PMA-Behandlung. Die Membranarchitektur an sich war jedoch, wie auch schon in Abb. 15, gegenüber unbehandelten Zellen etwas undefinierter.

Da die Deletionsmutante ARVCF C11 nicht auf eine Behandlung der Zellen reagierte, konnte gefolgert werden, dass der N-Terminus des Proteins bei der Antwort eine tragende Rolle spielt. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich die Splicevariante 5'alt ARVCF, welcher die *coiled-coil* Region fehlt, nach einer

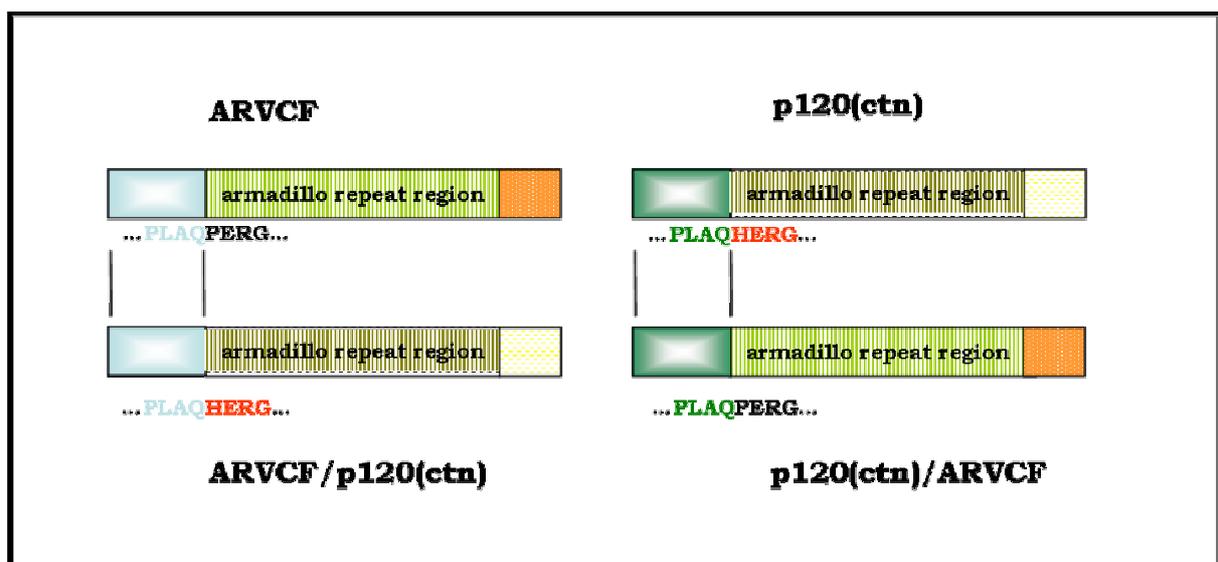
Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster in cytoplasmatischen Aggregaten wieder findet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der N-Terminus von ARVCF ohne *coiled-coil* Region notwendig und ausreichend für eine PMA induzierte Translokation des Proteins ist.

#### 4.2.7. p120(ctn) mit dem N-Terminus von ARVCF reagiert auf PMA-Stimulation.

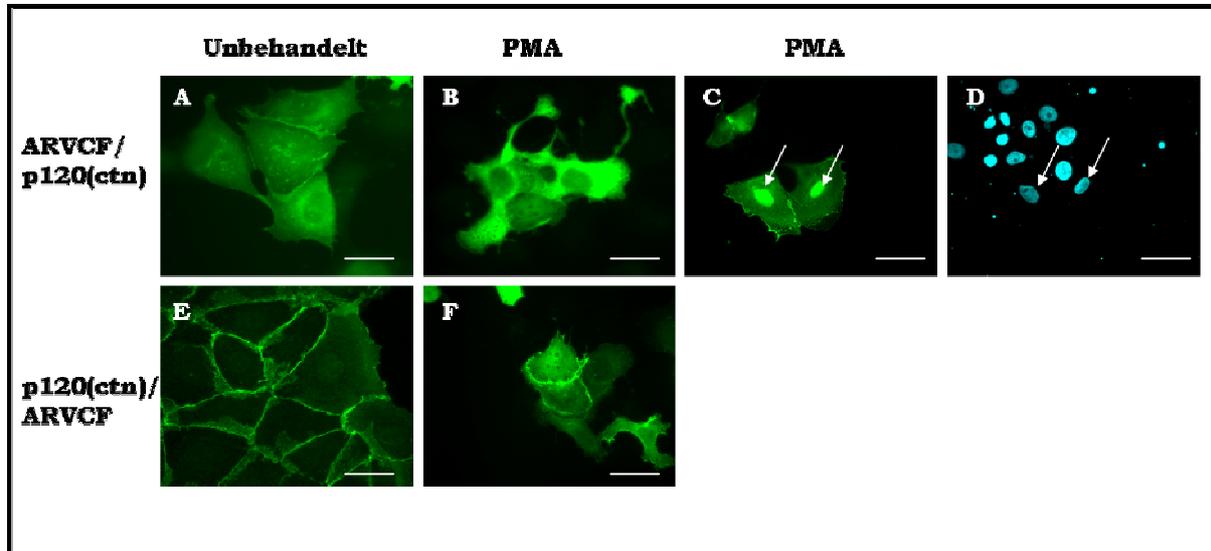
Aufgrund der Deletionsmutante ARVCF C11, welche nicht auf Behandlung mit dem Phorbolster PMA reagiert, konnte vermutet werden, dass die N-terminale Domäne von ARVCF für die PMA- (und Cytokin-) induzierte cytoplasmatische Aggregation des Proteins und damit einhergehend einer abgeschwächten Cadherinbindung nötig ist.

Um dies weiter zu belegen wurden mittels PCR mit überlappenden Primern chimäre Moleküle hergestellt, bei welchen der N-Terminus von ARVCF mit dem Rest von p120(ctn) (ARVCF/p120(ctn)) fusioniert wurde und umgekehrt (p120(ctn)/ARVCF), um weitere Hinweise auf die Wichtigkeit des ARVCF N-Terminus zu erhalten.



**Abb. 24.:** Schematische Darstellung der chimären Proteine ARVCF/p120(ctn) und p120(ctn)/ARVCF. Die N-Termini der beiden Proteine wurden jeweils mit dem Rest des anderen Proteins fusioniert.

Diese chimären Proteine wurden in MCF7 Zellen exprimiert und auf Translokation nach PMA- Behandlung untersucht.



**Abb. 25.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit ARVCF/p120(ctn) (A-C) und p120(ctn)/ARVCF (E, F) transfizierten MCF7 Zellen, welche entweder unbehandelt blieben (A, E) oder für eine Stunde mit PMA behandelt wurden (B, C, F). Nuclei zu Abbildung C wurden mit DAPI visualisiert (D). Weiße Pfeile zeigen nukleäre Lokalisation. Balken 10  $\mu\text{m}$ .

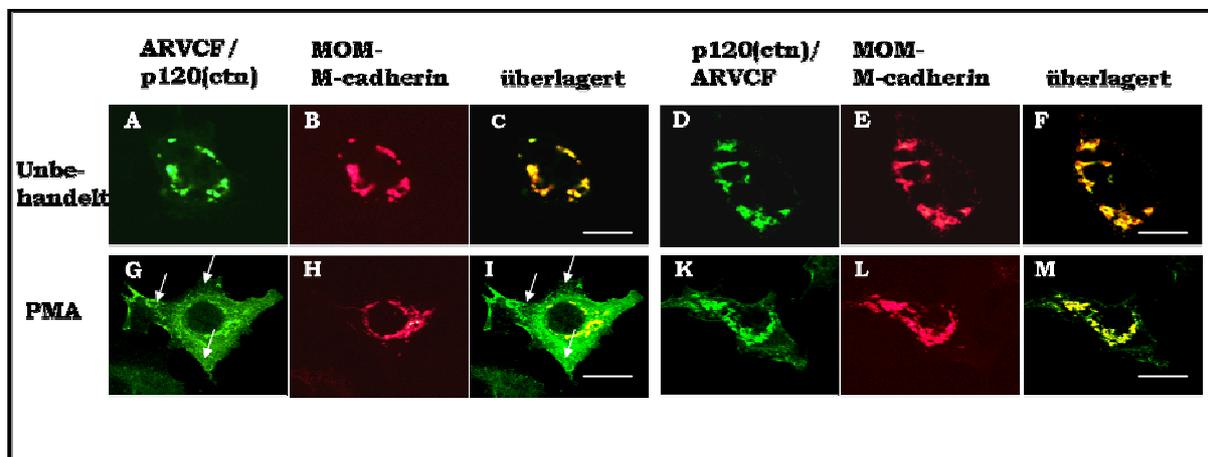
Beide chimären Proteine waren in unbehandelten Zellen nach Expression an der Zellmembran lokalisiert (A, E). p120(ctn)/ARVCF änderte seine Membranlokalisation auch nach einer Behandlung mit PMA nicht (F).

Im Gegensatz dazu zeigte das chimäre Molekül ARVCF/p120(ctn) nach PMA-Behandlung eine Translokation von der Zellmembran in das Cytoplasma (B) oder, in etwa 10% der Fälle, den Nucleus (C). Nach Translokation des chimären Proteins ARVCF/p120(ctn) konnte jedoch keine Aggregatbildung des Proteins mehr beobachtet werden.

Es kann jedoch festgehalten werden, dass durch die Übertragung des N-Terminus von ARVCF auf p120(ctn) dieses auf eine Stimulation der Zellen mit PMA reagiert.

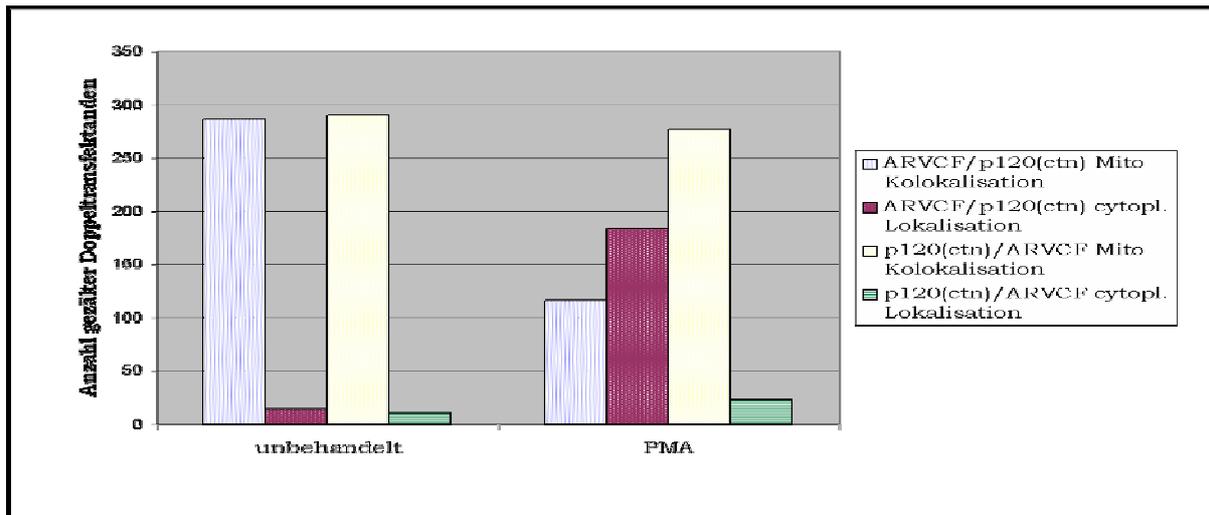
#### 4.2.8. Abgeschwächte Cadherinbindung von ARVCF/p120(ctn) nach PMA-Behandlung

Die Translokation des chimären Proteins ARVCF/p120(ctn) von der Zellmembran in das Cytoplasma gab einen Hinweis auf eine reduzierte Cadherinbindung des Moleküls nach Behandlung der Zellen mit PMA. Um dies zu überprüfen wurden die beiden chimären Moleküle ARVCF/p120(ctn) und p120(ctn)/ARVCF jeweils mit MOM-M-cadherin koexprimiert und im MOM *recruitment assay* untersucht.



**Abb. 26.:** ARVCF/p120(ctn) (A-C, G-I) und p120(ctn)/ARVCF (D-F, K-M) wurden jeweils mit MOM-M-cadherin in MCF7 Zellen Koexprimiert und entweder nicht behandelt (A-F) oder für eine Stunde mit PMA inkubiert (G-M). Weiße Pfeile markieren Regionen ohne Kolokalisation der beiden Proteine. Balken 10  $\mu$ m.

Wie erwartet war bei beiden chimären Proteinen eine Kolokalisation mit der cytoplasmatischen Domäne von M-cadherin in unbehandelten Zellen sichtbar (A-F). Die Bindung von ARVCF/p120(ctn) an M-cadherin im MOM *recruitment assay* war nach Behandlung der Zellen mit PMA abgeschwächt, wobei das Protein über das Cytoplasma verteilt und nicht in Aggregaten zu beobachten war (G, I). p120(ctn)/ARVCF kolokalisierte auch nach einer Behandlung der Zellen mit MOM-M-cadherin (K-M).



**Abb. 27.:** Quantifizierung der Ergebnisse durch auszählen von je 300 mit ARVCF /p120(ctn) und MOM-M-cadherin oder p120(ctn)/ARVCF und MOM-M-cadherin Doppeltransfizierter MCF7 Zellen vor und nach Behandlung mit PMA.

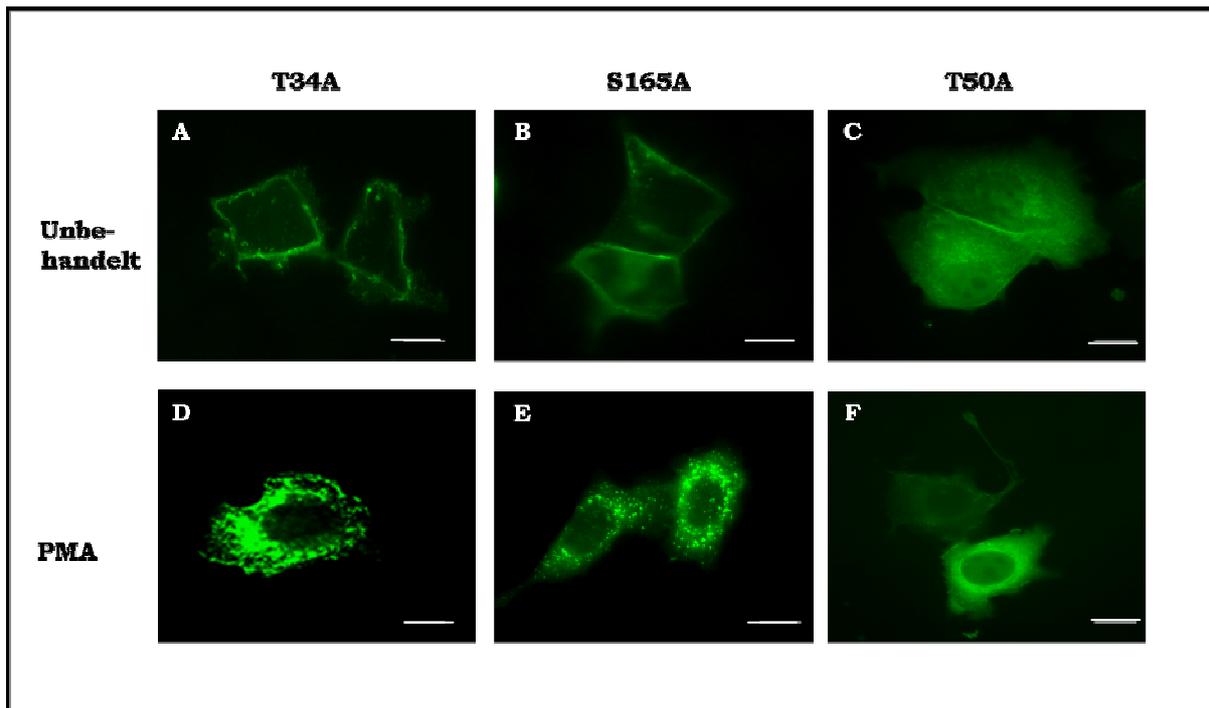
Um die Abschwächung der Cadherinbindung zu quantifizieren wurden je 300 Doppeltransfektanden ohne und mit PMA-Behandlung ausgezählt und statistisch ausgewertet. Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p < 10^{-9}$ ) zwischen Behandlung der Zellen und abgeschwächter Cadherinbindung von ARVCF/p120(ctn).

Es kann also festgehalten werden, dass der N-Terminus ohne *coiled-coil* Domäne notwendig und ausreichend ist, um die abgeschwächte Cadherinbindung von ARVCF nach PMA-Behandlung auf p120(ctn) zu übertragen.

#### **4.2.9. T50A Mutante von ARVCF reagiert auf PMA Stimulation**

Da der Effekt der Translokation und der abgeschwächten Cadherinbindung von ARVCF nach Aktivierung der PKC auf den N-Terminus ohne *coiled-coil* Domäne eingeschränkt werden konnte, wurden einzelne Aminosäuresubstitutionen in den potentiellen PKC Phosphorylierungsstellen in dieser Domäne eingefügt. Die Threonine an den Positionen 34, 35, 45, 50, 53, 205 und 248 sowie die Serine an den Positionen 165 und 247, welche

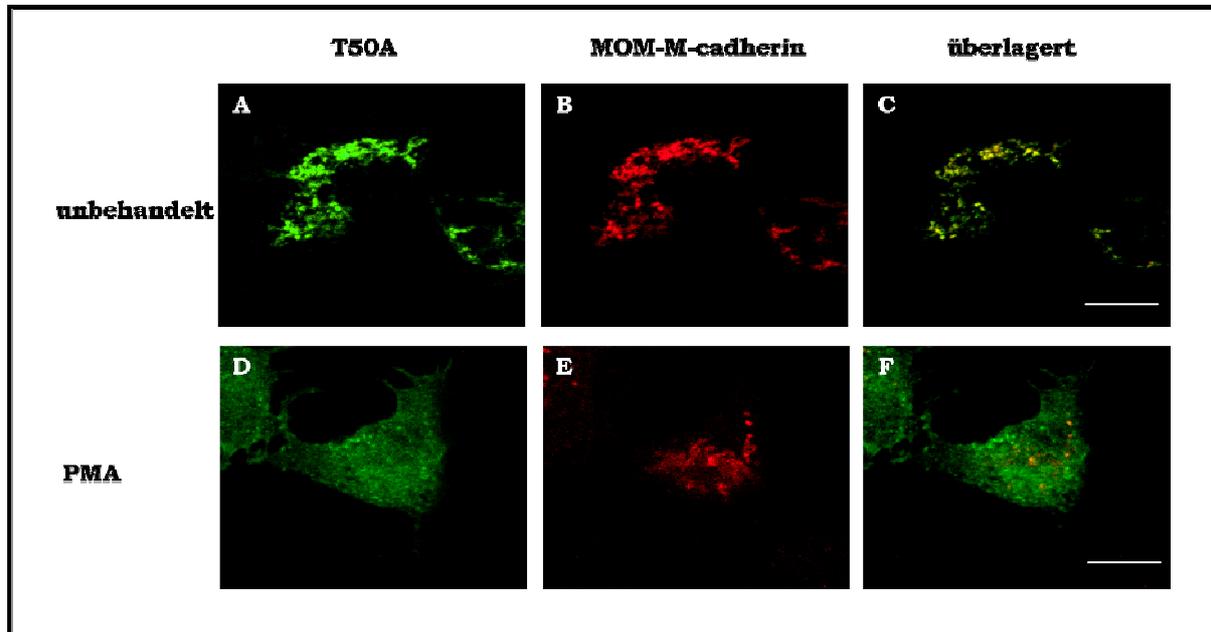
alle durch Computervorhersagen als potentielle PKC –Phosphorylierungsstellen identifiziert worden waren, wurden einzeln gegen Alanin ausgetauscht. Hierbei wurde das Startmethionin der Splicevariante 5'alt ARVCF als Aminosäure eins definiert. Die so erhaltenen Mutanten wurden als GFP-Fusionsproteine in MCF7 Zellen exprimiert und es wurde überprüft, wo die einzelnen Moleküle vor und nach PMA-Behandlung lokalisieren.



**Abb. 28.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der 5'alt ARVCF Mutanten T34A (A, D), S165A (B, E) und T50A (C, F) in MCF7 Zellen. Die Zellen wurden entweder nicht behandelt (A-C) oder für eine Stunde mit PMA inkubiert (D-F). Balken 10  $\mu$ m.

Alle Mutanten zeigten eine Zellmembranlokalisierung in unbehandelten Zellen (Beispielhaft gezeigt für T34A, S165A und T50A; A-C). Weiterhin konnte für alle Mutanten nach PMA-Behandlung der Zellen eine Aggregatbildung, wie auch bereits für natives ARVCF beobachtet, gezeigt werden (Beispielhaft gezeigt für T34A und S165A; D, E). Auch die Mutante T50A reagierte auf eine Behandlung der Zellen mit PMA mit einer Translokation von der Zellmembran in das Cytoplasma. Es konnte jedoch keine Aggregatbildung mehr festgestellt werden. Vielmehr war diese Mutante gleichförmig über das Cytoplasma verteilt (F).

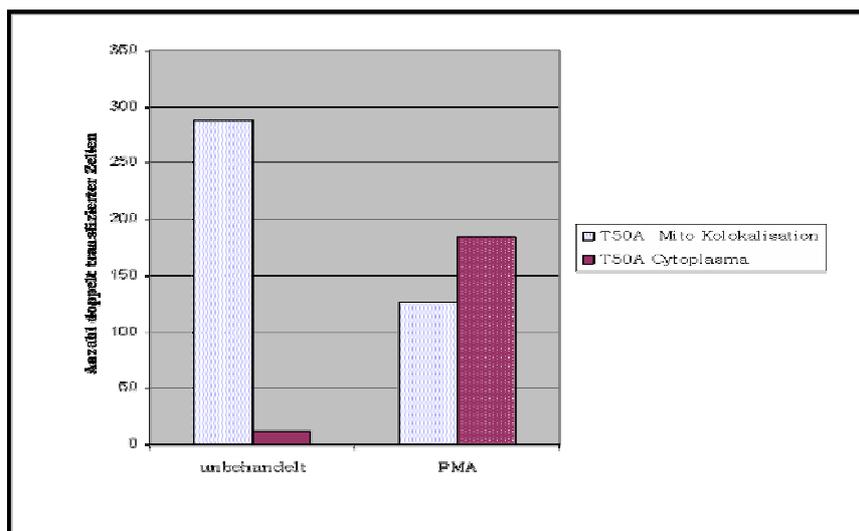
Weiterhin sollte untersucht werden, ob auch die Bindung der T50A Mutante an Cadherine durch PMA-Einfluß geschwächt werden kann. Hierzu wurde die Mutante mit MOM-M-cadherin koexprimiert und die Zellen mit PMA behandelt.



**Abb. 29.:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des MOM *recruitment assay*. Die Mutante T50A wurde in MCF7 Zellen mit MOM-M-cadherin koexprimiert. Die Zellen wurden entweder nicht behandelt (A-C) oder für eine Stunde mit PMA inkubiert (D-F).

In unbehandelten Zellen war eine Kolokalisation der beiden Proteine zu beobachten (A-C), die T50A Mutante ist also noch in der Lage, an die cytoplasmatische Domäne von M-cadherin zu binden. Wurden die Kulturen für eine Stunde mit PMA behandelt, konnte eine Verteilung der Mutante über das Cytoplasma gezeigt werden, wohingegen MOM-M-cadherin weiterhin an der Mitochondrienmembran zu sehen war (D-F).

Die T50A Mutante zeigte also eine geschwächte Cadherinbindung nach Behandlung der Zellen mit PMA.



**Abb. 30.: Quantifizierung der Ergebnisse durch Auszählen von je 300 mit T50A und MOM-M-cadherin doppeltransfizierter MCF7 Zellen vor und nach Behandlung mit PMA.**

Die Abschwächung der Cadherinbindung der T50A Mutante sollte quantifiziert werden. Dazu wurden je 300 Doppeltransfektanden ohne und mit PMA-Behandlung ausgezählt und statistisch ausgewertet. Es ergab sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p < 10^{-9}$ ) zwischen Behandlung der Zellen und abgeschwächter Cadherinbindung der Mutante T50A.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Threonin an der Position 50 in 5'alt ARVCF eine Rolle in der Antwort auf PKC-Aktivierung spielt, da die Translokation des Proteins in das Cytoplasma und die abgeschwächte Cadherinbindung noch beobachtet werden konnten. Diese Mutante zeigte jedoch keine cytoplasmatische Aggregation mehr als Antwort auf PMA-Behandlung.

## 5. Diskussion

### 5.1. Der Hefe Zweihybrid screen

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Hefe Zweihybrid screen  $\alpha$ -actinin als neuer Bindungspartner des *armadillo repeat* Proteins ARVCF festgestellt.  $\alpha$ -actinin ist ein Cytoskelettprotein, welches als quervernetzende Komponente für Actinfilamente fungiert (Pelletier et al., 2003).

Bei einem Hefe Zweihybrid screen kann es immer zu einer Transaktivierung durch das Köderprotein kommen (Bartel et al., 1993; Chien et al., 1991; Fields und Song, 1989), was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Deshalb wurden die als Köderproteine verwendeten Deletionsmutanten von ARVCF vor der Durchführung des screens auf eine Autoaktivierung getestet. Ebenso wurde getestet, ob  $\alpha$ -actinin alleine in der Lage ist, eine Autoaktivierung zu zeigen. Zudem wurde, neben der Histidinauxotrophie, ein zweites Reporter-gen, das LacZ-Gen, eingesetzt. Somit wurde ein Auftreten von falsch positiven Ergebnissen weiter eingeschränkt.

Weiterhin wurden die im Hefesystem erhaltenen Daten mit einer biochemischen Methode, dem *Pull-Down Assay*, sowie einer Coimmunopräzipitation mit Proteinextrakt aus MCF7 Zellen überprüft.

Die Anbindung der Cadherine an das Cytoskelett, und somit die Festigung ihrer Position in der Zellmembran, erfolgt über  $\beta$ -catenin oder Plakoglobin, welche sich in diesen Cadherin/Catenin Komplexen gegenseitig ausschließen (Butz und Kemler, 1994; Hinck et al., 1994; Nathke et al., 1994; Ozawa, 1998). Hierbei vermitteln die *armadillo repeats* der Catenine die Interaktion mit den Cadherinen. Allerdings wird keine direkte Bindung von  $\beta$ -catenin oder Plakoglobin mit  $\alpha$ -actinin beobachtet. Vielmehr werden die Komplexe über ein weiteres Protein,  $\alpha$ -catenin, mit  $\alpha$ -actinin und somit dem Cytoskelett verankert (Ozawa, 1998).

Phosphorylierung der Catenine  $\beta$ -catenin oder Plakoglobin an Tyrosinresten korreliert stark mit einer veränderten Modulation der Zelladhäsion. So führt

Tyrosinphosphorylierung von  $\beta$ -catenin zu einem Ablösen des Proteins von  $\alpha$ -catenin und somit zu einer Verringerung epithelialer Differenzierung, einhergehend mit verringerter cadherinvermittelter Adhäsion (Behrens et al., 1993; Matsuyoshi et al., 1992). Von den Mitgliedern der p120(ctn) Subfamilie ist, bis auf NPRAP/ $\Delta$ -catenin, welches direkt an Actin bindet (Kim et al., 2002), bislang keine direkte Interaktion mit dem Cytoskelett bekannt. Allerdings kann p120(ctn) selbst durch eine funktionelle Interaktion mit Rho GTPasen die Cadherin-Cytoskelett Interaktion beeinflussen (Anastasiadis et al., 2000; Noren et al., 2000). Hierbei ist die Inhibierung von RhoA durch p120(ctn) nicht gleichzeitig bei einer Interaktion des Proteins mit Cadherinen möglich. Deshalb wird freiem p120(ctn) im Cytoplasma eine Promotorrolle für Metastasierung zugeschrieben (Anastasiadis et al., 2000).

In dem in dieser Arbeit durchgeführten *Pull-Down* Versuch war wie erwartet keine direkte Bindung von  $\alpha$ -actinin an  $\beta$ -catenin zu sehen (s. Kap. 4.1.7.).

Keine eindeutigen Ergebnisse konnten bei dem Versuch, die Bindungsstelle von ARVCF für  $\alpha$ -actinin einzugrenzen, erzielt werden.

Die Interaktion der beiden Proteine in *Pull-Down* Experimenten konnten bestätigt werden. Allerdings interagierten alle in diesem Versuch verwendeten Deletionsmutanten von ARVCF, so auch der C-Terminus alleine, mit  $\alpha$ -actinin, so dass keine Eingrenzung erfolgen konnte.

Es wurde zusätzlich zu den oben genannten Versuchen eine Kolokalisation von ARVCF und  $\alpha$ -actinin in MCF7 Zellen beobachtet, zudem brachte auch eine Coimmunopräzipitation der beiden Proteine ein positives Ergebnis.

Die Kombination der vier Versuche, *Pull-Down Assay in vitro* sowie Hefe zweihybrid Interaktionstest, Coimmunopräzipitation und subzelluläre Kolokalisation der Proteine ARVCF und  $\alpha$ -actinin *in vivo* ließ auf eine Interaktion zwischen ARVCF und  $\alpha$ -actinin schließen und bestätigten den Befund aus dem Hefe Zweihybrid *screen*.

Ob und inwiefern diese Interaktion eine Auswirkung auf das Ausbilden und/oder die Stabilität der *adherens junction* hat bleibt in weiteren Versuchen zu prüfen.

Da  $\beta$ -catenin/Plakoglobin einerseits und ARVCF/p120(ctn)/NPRAP andererseits an unterschiedliche Stellen der cytoplasmatischen Domäne von Cadherinen binden, wäre ein denkbares Modell die Verstärkung der Verankerung von Cadherinen an das Cytoskelett durch ARVCF im Falle des Ablösens von  $\beta$ -catenin durch Tyrosinphosphorylierung.

p120(ctn) ist aus der Literatur bekannt dafür, beim *clustering* von Cadherinen eine Rolle zu spielen (Anastasiadis und Reynolds, 2000). Zudem hat das Molekül einen Einfluss auf die Motilität von Zellen (Sorkin et al., 2000; Thoreson et al., 2000; Wong et al., 2000), wobei es Ereignisse, welche für die Reorganisation des Cytoskeletts wichtig sind blockiert (Anastasiadis et al., 2000; Thoreson et al., 2000). Hierbei wäre ein Wechselspiel zwischen p120(ctn) und ARVCF als verankernde Komponente, ähnlich wie zwischen  $\beta$ -catenin und Plakoglobin, die auf eine Rezeptor Tyrosinkinaseaktivität gegensätzlich in Bezug auf eine Bindung an das Cytoskelett reagieren, möglich.

## 5.2. ARVCF als potentiell effektormolekül der PKC

In Computervorhersageprogrammen wurden potentielle Phosphorylierungsstellen in ARVCF für PKC, PKA und GSK3 $\beta$  angezeigt. Bei den anschließend durchgeführten *in vitro* Kinaseversuchen erwies sich die PKC in der Lage, ARVCF direkt zu phosphorylieren. Die anderen untersuchten Kinasen zeigten in diesem System keine Wirkung auf ARVCF, wobei Positivkontrollen immer zufrieden stellend waren.

Auch wenn viele Proteine in diesem *in vitro* System phosphoryliert werden, die im zellulären Kontext keine entsprechende Modifikation erfahren, so ergab sich doch ein erster Hinweis auf die prinzipielle Möglichkeit der Modifikation von ARVCF durch die Proteinkinase C.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass TNF- $\alpha$  und EGF, zwei Cytokine, welche in der Literatur als PKC-Aktivatoren beschrieben werden (Barbosa et al., 2003; Javaid et al., 2003; Rosenzweig et al., 2002), die Membranlokalisation von ARVCF reduzieren und eine Bildung von

cytoplasmatischen Aggregaten fördern. Dass dieser Effekt tatsächlich in irgendeiner Weise über PKC gesteuert wird, wurde gezeigt, indem er mit einem spezifischen PKC-Inhibitor, GF109203X, reversiert werden konnte. Zudem konnte derselbe Effekt mit einem Phorbolster, PMA, welcher für eine spezifische Aktivierung der PKC bekannt ist (Acs et al., 1997; Marquardt et al., 1994), erzielt werden.

PKC wird durch eine Reihe von Cytokinen aktiviert, und reguliert eine Vielzahl physiologischer Effekte, welche die Zelladhäsion und Zell-Zell Kommunikation in verschiedenen Zelltypen beeinflussen (Tan und Parker, 2003; Vlahos et al., 2003). Dieser Kinase wird auch eine Rolle bei Prozessen der Regulation cadherinvermittelter, interzellulärer Komplexe zugeschrieben. So tritt zum Beispiel eine erhöhte PKC Aktivität bei einer erhöhten migratorischen Fähigkeit von Kolonkarzinomzellen auf. Gleichzeitig weisen diese Zellen eine geringe E-cadherinexpression auf (Masur et al., 2001). Zudem ist PKC auch in der Lage, die Endocytose und das Recycling von E-cadherin zu beeinflussen (Le et al., 2002).

Andererseits kann eine Aktivierung der PKC auch zu einer verstärkten cadherinvermittelten Adhäsion führen (Cowell und Garrod, 1999; Lewis et al., 1994; van Hengel et al., 1997).

Unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen blieb endogenes Cadherin auch nach Stimulation der Zellen mit Cytokinen oder PMA weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert. Die Architektur der Membranen in den so behandelten Zellen war jedoch nicht mehr so klar umrissen wie in unbehandelten Zellen. Es wurde aber weder endogenes Cadherin noch das im MOM *assay* verwendete MOM-M-cadherin in vesikulären Strukturen entdeckt.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass eine Stimulation der PKC mit den Cytokinen TNF- $\alpha$  und EGF, sowie mit dem Phorbolster PMA, die Membranlokalisierung von ARVCF und dessen Cadherinbindung, wie im MOM recruitment assay demonstriert, abschwächen. Letztendlich ergibt sich daraus eine Anhäufung des *armadillo repeat* Proteins in cytoplasmatischen Aggregaten.

Mutationsanalysen ergaben, dass die Abschwächung der Cadherinbindung, wie auch die generelle Reaktion von ARVCF auf eine Cytokin- oder PMA-Behandlung, auf den N-Terminus des Proteins beschränkt werden kann. Die im FL Protein vorhandene *coiled-coil* Region spielt hierbei keine Rolle, da die natürlich auftretende Splicevariante 5'alt ARVCF, welche diese Region nicht besitzt immer noch eine abgeschwächte Cadherinbindung in Folge einer Stimulation der Zellen zeigte.

Ein direkter Beweis für die Wichtigkeit des N-Terminus konnte dadurch erbracht werden, dass der 5'alt N-Terminus von ARVCF durch den entsprechenden Teil von p120(ctn) ersetzt wurde. Das so entstandene chimäre Protein zeigte, ebenso wie p120(ctn) selbst, keine Translokation und somit auch keine abgeschwächte Cadherinbindung in Folge einer Stimulation der Zellen.

Die Weiterleitung von Signalen innerhalb einer Zelle erfolgt häufig, wie auch bei  $\beta$ -catenin bekannt, über eine schrittweise Phosphorylierung von Proteinen. So muss  $\beta$ -catenin nacheinander an vier Stellen mit Phosphaten beladen werden, um degradiert werden zu können.

Die hier vorgestellten Daten implizieren eine oder mehrere Phosphorylierungsstellen im 5'alt N-Terminus von ARVCF als ausführende Elemente bei der Antwort des Proteins auf eine Stimulation von Zellen mit EGF, TNF- $\alpha$  oder PMA. Zum Zwecke der Überprüfung wurden in dieser Arbeit die neun potentiellen Phosphorylierungsstellen für die PKC innerhalb des N-Terminus von ARVCF einzeln zu Alanin, einer unpolaren Aminosäure, welche nicht durch die Kinase modifiziert werden kann, mutiert. Es entstand dabei keine Mutante, welche nach einer Stimulation der Zellen durch die Cytokine oder PMA noch an der Zellmembran zu sehen war. Alle geprüften Mutanten zeigten, wie auch das Wildtyp-Protein, nach einer Behandlung eine Anhäufung in cytoplasmatischen Aggregaten.

Einzig die Mutante T50A zeigte eine reduzierte Membranfärbung und Cadherinbindung, jedoch keine Aggregatformation, sondern eine gleichförmige Verteilung über das gesamte Cytoplasma.

Die Mutation einer einzelnen Phosphorylierungsstelle resultierte also nicht in einer Inhibierung der ARVCF Translokation. Dies zeigt, dass die Situation komplexer ist und weitere Untersuchungen folgen müssen.

Es wäre eine Translokation des Proteins als direkte oder indirekte Konsequenz einer Aktivierung der PKC, und somit einer Phosphorylierung von ARVCF, denkbar. Alternativ dazu könnte die Regulation eine schrittweise, d.h. hintereinander ablaufende, oder eine kombinierte, d.h. gleichzeitige, Phosphorylierung mehrerer PKC-Stellen voraussetzen.

Um diese Hypothese zu überprüfen könnten Doppel- oder Mehrfachmutanten der potentiellen Phosphorylierungsstellen hergestellt werden. Sollten mehrere Stellen für die Translokation von ARVCF verantwortlich sein, so sollte das Protein, wenn diese gleichzeitig mutiert sind, auch nach einer Behandlung der Zellen mit Cytokinen oder PMA an der Membran lokalisieren.

PKC spielt eine Rolle beim Recycling von Cadherinen (Barbosa et al., 2003; Le et al., 2002; Masur et al., 2001). Dabei werden die Cadherine in Clathrinbedeckten Vesikeln in das Cytoplasma transportiert (Le et al., 2002). Die in dieser Arbeit beobachteten Aggregate von ARVCF nach Cytokin- und PMA-Behandlung ließen die Frage nach der Herkunft dieser Strukturen aufkommen. Sie könnten die eben schon erwähnten Clathrinbedeckten Vesikel, Caveolinbedeckte Vesikel, Golgi-Strukturen oder ARVCF enthaltende Proteasome, welche das Molekül der Ubiquitin abhängigen Degradierung zuführen, sein. Diese Möglichkeiten wurden mit den entsprechenden Markern, Anti-Clathrin Antikörper, Anti-Caveolin Antikörper, Anti-Ubiquitin Antikörper oder Beta-Cop Antikörper, um Golgi Strukturen sichtbar zu machen, getestet. Keiner davon koloalisierte mit den ARVCF Aggregaten (Daten nicht gezeigt).

Zudem enthielten sie keine Komponenten von *Junction* Komplexen, wie  $\beta$ -catenin, p120(ctn) oder Cadherin.

Das könnte zu der Spekulation führen, dass diese Strukturen von der Überexpression des Proteins herrühren, obwohl dies aus unterschiedlichen Gründen unwahrscheinlich ist.

Zum Einen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass p120(ctn), welches durch Cytokine oder PMA in Bezug auf Translokation und Cadherinbindung, auch als überexprimiertes Protein, nicht beeinflusst wird, den Effekt der Translokation zeigt, wenn der N-Terminus des Proteins durch den 5'alt N-Terminus von ARVCF ersetzt wird.

Zum anderen konnte durch die T50A Mutante in PMA behandelten Zellen gezeigt werden, dass die Aggregatbildung über Phosphorylierungsstellen im N-Terminus des Proteins reguliert werden kann.

Zudem war ARVCF in unbehandelten Zellen membrangebunden, und Aggregate dieses Proteins befanden sich nur in TNF- $\alpha$ , EGF- oder PMA-behandelten Zellen.

Der Effekt auf ARVCF nach Behandlung von Zellen mit PMA konnte bereits fünf Minuten nach Gabe des Phorbolesters Gezeigt werden (s. Abb. 19), wohingegen eine Behandlung mit den Cytokinen für zwei bis drei Stunden durchgeführt werden musste, um eine Translokation von ARVCF von der Membran in cytoplasmatische Aggregate sichtbar machen zu können. Weiterhin war der durch PMA erzielte Effekt nicht reversibel wenn der Stimulus weggenommen und die Zellen für weitere 24 Stunden in Zellkulturmedium ohne PMA inkubiert wurden. Dies spricht dafür, dass nicht nur das schon vorhandene, an den Cadherinen gebundene ARVCF abgelöst werden kann, sondern auch neu gebildetes davon betroffen ist.

Arbeiten anderer Arbeitskreise zeigten cytoplasmatische ARVCF Aggregate in unbehandelten Zellen, welche weder für p120(ctn) noch für NPRAP/ $\Delta$ -catenin nachgewiesen werden konnten.

So konnte gezeigt werden, dass Erbin, ein Molekül welches an die PDZ-bindende Domäne von ARVCF (und auch NPRAP/  $\delta$ -catenin) über seine eigene PDZ-Domäne bindet, in solchen Aggregaten in unbehandelten Zellen kolokalisiert (Laura et al., 2002).

Dies steht jedoch in Kontrast zu den in unserem Labor gemachten Beobachtungen, nach welchen ARVCF in unbehandelten Zellen an der Zellmembran lokalisiert (Kaufmann et al., 2000; Waibler, 2002; Waibler et al., 2001) und nur nach Behandlung mit PMA oder Cytokinen in Aggregaten zu finden ist.

Eine Erklärung dafür wäre, dass wir mit Fötalem Kälberserum (FCS) arbeiten, welches nicht die entsprechende Menge an Cytokinen enthält, um ARVCF von der Plasmamembran in Aggregate zu dirigieren. Gewöhnlich wird unser FCS über ein ausbalanciertes Wachstums- und Differenzierungsverhalten an myogenen Zellen selektioniert, was eine moderate Konzentration an Cytokinen im FCS widerspiegelt.

Die in dieser Arbeit gezeigten Versuche lassen den Schluss zu, dass Unterschiede in den *armadillo repeats* und/oder dem C-Terminus von ARVCF und p120(ctn) die Proteine an unterschiedliche Stellen in der Zelle dirigieren.

Weiterhin wird eine intramolekulare Interaktion zwischen dem N-Terminus und dem Rest von ARVCF, was zu einer Aggregatstruktur führt, favorisiert. Während intaktes ARVCF als Folge einer Zellstimulation abgeschwächte Membranbindung zeigte und in Aggregaten zu finden war, war dies trotz der abgeschwächten Cadherinbindung im MOM-recruitment assay bei dem chimären Protein ARVCF/p120(ctn) nicht der Fall.

Zudem konnte eine einzige Substitution von Threonin nach Alanin im N-Terminus von ARVCF (T50A) die Formierung von Aggregaten, nicht jedoch die abgeschwächte Cadherinbindung verhindern.

Diese Tatsache zeigt gleichzeitig, dass Aggregation und abgeschwächte Cadherinbindung klar trennbare Effekte sind.

In dieser Arbeit wurde ein neuer Mechanismus, welcher über physiologische Stimuli die Lokalisation und Cadherinbindung von ARVCF beeinflusst, festgestellt, wobei dies für die verwandten Proteine  $\beta$ -catenin und p120(ctn) nicht der Fall war. Obwohl aus den bisher gewonnenen Daten noch keine spezifische Funktion von ARVCF abgeleitet werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass ARVCF ein Signalmolekül in Cytokininduzierten Signaltransduktionswegen sein könnte, in welchen die Proteinkinase C an einer Stelle eine Rolle spielt. Zudem wird ein funktioneller Unterschied zu p120(ctn) impliziert, da dieses Protein nicht auf eine Cytokinstimulation der Zellen reagiert. Ob und inwiefern dies Zell-Zellkontakte und/oder Aspekte der zellulären Funktion beeinflusst, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels eines Hefe zweihybrid *screens* neue Interaktionspartner von ARVCF, einem cadherinbindenden *armadillo repeat* Protein, gefunden werden. Hierbei wurde aus einer cDNA-Bank differenzierender Myoblasten das Cytoskelettprotein Alpha-actinin als Bindungspartner des *armadillo repeat* Proteins identifiziert. Der Befund aus dem Hefesystem wurde durch Immunfluoreszenzaufnahmen, in welchen gezeigt wurde dass die beiden Proteine kolokalisieren, bestätigt. Auch eine Coimmunopräzipitation bestätigte eine Interaktion der beiden Proteine. Weiterhin konnte eine direkte Interaktion von ARVCF mit  $\alpha$ -actinin in *in vitro Pull-Down assays* gezeigt werden, wobei eine Eingrenzung der Bindungsregion von ARVCF für  $\alpha$ -actinin jedoch nicht möglich war.

Als nächstes wurde ARVCF im Rahmen dieser Arbeit mittels Computeranalysen auf potentielle Phosphorylierungsstellen hin untersucht. In *in vitro* Kinase *assays* wurde eine Phosphorylierung des Proteins durch die Proteinkinase C (PKC) festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die subzelluläre Lokalisation von ARVCF nach Behandlung der Zellen mit den PKC stimulierenden Cytokinen TNF- $\alpha$  und EGF, sowie mit dem Phorbolster PMA ändert. Hierbei wurde ein Ablösen des Proteins von der Plasmamembran und eine Lokalisation in cytoplasmatischen Aggregaten beobachtet. Dieser Effekt erwies sich als Zelltypunabhängig und Spezies übergreifend. Es konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus der Splicevariante 5'alt ARVCF notwendig und ausreichend für den beobachteten Effekt ist.

p120(ctn), das dem ARVCF am nächsten verwandte Protein, zeigte bei einer Behandlung von Zellen mit PMA oder den oben genannten Cytokinen keinen Effekt in Bezug auf Lokalisationsänderung. Ebenso wenig konnte eine Änderung der Lokalisation nach Behandlung für die Proteine  $\beta$ -catenin sowie E-cadherin beobachtet werden.

Der erhaltene Effekt nach Stimulation der Zellen war somit spezifisch für ARVCF und konnte nicht für ein anderes hier untersuchtes Catenin oder Cadherin gezeigt werden.

Eine stark abgeschwächte Cadherinbindung von ARVCF nach Inkubation der Zellen mit den Cytokinen oder PMA konnte im MOM-recruitment *assay* beobachtet werden. Auch dieser Effekt erwies sich als ARVCF spezifisch und konnte nicht mit p120(ctn) gezeigt werden.

Weiterhin wurden chimäre Moleküle mit dem N-Terminus von ARVCF und dem Rest von p120(ctn) und *vice versa* hergestellt. Hierbei konnte die abgeschwächte Cadherinbindung im MOM-recruitment *assay* durch den N-Terminus von ARVCF auf p120(ctn) übertragen werden. Die chimären Moleküle ARVCF/p120(ctn) fanden sich nach Behandlung von Zellen nicht mehr in Aggregaten wieder, waren aber über das Cytoplasma verteilt.

Es konnte kein Effekt auf Stimulation der Zellen mit dem chimären Protein p120(ctn)/ARVCF gezeigt werden.

Durch diese Art von „*gain of function*“ Experiment konnte noch einmal die Wichtigkeit und Spezifität des N-Terminus von ARVCF in Bezug auf die Reaktion auf PMA- oder Cytokinstimulation gezeigt werden.

Auch die Punktmutante T50A, bei welcher eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKC von Threonin nach Alanin mutiert war, löste sich nach Stimulation der Zellen von den Cadherinen, wie im MOM-recruitment *assay* gezeigt werden konnte. Allerdings lokalisierte diese Mutante nach Behandlung der Zellen nicht in Aggregaten, sondern, wie zuvor schon das chimäre Protein ARVCF/p120(ctn), über das Cytoplasma verteilt.

So konnte gezeigt werden, dass es sich bei der abgeschwächten Cadherinbindung und bei der Aggregatbildung um zwei klar voneinander trennbare Eigenschaften des Moleküls handelt.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

### Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

### Sonstige Symbole und Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung(en)
Ac	Acetat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BP	Birkenprofilin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CBD	Catenin Bindedomäne
CC	<i>coiled coil</i>
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CPD	cytoplasmatische Domäne
dd	doppelt destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EC	Extrazelluläre Subdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al	und andere
evtl.	eventuell
F	Farad
F	Phenylalanin
Fa.	Firma
G	Guanosin
G	Glycin

g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
inkl.	Inklusive
JMD	Juxtamembrandomäne
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m	milli-
max.	maximal
μ	mikro-
min	Minuten
N	normal
n	nano-
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
p	pico-
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde(n)
T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
TM	Transmembrandomäne
U	Einheit(en)
u.U.	unter Umständen
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
ü/N	über Nacht
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 8. Literaturverzeichnis

- Acs, P., K. Bogi, P.S. Lorenzo, A.M. Marquez, T. Biro, Z. Szallasi, and P.M. Blumberg. 1997. The catalytic domain of protein kinase C chimeras modulates the affinity and targeting of phorbol ester-induced translocation. *J Biol Chem.* 272:22148-53.
- Anastasiadis, P.Z., S.Y. Moon, M.A. Thoreson, D.J. Mariner, H.C. Crawford, Y. Zheng, and A.B. Reynolds. 2000. Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol.* 2:637-44.
- Anastasiadis, P.Z., and A.B. Reynolds. 2000. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 8):1319-34.
- Bachmann, B.J. 1983. Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 7. *Microbiol Rev.* 47:180-230.
- Barbosa, L.A., L. Goto-Silva, P.A. Redondo, S. Oliveira, G. Montesano, W. De Souza, and J.A. Morgado-Diaz. 2003. TPA-induced signal transduction: a link between PKC and EGFR signaling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells. *Cell Tissue Res.* 312:319-31.
- Bartel, P., C.T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.* 14:920-4.
- Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M.M. Mareel, and W. Birchmeier. 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol.* 120:757-66.
- Bonne, S., J. van Hengel, F. Nollet, P. Kools, and F. van Roy. 1999. Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 14):2265-76.
- Braga, V.M., L.M. Machesky, A. Hall, and N.A. Hotchin. 1997. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 137:1421-31.
- Butz, S., and R. Kemler. 1994. Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett.* 355:195-200.
- Chien, C.T., P.L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:9578-82.
- Cowell, H.E., and D.R. Garrod. 1999. Activation of protein kinase C modulates cell-cell and cell-substratum adhesion of a human colorectal carcinoma cell line and restores 'normal' epithelial morphology. *Int J Cancer.* 80:455-64.
- Cowin, P., and B. Burke. 1996. Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 8:56-65.
- Cozzolino M, S.V., Spinardi L, Campioni N, Fiorentini C, Salvati E, Alema S, Salvatore AM. 2003. p120 Catenin Is Required for Growth Factor-dependent Cell Motility and Scattering in Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell.* 14:1964-77.

- Daniel, J.M., and A.B. Reynolds. 1995. The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol.* 15:4819-24.
- Daniel, J.M., and A.B. Reynolds. 1999. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol.* 19:3614-23.
- Desmaze, C., M. Prieur, F. Amblard, M. Aikem, F. LeDeist, S. Demczuk, J. Zucman, B. Plougastel, O. Delattre, M.F. Croquette, and et al. 1993. Physical mapping by FISH of the DiGeorge critical region (DGCR): involvement of the region in familial cases. *Am J Hum Genet.* 53:1239-49.
- Fanning, A.S., and J.M. Anderson. 1998. PDZ domains and the formation of protein networks at the plasma membrane. *Curr Top Microbiol Immunol.* 228:209-33.
- Fields, S., and O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340:245-6.
- Fujii, K. 1996. Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptor results in loss of epithelial phenotype and impaired RGD-sensitive integrin function in HSC-1 cells. *J Invest Dermatol.* 107:195-202.
- Hatzfeld, M., K.J. Green, and H. Sauter. 2003. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *J Cell Sci.* 116:1219-33.
- Hatzfeld, M., G.I. Kristjansson, U. Plessmann, and K. Weber. 1994. Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 8):2259-70.
- Hatzfeld, M., and C. Nachtsheim. 1996. Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *J Cell Sci.* 109 ( Pt 11):2767-78.
- Hazan, R.B., and L. Norton. 1998. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 273:9078-84.
- Heid, H.W., A. Schmidt, R. Zimbelmann, S. Schafer, S. Winter-Simanowski, S. Stumpp, M. Keith, U. Figge, M. Schnolzer, and W.W. Franke. 1994. Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation.* 58:113-31.
- Hinck, L., I.S. Nathke, J. Papkoff, and W.J. Nelson. 1994. Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J Cell Biol.* 125:1327-40.
- Honda, K., T. Yamada, R. Endo, Y. Ino, M. Gotoh, H. Tsuda, Y. Yamada, H. Chiba, and S. Hirohashi. 1998. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol.* 140:1383-93.
- Hoschuetzky, H., H. Aberle, and R. Kemler. 1994. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 127:1375-80.
- Huber, A.H., W.J. Nelson, and W.I. Weis. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell.* 90:871-82.

- Huber, O., R. Korn, J. McLaughlin, M. Ohsugi, B.G. Herrmann, and R. Kemler. 1996. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.* 59:3-10.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 153:163-8.
- Javid, K., A. Rahman, K.N. Anwar, R.S. Frey, R.D. Minshall, and A.B. Malik. 2003. Tumor necrosis factor-alpha induces early-onset endothelial adhesivity by protein kinase C-zeta-dependent activation of intercellular adhesion molecule-1. *Circ Res.* 92:1089-97.
- Jawhari, A.U., M.J. Farthing, and M. Pignatelli. 1999. The E-cadherin/epidermal growth factor receptor interaction: a hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation. *J Pathol.* 187:155-7.
- Kaufmann, U., C. Zuppinger, Z. Waibler, M. Rudiger, C. Urbich, B. Martin, B.M. Jockusch, H. Eppenberger, and A. Starzinski-Powitz. 2000. The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 22):4121-35.
- Keirsebilck, A., S. Bonne, K. Staes, J. van Hengel, F. Nollet, A. Reynolds, and F. van Roy. 1998. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics.* 50:129-46.
- Kelly, D., R. Goldberg, D. Wilson, E. Lindsay, A. Carey, J. Goodship, J. Burn, I. Cross, R.J. Shprintzen, and P.J. Scambler. 1993. Confirmation that the velo-cardio-facial syndrome is associated with haplo-insufficiency of genes at chromosome 22q11. *Am J Med Genet.* 45:308-12.
- Kim, K., A. Sirota, Y.H. Chen Yh, S.B. Jones, R. Dudek, G.W. Lanford, C. Thakore, and Q. Lu. 2002. Dendrite-like process formation and cytoskeletal remodeling regulated by delta-catenin expression. *Exp Cell Res.* 275:171-84.
- Kowalczyk, A.P., M. Hatzfeld, E.A. Bornslaeger, D.S. Kopp, J.E. Borgwardt, C.M. Corcoran, A. Settler, and K.J. Green. 1999. The head domain of plakophilin-1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *J Biol Chem.* 274:18145-8.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Laura, R.P., A.S. Witt, H.A. Held, R. Gerstner, K. Deshayes, M.F. Koehler, K.S. Kosik, S.S. Sidhu, and L.A. Lasky. 2002. The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of delta-catenin and ARVCF. *J Biol Chem.* 277:12906-14.
- Le, T.L., S.R. Joseph, A.S. Yap, and J.L. Stow. 2002. Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E-cadherin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C489-99.
- Lewis, J.E., P.J. Jensen, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1994. E-cadherin mediates adherens junction organization through protein kinase C. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 12):3615-21.
- Lu, Q., M. Paredes, M. Medina, J. Zhou, R. Cavallo, M. Peifer, L. Orecchio, and K.S. Kosik. 1999. delta-catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *J Cell Biol.* 144:519-32.

- Mariner, D.J., J. Wang, and A.B. Reynolds. 2000. ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in E-cadherin complexes. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 8):1481-90.
- Marquardt, B., D. Frith, and S. Stabel. 1994. Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene.* 9:3213-8.
- Masur, K., K. Lang, B. Niggemann, K.S. Zanker, and F. Entschladen. 2001. High PKC alpha and low E-cadherin expression contribute to high migratory activity of colon carcinoma cells. *Mol Biol Cell.* 12:1973-82.
- Matsuyoshi, N., M. Hamaguchi, S. Taniguchi, A. Nagafuchi, S. Tsukita, and M. Takeichi. 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol.* 118:703-14.
- Miravet, S., J. Piedra, J. Castano, I. Raurell, C. Franci, M. Dunach, and A. Garcia de Herreros. 2003. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. *Mol Cell Biol.* 23:7391-402.
- Morrow, B., R. Goldberg, C. Carlson, R. Das Gupta, H. Sirotkin, J. Collins, I. Dunham, H. O'Donnell, P. Scambler, R. Shprintzen, and et al. 1995. Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet.* 56:1391-403.
- Nathke, I.S., L. Hinck, J.R. Swedlow, J. Papkoff, and W.J. Nelson. 1994. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 125:1341-52.
- Noren, N.K., B.P. Liu, K. Burridge, and B. Kreft. 2000. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol.* 150:567-80.
- Nose, A., K. Tsuji, and M. Takeichi. 1990. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell.* 61:147-55.
- Ozawa, M. 1998. Identification of the region of alpha-catenin that plays an essential role in cadherin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem.* 273:29524-9.
- Ozawa, M., and R. Kemler. 1990. Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J Cell Biol.* 111:1645-50.
- Paffenholz, R., and W.W. Franke. 1997. Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation.* 61:293-304.
- Paffenholz, R., C. Kuhn, C. Grund, S. Stehr, and W.W. Franke. 1999. The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Exp Cell Res.* 250:452-64.
- Pece, S., and J.S. Gutkind. 2000. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem.* 275:41227-33.
- Peifer, M., D. Sweeton, M. Casey, and E. Wieschaus. 1994. wingless signal and Zeste-white 3 kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of Armadillo. *Development.* 120:369-80.

- Peifer, M., and E. Wieschaus. 1990. The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell*. 63:1167-76.
- Pelletier, O., E. Pokidysheva, L.S. Hirst, N. Bouxsein, Y. Li, and C.R. Safinya. 2003. Structure of actin cross-linked with alpha-actinin: a network of bundles. *Phys Rev Lett*. 91:148102.
- Reynolds, A.B., J.M. Daniel, Y.Y. Mo, J. Wu, and Z. Zhang. 1996. The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual morphological phenotype in NIH3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res*. 225:328-37.
- Reynolds, A.B., L. Herbert, J.L. Cleveland, S.T. Berg, and J.R. Gaut. 1992. p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene*. 7:2439-45.
- Ringwald, M., R. Schuh, D. Vestweber, H. Eistetter, F. Lottspeich, J. Engel, R. Dolz, F. Jahnig, J. Epplen, S. Mayer, and et al. 1987. The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion. *Embo J*. 6:3647-53.
- Rosenzweig, T., L. Braiman, A. Bak, A. Alt, T. Kuroki, and S.R. Sampson. 2002. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha on protein kinase C isoforms alpha and delta mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes*. 51:1921-30.
- Sacco, P.A., T.M. McGranahan, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 1995. Identification of plakoglobin domains required for association with N-cadherin and alpha-catenin. *J Biol Chem*. 270:20201-6.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-4.
- Schiestl, R.H., and R.D. Gietz. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*. 16:339-46.
- Schmidt, A., L. Langbein, S. Pratzel, M. Rode, H.R. Rackwitz, and W.W. Franke. 1999. Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation*. 64:291-306.
- Schmidt, A., L. Langbein, M. Rode, S. Pratzel, R. Zimbelmann, and W.W. Franke. 1997. Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res*. 290:481-99.
- Shibamoto, S., M. Hayakawa, K. Takeuchi, T. Hori, K. Miyazawa, N. Kitamura, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, N. Matsuyoshi, M. Takeichi, and et al. 1995. Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J Cell Biol*. 128:949-57.
- Shibata, T., A. Ochiai, Y. Kanai, S. Akimoto, M. Gotoh, N. Yasui, R. Machinami, and S. Hirohashi. 1996. Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene*. 13:883-9.
- Sirotkin, H., H. O'Donnell, R. DasGupta, S. Halford, B. St Jore, A. Puech, S. Parimoo, B. Morrow, A. Skoultchi, S.M. Weissman, P. Scambler, and

- R. Kucherlapati. 1997. Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics*. 41:75-83.
- Smith, E.A., and E. Fuchs. 1998. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol.* 141:1229-41.
- Sorkin, B.C., M.Y. Wang, J.M. Dobeck, K.L. Alberg, and Z. Skobe. 2000. The cadherin-catenin complex is expressed alternately with the adenomatous polyposis coli protein during rat incisor amelogenesis. *J Histochem Cytochem.* 48:397-406.
- Staddon, J.M., C. Smales, C. Schulze, F.S. Esch, and L.L. Rubin. 1995. p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol.* 130:369-81.
- Steinberg, M.S., and P.M. McNutt. 1999. Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. *Curr Opin Cell Biol.* 11:554-60.
- Studier, F.W., and B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189:113-30.
- Takahashi, K., and K. Suzuki. 1996. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp Cell Res.* 226:214-22.
- Takeda, H., Y. Shimoyama, A. Nagafuchi, and S. Hirohashi. 1999. E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface in vivo. *Nat Struct Biol.* 6:310-2.
- Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 251:1451-5.
- Tamura, K., W.S. Shan, W.A. Hendrickson, D.R. Colman, and L. Shapiro. 1998. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron.* 20:1153-63.
- Tan, S.L., and P.J. Parker. 2003. Emerging and diverse roles of PKC in immune cell signaling. *Biochem J. Pt.*
- Thoreson, M.A., P.Z. Anastasiadis, J.M. Daniel, R.C. Ireton, M.J. Wheelock, K.R. Johnson, D.K. Hummingbird, and A.B. Reynolds. 2000. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol.* 148:189-202.
- van Hengel, J., L. Gohon, E. Bruyneel, S. Vermeulen, M. Cornelissen, M. Mareel, and F. von Roy. 1997. Protein kinase C activation upregulates intercellular adhesion of alpha-catenin-negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes. *J Cell Biol.* 137:1103-16.
- Vlahos, C.J., S.A. McDowell, and A. Clerk. 2003. Kinases as therapeutic targets for heart failure. *Nat Rev Drug Discov.* 2:99-113.
- Waibler, Z. 2002. Molekulare Analysen des armadillo repeat proteins mARVCF. Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Waibler, Z., A. Schafer, and A. Starzinski-Powitz. 2001. mARVCF cellular localisation and binding to cadherins is influenced by the cellular context but not by alternative splicing. *J Cell Sci.* 114:3873-84.
- Wieschaus, E., and R. Riggelman. 1987. Autonomous requirements for the segment polarity gene armadillo during Drosophila embryogenesis. *Cell.* 49:177-84.

- Wong, E.Y., L. Morgan, C. Smales, P. Lang, S.E. Gubby, and J.M. Staddon. 2000. Vascular endothelial growth factor stimulates dephosphorylation of the catenins p120 and p100 in endothelial cells. *Biochem J.* 346 Pt 1:209-16.
- Zhou, J., U. Liyanage, M. Medina, C. Ho, A.D. Simmons, M. Lovett, and K.S. Kosik. 1997. Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport.* 8:2085-90.

## **Lebenslauf**

## **Andreas Pfaff**

Diplom Biologe  
Bernardstrasse 56  
63067 Offenbach

## **Persönliche Daten**

Geburtsdatum: 25.07.1967  
Geburtsort: Schwenningen am  
Neckar  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## **Schule**

1974-1978 Hirschbergschule, VS-Schwenningen  
1978-1985 Gymnasium am Hoptbühl, VS-Villingen  
1985-1988 Albert Schweitzer Schule, VS-Villingen  
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

## **Zivildienst**

1988-1990 Arbeiterwohlfahrt, VS-Villingen

## **Studium**

ab Oktober 1990 Studium der Chemie, Universität Konstanz  
ab Oktober 1991 Studium der Biologie, Johann Wolfgang  
Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik  
1. Nebenfach: Botanik  
2. Nebenfach: Humananatomie  
ab Mai 1998 Diplomarbeit, Johann Wolfgang  
Goethe-Universität, Frankfurt am Main,  
Institut der Anthropologie und Humangenetik,  
AK Starzinski-Powitz.  
Titel der Arbeit:  
Funktionelle Untersuchungen des  $\beta$ -catenins  
in differenzierten Skelettmuskelzellen  
ab Mai 1999 Promotion, Johann Wolfgang  
Goethe-Universität, Frankfurt am Main,  
Institut der Anthropologie und Humangenetik,  
AK Starzinski-Powitz.  
Titel der Arbeit:  
Funktionelle Analysen des *armadillo repeat*  
Proteins ARVCF