

**Charakterisierung der Interaktion von p120ctn mit den
Rho-GTPasen RhoA und RhoC**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Will, Laura Christine
aus Limburg an der Lahn

Gießen 2018

Aus der Professur für Signaltransduktion zellulärer Motilität, Klinik für Innere Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Leitung von Frau Prof. Dr. Klaudia Giehl.

Gutachter: Frau Prof. Dr. Giehl

Gutachter: Frau Prof. Dr. Lips

Tag der Disputation: 21.12.2018

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Rho-GTPasen.....	1
1.1.1	Struktur der Rho-GPTasen	2
1.1.2	Funktion der Rho-GTPasen.....	3
1.1.3	Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen	5
1.1.4	RhoA und RhoC	6
1.2	Zell-Zell-Adhäsion	8
1.3	Humanes p120 Catenin (p120ctn)	10
1.3.1	Struktur von p120ctn.....	11
1.3.2	Funktion von p120ctn.....	14
1.3.3	Expression und Funktion von p120ctn in Tumoren	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material	20
2.1	Chemikalien.....	20
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.3	Enzyme und molekularbiologische Kits	22
2.4	Marker	23
2.5	Medien und Standardlösungen	23
2.5.1	Bakterienkulturmedium.....	23
2.5.2	Zellkulturmedium (Wachstumsmedium)	24
2.5.3	Standardlösungen	24
2.6	Prokaryotische und eukaryotische Zellen.....	25
2.6.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme.....	25
2.6.2	Eukaryotische Zelllinien.....	25
2.7	Antikörper.....	26
2.7.1	Primäre Antikörper.....	26

2.7.2	Sekundäre Antikörper	28
2.8	Geräte.....	30
2.9	Software.....	31
3	Methoden.....	32
3.1	Proteinbiochemische Methoden.....	32
3.1.1	Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	32
3.1.2	Expression und Aufreinigung von GST-Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen	32
3.1.3	Herstellung von Zelllysaten	34
3.1.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
3.1.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.1.6	Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamid-Gelen.....	37
3.1.7	Immunblotting von Proteinen (Western Blot).....	38
3.1.8	Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern	39
3.1.9	Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran	41
3.1.10	Co-Immunpräzipitation	41
3.2	Zellbiologische Methoden	51
3.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	51
3.2.2	Passagieren von Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung	51
3.2.3	Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Charakterisierung von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen.....	53
4.1.1	Nachweis der Expression von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	53
4.1.2	Nachweis der Expression von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen im Immunblotverfahren	55
4.2	Interaktion von GST-p120ctn mit Rho-Fusionsproteinen	56

4.2.1	Expression und Anreicherung von GST-Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	57
4.2.2	Co-Immunpräzipitation von EGFP-RhoC mit GST-p120 Cateninen mit Hilfe des anti-GST- μ MACS-Systems.....	58
4.2.3	Interaktionsstudien von GST-p120 Cateninen mit EGFP-Rho-Fusionsproteinen unter Verwendung von Glutathion-Sepharose- <i>Beads</i>	62
4.2.3.1	Immobilisierung von GST-p120ctn(1-234) durch Bindung an Glutathion-Sepharose- <i>Beads</i> und Inkubation mit EGFP-RhoC.....	62
4.2.3.2	Eingrenzung der Bindungsdomäne von RhoC an p120ctn durch Nachweis der Interaktion von EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(101-234).....	65
4.2.3.3	Veränderungen der Versuchsbedingungen	67
4.2.4	Co-Immunpräzipitation von GST-p120 Cateninen und EGFP-Rho-Fusionsproteinen	77
5	Diskussion	89
5.1	Nachweis der Interaktion von p120ctn mit RhoA und RhoC mit Hilfe von anti-GST- μ MACS- <i>Beads</i> und Glutathion-Sepharose- <i>Beads</i>	90
5.1.1	Optimierung der Versuchs- und Inkubationsbedingungen mit Glutathion-Sepharose- <i>Beads</i>	92
5.1.2	Identifikation von p120ctn als Interaktionspartner von RhoA mit Glutathion-Sepharose- <i>Beads</i>	92
5.1.3	Fazit.....	93
5.2	Nachweis der Interaktion von p120ctn und Rho-GTPasen mit Protein G-Agarose und Antikörpern.....	93
5.3	Nachweis der Interaktion von p120ctn und Rho-GTPasen mit dem GST- μ MACS-System mit Hilfe von Protein A μ MACS- <i>Beads</i> und Eingrenzung der Bindungsdomäne auf p120ctn.....	94
5.4	Ausblick.....	95
6	Zusammenfassung.....	97
7	Abstract	98
8	Abkürzungsverzeichnis	100

9	Anhang: cDNA und Aminosäuresequenzen von p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234), sowie Aminosäuresequenz von p120ctn(1A)	103
10	Literaturverzeichnis.....	106
11	Ehrenwörtliche Erklärung	115
12	Danksagung.....	116

1 Einleitung

1.1 Rho-GTPasen

Rho-GTPasen (*ras homologous proteins*) gehören zur Ras-Superfamilie und zur Gruppe der monomeren GTPasen mit einem Molekulargewicht von 20-40 kDa (Bishop und Hall, 2000). Die Familie der Rho-GTPasen wird in acht Subgruppen unterteilt und umfasst 22 Mitglieder. Subfamilie: (1) Rho, mit den Mitgliedern RhoA, RhoB und RhoC; (2) Rac, mit Rac1, Rac2, Rac3 und RhoG; (3) Cdc42, mit Cdc42, TC10, TCL, Chp und Wrch-1; (4) RhoD, mit RhoD und Rif; (5) Rnd, mit Rnd1, Rnd2 und Rnd3/RhoE; (6) RhoH/TTF; (7) RhoBTB, mit RhoBTB1 und RhoBTB2; und die (8) Miro-Subfamilie, mit den Mitgliedern Miro-1 und Miro-2 (Wennerberg und Der, 2004; Sorokina und Chernoff, 2005). Innerhalb der Familie der Rho-GTPasen weisen die Proteine Aminosäuresequenzübereinstimmungen von 40-95 % (Wennerberg und Der, 2004) und Übereinstimmungen zu den Ras-Proteinen von ca. 30 % auf (Takai *et al.*, 2001).

Rho-GTPasen können als molekulare Schalter agieren, indem sie zwischen einem aktivem, GTP (Guanosintriphosphat)-gebundenem und einem inaktivem, GDP (Guanosindiphosphat)-gebundenem Zustand wechseln, wobei sie die Guaninnukleotide binden und GTP hydrolysieren können (Ridley und Hall, 1992). In der aktiven, GTP-gebunden Form können Rho-GTPasen die Signalübertragung von extrazellulären Signalen zu intrazellulären Effektorproteinen vermitteln, wodurch sie an der Regulation der Zytoskelettorganisation, Gentranskription, Zellpolarität, Zellzyklusprogression und Zellmigration beteiligt sind (Bishop und Hall, 2000; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005; Heasman und Ridley, 2008).

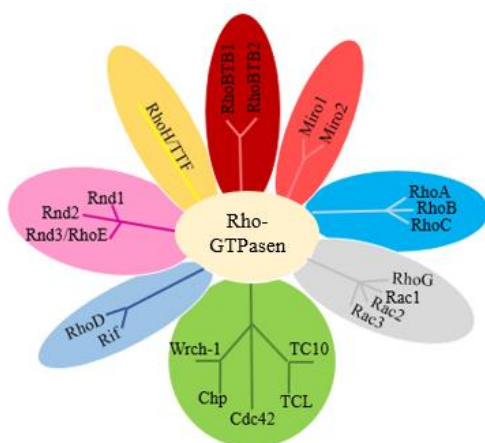


Abbildung 1: Rho-GTPasen der Rho-Familie. Es gibt 22 Rho-GTPasen Familienmitglieder, die in acht Subgruppen unterteilt werden können, wobei die Einteilung in Subgruppen auf der Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz basiert und hier jede Subgruppe in einer anderen Farbe dargestellt wurde: Rho (dunkelblau) (RhoA, B, C); Rac (grau) (Rac 1-3, RhoG); Cdc42 (grün) (Cdc42, TC10, TCL, Chp, Wrch-1); RhoD (hellblau) (RhoD, Rif); Rnd (rosa) (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE); RhoH/TTF (gelb); RhoBTB (rot) (RhoBTB1, RhoBTB2) und Miro (orange) (Miro-1 und Miro-2) (Abbildung verändert nach Sorokina und Chernoff, 2005).

1.1.1 Struktur der Rho-GTPasen

Die Struktur der Rho-GTPasen wurde mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen aufgeklärt (Wei *et al.*, 1997; Worthylake *et al.*, 2000; Fiegen *et al.*, 2002; Dias und Cerione, 2007; Jobichen *et al.*, 2012). Eine Gemeinsamkeit der Rho-GTPasen ist eine katalytische Domäne, beschrieben als G-Domäne, die ein Molekulargewicht von 20 kDa aufweist (Paduch *et al.*, 2001; Dias und Cerione, 2007).

Die Tertiärstruktur der Rho-GTPasen wird in Abbildung 2 anhand eines dreidimensionalen Strukturmodelles der aktiven Mutante RhoA (V14) im Komplex mit GTP γ S und einem Magnesiumion beispielhaft gezeigt. Die Grundstruktur besteht aus sechs β -Faltblattstrukturen (B1-B6), die den Kern des Moleküls bilden. In RhoA und RhoC ist dieser Kern von fünf α -Helices (A1, A3, A3', A4 und A5) und drei 3_{10} -Helices (H1-H3) umgeben. Die fünf α -Helices und die sechs β -Faltblattstrukturen bezeichnet man zusammen mit fünf Polypeptidschleifen als G-Domäne, die die katalytische Funktion darstellt (Ihara *et al.*, 1998).

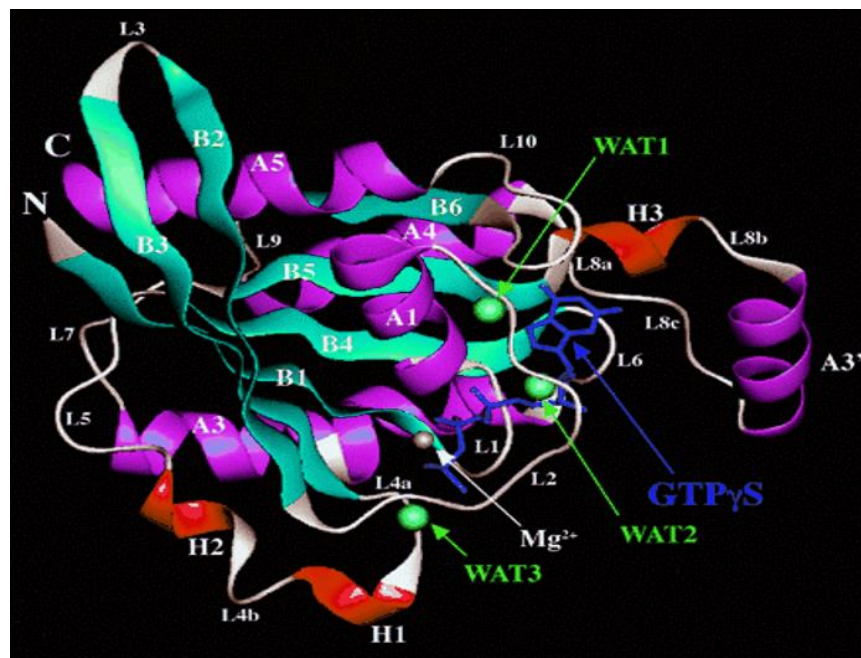


Abbildung 2: Darstellung der Tertiärstruktur von RhoA (V14)-GTP γ S. Die Abbildung zeigt die aktive Mutante RhoA (V14) im Komplex mit GTP γ S (blau) und Mg $^{2+}$ (grauer Ball) als Strukturmodell. Der Kern besteht aus sechs β -Faltblattstrukturen (B1-B6; türkis), umgeben von fünf α -Helices (A1, A3, A3', A4 und A5; pink) und drei 3_{10} -Helices (H1-H3; rot). Außerdem sind drei Wassermoleküle abgebildet (WAT1-3; grüne Bälle). Der N- und der C-Terminus sind gekennzeichnet (Abbildung verändert nach Ihara *et al.*, 1998).

Neben der G-Domäne gibt es noch weitere funktionelle Abschnitte in Rho-GTPasen, namentlich die *switch* I- und *switch* II-Region, sowie eine Phosphat-Bindungsdomäne (*P-loop*). Die *switch* Regionen sind in ihrer Konformität flexibel und können durch die Interaktion von GDP oder GTP mit der G-Domäne der Rho-GTPasen in ihrer Form verändert werden. In der *switch* I-Region wird ein Mg^{2+} -Ion über einen essentiellen Threonin-Rest gebunden, welches für die GTP-Bindung und GTP-Hydrolyse wichtig ist. Außerdem kann die *switch* I-Region mit Effektoren und GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs; *GTPase activating proteins*) interagieren (Sprang und Coleman, 1998; Shimizu *et al.*, 2000). Die *switch* II-Region ist an der Bindung des γ -Phosphats von GTP beteiligt und ein Teil der G-Domäne (Ihara *et al.*, 1998; Sprang und Coleman, 1998). Die Phosphat-Bindungsdomäne (*P-loop*) ist an der Bindung der α - und β -Phosphatgruppen von GTP und GDP beteiligt. Sie beinhaltet ebenfalls einen Threonin-Rest, der die Bindung eines Mg^{2+} -Ions koordiniert (Dias und Cerione, 2007).

Im Vergleich zu den Ras-Proteinen besitzen die Rho-GTPasen eine zusätzliche α -Helix (A3'), die als Insertregion (AS 124-136) bezeichnet wird und an der Bindung von Rho-Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (RhoGDIs; *Rho GDP dissociation inhibitors*) beteiligt ist (Ridley, 2000). Außerdem haben Rho-GTPasen eine Effektorregion (AS 31-42), die für die Interaktion mit GAPs und Effektorproteinen notwendig ist (Ridley, 2000). Mg^{2+} -Ionen stellen einen wichtigen Kofaktor bei der Hydrolyse von GTP und Nukleotidbindungen dar, wobei sie für den Vorgang der Nukleotidbindung selbst nicht essentiell sind, sondern als Regulator der Kinetik des Nukleotidaustausches und als Stabilisator für das gebundene Nukleotid von Bedeutung sind (Zhang *et al.*, 2000).

1.1.2 Funktion der Rho-GTPasen

Rho-GTPasen regulieren die Dynamik des Zellzytoskeletts und übernehmen zahlreiche weitere Schlüsselfunktionen in der Zelle (Sadok und Marshall, 2014). Dabei werden Rho-GTPasen u. a. durch p120 Catenin (p120ctn) in ihrer Aktivität beeinflusst (Anastasiadis, 2007). Die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 nehmen Einfluss auf die Interaktion von p120ctn mit E-Cadherin, indem sie die Ausbildung eines *dendritic phenotype* inhibieren und somit Einfluss auf die Zellmigration ausüben, siehe Kapitel 1.3.2. (Reynolds *et al.*, 1996; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001).

Der Aufbau und die Organisation des Aktinzytoskeletts werden von Rho-GTPasen gemeinsam mit Wachstumsfaktoren reguliert (Ridley *et al.*, 1992; Ridley und Hall, 1992; Lawson und Ridley, 2018). In fibroblastischen Zellen konnte experimentell gezeigt werden, dass RhoA durch die Aktivierung durch Lysophosphatidsäure (LPA) zur Ausbildung von Aktin-Myosin-Filamenten und Rac durch die Aktivierung durch *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder Insulin zur Ausbildung von Lamellopodien, Membranauffaltungen und Ausbildung von Aktinfilamenten in der Peripherie führt (Ridley und Hall, 1992). Cdc42 führt durch die Stimulation u. a. durch Bradykinin zur Ausbildung von Filopodien (Nobes und Hall, 1995; Kozma *et al.*, 1995). In der Arbeitsgruppe von K. Giehl konnte gezeigt werden, dass die LPA-induzierte Tumorzellmigration von Pankreaskarzinomzellen von der Aktivierung der GTPasen Ras, Rac und RhoA und dem $G_{i/o}$ -ERK Signaltransduktionsweg kontrolliert wird (Stähle *et al.*, 2003).

Rho-GTPasen übernehmen außerdem regulatorische Funktionen bei der Zelladhäsion, Zellpolarität und Zellmigration, der Dynamik von Mikrotubuli, sowie dem Vesikeltransport und verschiedenen enzymatischen Vorgängen (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Jaffe und Hall, 2005). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Rac1, Cdc42 und RhoA an *adherens junctions* nachgewiesen werden konnten und durch ihren Einfluss auf die Struktur der *adherens junctions* die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts kontrollieren (Braga, 2000; Yamada und Nelson, 2007; Deplazes *et al.*, 2009; Samarin und Nusrat, 2009; Menke und Giehl, 2012).

Des Weiteren sind Rho-GTPasen in die Steuerung von endozytotischen und exozytotischen Prozessen involviert (Croisé *et al.*, 2014), wie z. B. in verschiedenen Formen der Endozytose (Lamaze *et al.*, 1996; Lamaze *et al.*, 2001), Pinozytose (Sabharanjak *et al.*, 2002), Makropinozytose (Ridley *et al.*, 1992) und Phagozytose (Groves *et al.*, 2008).

Auf die Funktion der Blutplättchen, sog. Thrombozyten, und somit die Blutgerinnung in Säugetieren nehmen die Rho-GTPasen ebenfalls erheblichen Einfluss. So ist z. B. RhoC an der Angiogenese beteiligt, indem es die Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) reguliert (Wang *et al.*, 2008; Aslan und McCarty, 2013; Goggs *et al.*, 2015).

1.1.3 Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen

Rho-GTPasen wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenem und einem inaktiven, GDP-gebundenem Zustand (Jaffe und Hall, 2005). Der Wechsel zwischen diesen beiden Zuständen wird durch GTPase-austauschende Proteine (GEFs; *guanine nucleotide exchange factors*) und GTPase-aktivierende Proteinen (GAPs; *GTPase activating proteins*) beeinflusst, schematisch dargestellt in Abbildung 3. GEFs katalysieren die Aktivierung der Rho-GTPasen durch den Austausch von GDP gegen GTP. GAPs hingegen inaktivieren die Rho-GTPasen durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und anorganischem Phosphat (Bos *et al.*, 2007).

Einen inhibitorischen Einfluss auf die Aktivität von Rho-GTPasen haben außerdem die Rho-Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (RhoGDIs; *Rho GDP dissociation inhibitors*), die zum einen den Austausch von GDP zu GTP der GDP-gebundenen Rho-GTPasen verhindern und zum anderen die GTPase-Aktivität der Rho Proteine inhibieren, wodurch die intrinsische und GAP-stimulierte Hydrolyse von GTP unterbunden wird. Die inaktiven Rho-GTPasen verbleiben im Komplex mit RhoGDIs im Zytoplasma (Ueda *et al.*, 1990; Hart *et al.*, 1992; Garcia-Mata *et al.*, 2012). So wird z. B. die Rho-GTPase RhoA durch p120 Catenin (p120ctn) in Epithelzellen inhibiert, wobei sich p120ctn gegenüber RhoA wie eine RhoGDI verhält, siehe Kapitel 1.3.2 (Castano *et al.*, 2007).

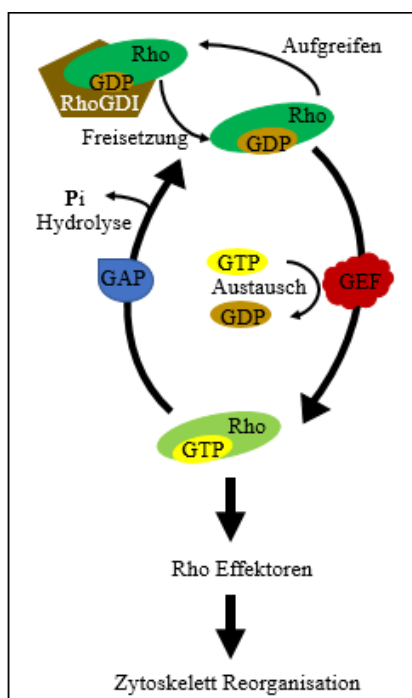


Abbildung 3: Aktivitätsregulierung von Rho-GTPasen. Rho-GTPasen wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenem und einem inaktiven, GDP-gebundenem Zustand. Auf den Zustandswechsel nehmen GEFs und GAPs Einfluss. GEFs aktivieren Rho-GTPasen durch den Austausch von GDP gegen GTP und GAPs inaktivieren Rho-GTPasen durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und anorganischem Phosphat. RhoGDIs binden GDP-gebundene Rho-GTPasen und halten sie im Zytoplasma in einem inaktiven Zustand. Liegen die Rho-GTPasen in einem GTP-gebundenem aktiven Zustand vor, können sie zusammen mit verschiedenen Effektorproteinen zahlreiche zelluläre Prozesse beeinflussen (Abbildung verändert nach Aslan und McCarty, 2013).

Bisher sind über 80 GEFs und 70 GAPs in der Literatur beschrieben, was Hinweise darauf gibt, dass die Regulierung der Rho-GTPasen ein komplexer Prozess ist und die Aktivierung und Lokalisation durch multiple Signaltransduktionswege oberhalb von Rho beeinflusst werden kann (Hall, 2012).

1.1.4 RhoA und RhoC

Zu der Rho-Subfamilie der Rho-GTPasen gehören RhoA, RhoB und RhoC, die als erste Rho-GTPasen 1985 entdeckt wurden und auf Aminosäuresequenzebene eine Übereinstimmung von über 88 % aufweisen (Madaule und Axel, 1985; Wheeler und Ridley, 2004). RhoA und RhoC weisen eine Sequenzidentität von 92 % auf und unterscheiden sich in nur 16 von 193 Aminosäuren, wobei von diesen 16 Aminosäuren 9 am carboxy-terminalen Ende der Rho-Proteine lokalisiert sind. Wichtige regulatorische Domänen, wie die Effektorregion und die Insertregion, sind bei RhoA und RhoC identisch (Wheeler und Ridley, 2004). In Abbildung 4 sind die Aminosäuresequenzen von RhoA und RhoC im Vergleich dargestellt.

<u>Effektorregion</u>				
RhoA:	MAAIRKKLVI	VGDGACGKTC	LLIVFSKDQF	PEVYVPTVFE NYVADIEVDG
RhoC:	MAAIRKKLVI	VGDGACGKTC	LLIVFSKDQF	PEVYVPTVFE NYIADIEVDG
	10	20	30	40 50
RhoA:	KQVELALWDT	AGQEDYDRLR	PLSYPDTDVI	LMCFSIDSPD SLENIPEKWT
RhoC:	KQVELALWDT	AGQEDYDRLR	PLSYPDTDVI	LMCFSIDSPD SLENIPEKWT
	60	70	80	90 100
<u>Insertregion</u>				
RhoA:	PEVKHFPCNV	PIILVGNKKD	LRNDEHTRRE	LAKMKQEPVK PEEGRDAMNR
RhoC:	PEVKHFPCNV	PIILVGNKKD	LRQDEHTRRE	LAKMKQEPVR SEEGRDAMNR
	110	120	130	140 150
RhoA:	IGAFGYMECS	AKTKDGVREV	FEMATRAALQ	ARRGKKKSGC CVL
RhoC:	ISAFGYLECS	AKTKEGVREV	FEMATRAGLQ	VRKNKRRRG C PIL
	160	170	180	190

Abbildung 4: Aminosäuresequenzvergleich von RhoA und RhoC. Übereinstimmende Aminosäuren von RhoA und RhoC sind in schwarz, Aminosäuren die sich unterscheiden in rot gekennzeichnet. Effektorregion und Insertregion sind markiert. Die Aminosäurepositionen sind durch Zahlen bezeichnet (Abbildung verändert nach Liska, 2009).

Eine wichtige Rolle spielt die Überexpression von RhoA und RhoC bei der Entstehung und Metastasierung von Tumorzellen, bei der sie trotz ihrer hohen Aminosäuresequenzübereinstimmung unterschiedliche Funktionen übernehmen (Ridley, 2013; Orgaz *et al.*, 2014). Dietrich und ihre Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von RhoC zu einer gesteigerten Migration und Invasion von Pankreaskarzinomzellen führt, wohingegen eine überhöhte Expression von RhoA diese Prozesse verringert (Dietrich *et al.*, 2009).

RhoA und RhoC kontrollieren zelluläre Vorgänge unterschiedlich, so ist RhoC im Gegensatz zu RhoA für eine normale Zellentwicklung entbehrlich und wird für die Funktion von B- und T-Zellen nicht benötigt (Wheeler und Ridley, 2004; Hakem *et al.*, 2005). Die isoformspezifischen Funktionen von RhoA und RhoC korrelieren mit einer unterschiedlichen Aktivität, so konnte in der Arbeitsgruppe von K. Giehl gezeigt werden, dass EGFP-RhoC aktiver ist als EGFP-RhoA und dass das carboxy-terminale Ende keinen Einfluss auf die Aktivität der Rho-GTPasen RhoA und RhoC hat (Dietrich *et al.*, 2009). RhoA und RhoC wurden beide an der Zellmembran und im Zellzytoplasma nachgewiesen, wobei RhoA mehr im Zytoplasma und RhoC mehr an der Zellmembran vertreten ist (Dietrich *et al.*, 2009). Tao und seine Mitarbeiter konnten außerdem zeigen, dass RhoA durch LPA in den Zellkern transportiert wird und dort vermutlich in der aktiven Form vorliegt (Tao *et al.*, 2008). In Bezug auf die Interaktion mit den Rho-Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren RhoGDI α und RhoGDI β konnte für beide Rho-GTPasen ein gleichwertiges Interaktionsverhalten festgestellt werden (Dietrich *et al.*, 2009). Unterschiede zeigen sich für die Rho-GTPasen RhoA und RhoC in Bezug auf die Effektorkinasen ROCK und Citron, für die RhoC eine höhere Affinität zeigt (Sahai und Marshall, 2002). RhoA wird durch LPA und fötales Kälberserum (FCS) aktiviert, welche hingegen auf RhoC keinen Einfluss haben (Dietrich *et al.*, 2009). Ein weiterer Unterschied zwischen RhoA und RhoC zeigt sich in Zusammenhang mit dem Austauschfaktor XPLN. XPLN induziert den Austausch von GDP zu GTP und führt damit zu einer Aktivierung von RhoA und RhoB, jedoch nicht von RhoC. Dieses unterschiedliche Interaktionsverhalten der Rho-GTPasen basiert auf der Aminosäure an Position 43, an dieser Position ist bei RhoA Valin und bei RhoC Isoleucin (Arthur *et al.*, 2002).

Die RhoA Überexpression ist in primären humanen Tumoren u. a. assoziiert mit der Progression von Hodenkrebs (Kamai *et al.*, 2004), Brustkrebs, Darmkrebs, Lungenkrebs

(Fritz *et al.*, 1999), Leberkrebs (Gómez del Pulgar, 2005) und Plattenepithelkarzinom (Abraham *et al.*, 2001). Eine Mutation in RhoA (G17V), die zu einem Funktionsverlust führt, wurde in 50-68 % der angioimmunoplastischen T-Zell-Lymphome nachgewiesen (Yoo *et al.*, 2014). RhoC wurde z. B. in Brustkrebszellen (van Golen *et al.*, 2000) und dem kolorektalen Karzinom (Wang *et al.*, 2009) in vermehrten Mengen detektiert und eine Überexpression korreliert mit einer schlechten Prognose bei dem malignen Melanom (Boone *et al.*, 2009) und dem pankreatischen Adenokarzinom (Suwa *et al.*, 1998).

1.2 Zell-Zell-Adhäsion

Als Zell-Zell-Kontakte bezeichnet man temporäre oder dauerhafte Verbindungen, die eine Adhäsion zwischen Zellen und die Organisation gleichartiger Zellen zu einem Gewebe ermöglichen und dem Zwecke der funktionellen Stabilität und zellulären Kommunikation dienen. In Epithelien dienen *adherens junctions*, *tight junctions* und Desmosomen als Zell-Zell-Kontakte, wobei *adherens junctions* und *tight junctions* mit Aktinfilamenten und Desmosomen mit Intermediärfilamenten verknüpft sind (Tsukita *et al.*, 1993; De Pascalis und Etienne-Manneville, 2017).

Eine strukturell entscheidende Proteinfamilie der *adherens junctions* und Desmosomen sind die Cadherine. Cadherine sind von Calciumionen (Ca^{2+}) abhängige transmembrane Glykoproteine aus der Gruppe der Adhäsionsproteine (Butz und Kemler, 1994). Aus der Superfamilie der Cadherine konnten bisher bei Wirbeltieren über 300 und beim Menschen über 80 unterschiedliche Cadherine identifiziert werden, wobei die klassischen Cadherine wie E-, N-, P-, und VE-Cadherine die wichtigsten und bisher am besten untersuchten Vertreter sind (Gumbiner, 2005). E-Cadherin ist in epithelialem Gewebe hauptsächlich an der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion beteiligt, wobei es an der Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität und für die Verbindung des Gewebes verantwortlich ist (Takaishi *et al.*, 1995; Hinck *et al.*, 1994). Für eine effiziente Zell-Zell-Adhäsion ist es unbedingt notwendig, dass die E-Cadherin-Moleküle durch Proteinkomplexe, die sich aus Mitgliedern der *armadillo repeat*-Proteine zusammensetzen, stabilisiert werden. An den zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin binden β -Catenin oder γ -Catenin über ihre Catenin-Bindungsdomäne und interagieren mit α -Catenin (Aberle *et al.*, 1996; Yap *et al.*, 1998). Mit α -Catenin interagiert das aktin-bindende Protein EPLIN (*epithelial protein lost in neoplasm*),

welches zwischen dem Cadherin-Catenin-Komplex und dem Aktin-Zytoskelett eine Verbindung herstellt (Abe und Takeichi, 2008). Außerdem bindet p120 Catenin (p120ctn) an die juxtamembrane Domäne von E-Cadherin und stabilisiert den Cadherin-Catenin-Komplex (Yap *et al.*, 1998; Thoreson *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2003), siehe Kapitel 1.3.2. Hierbei reguliert p120ctn in Zusammenhang mit der Aktivität der Rho-GTPasen die Verbindung zwischen E-Cadherin und dem Aktin-Zytoskelett (Anastasiadis *et al.*, 2000; Noren *et al.*, 2000).

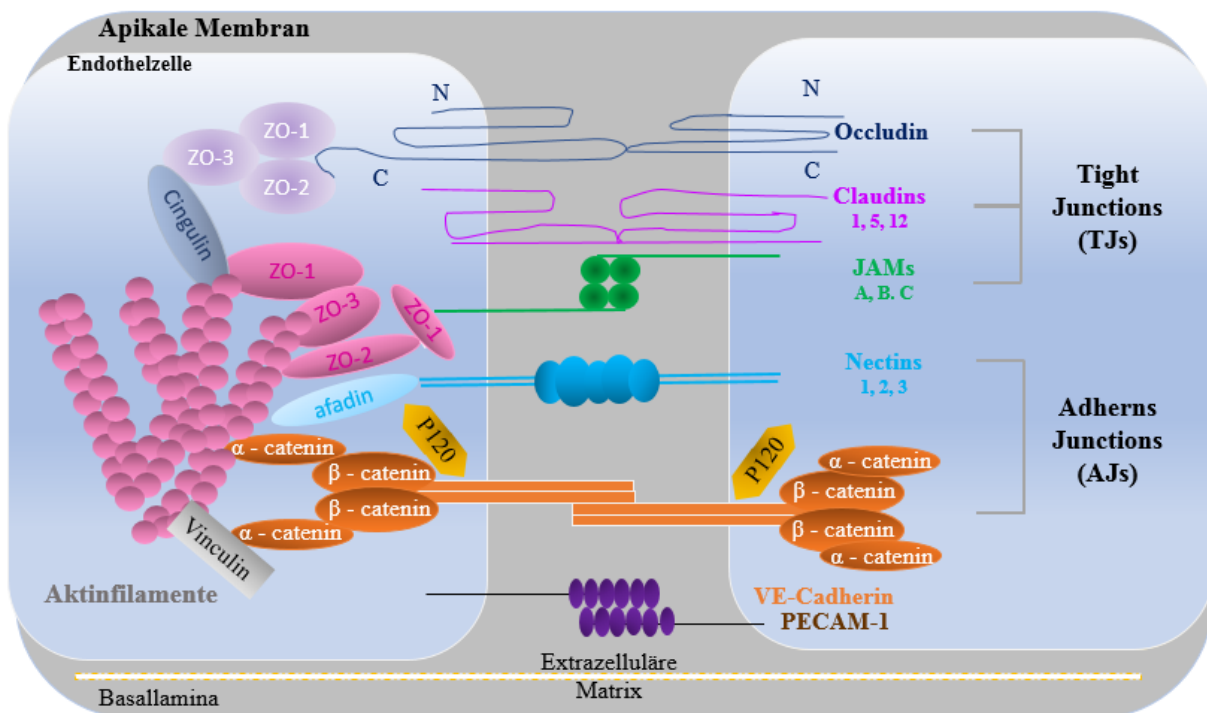


Abbildung 5: Endotheliale Zell-Zell-Kontakte. Dargestellt sind die wichtigsten transmembranen Proteine in endothelialen Zell-Zell-Kontakten der *tight junctions* (TJs) und *adherens junctions* (AJs) (Abbildung verändert nach Cerutti und Ridley, 2017).

1.3 Humanes p120 Catenin (p120ctn)

p120 Catenin (p120cnt) ist ein *armadillo repeat*-Protein und gehört zur Familie der p120-Proteine (Reynolds *et al.*, 1992; Peifer *et al.*, 1994; Hatzfeld, 2005). p120ctn wurde zunächst als Substrat der onkogenen Src-Kinase und der Rezeptor-Tyrosinkinasen beschrieben und als p120cas (*cadherin-associated SRC substrate*) bezeichnet (Reynolds *et al.*, 1989). Einige Zeit später wurde entdeckt, dass es an die zytoplasmatische juxtamembrane Domäne am carboxy-terminalen Ende von C-, E-, N-, P- und VE-Cadherinen bindet und es sich um ein Catenin handelt (Reynolds *et al.*, 1994; Thoreson *et al.*, 2000). p120cas wurde daraufhin in p120ctn umbenannt, um eine Verwechslung mit dem ähnlich klingenden p130cas (*Crk-associated substrate*) zu vermeiden und seine direkte Bindung als Catenin an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherinen zu betonen (Daniel und Reynolds, 1997).

Charakteristisch für die p120-Familie ist eine *armadillo*-Sequenz, die aus 10 Wiederholungen von 42 Aminosäuren besteht und ursprünglich im Segmentpolaritätsgen *armadillo* bei *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde (Riggelman *et al.*, 1989; Peifer *et al.*, 1994).

Die Familie der *armadillo repeat*-Proteine besteht aus zwei Subgruppen. Zu der ersten Subgruppe gehören p120ctn, p0071, δ -catenin/NPRAP und ARVCF. Diese Proteine stimmen in über 45 % ihrer *armadillo repeat*-Sequenz mit p120ctn überein und binden an die klassischen Cadherine, lokalisiert an den *adherens junctions*. p0071 bindet als einziges Protein im Bereich der *adherens junctions* und Desmosomen. Die zweite Subgruppe umfasst die Plakophiline 1, 2 und 3, die in über 30 % mit der p120ctn *armadillo repeat*-Sequenz übereinstimmen. Diese Plakophiline interagieren nicht mit den klassischen Cadherinen, sondern über ihre N-terminale Domäne mit Desmoplakin und desmosomalen Cadherinen, die im Bereich der Desmosomen lokalisiert sind (Hatzfeld, 2005; Hatzfeld *et al.*, 2014).

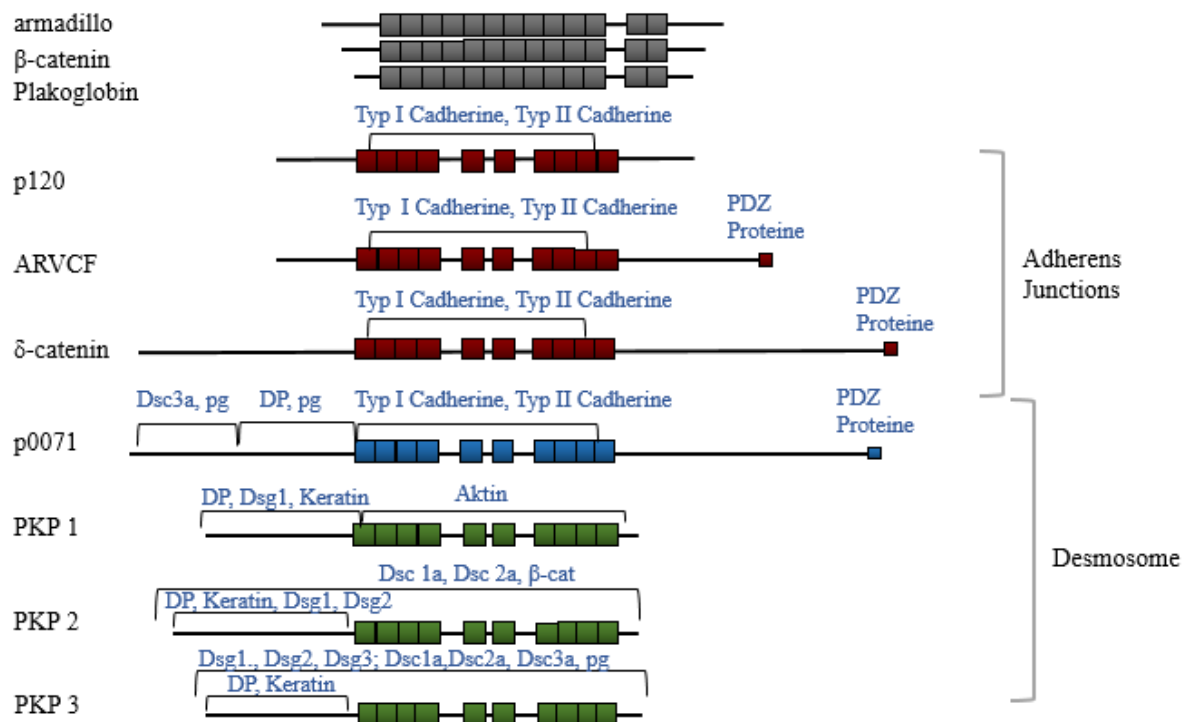


Abbildung 6: Bindungsbereiche, Bindungspartner und Lokalisation der p120-Proteinfamilie. DP: Desmoplakin; Pg: Plakoglobin; Dsg: Desmoglein; Dsc: Desmocollin; PKP: Plakophilin (Abbildung verändert nach Hatzfeld, 2005).

1.3.1 Struktur von p120ctn

p120ctn wird von dem humanen Gen CTNND1 codiert, das auf Chromosom 11q11 lokalisiert ist und aus 21 Exons besteht (Bonne *et al.*, 1998). p120ctn besteht vom N- bis zum C-Terminus aus vier funktionellen Regionen, der *coiled-coil*-Domäne, der regulatorischen Domäne, der *armadillo repeat*-Domäne und dem C-terminalen Ende. Durch alternatives Spleißen und alternative Start-Codons können multiple Isoformen des p120ctn erzeugt werden, die alle die charakteristische zentrale *armadillo repeat*-Domäne aufweisen. Diese *armadillo repeat*-Domäne besteht aus einer Sequenz von 45 Aminosäuren, die sich zehnmal wiederholt.

Humanes p120ctn besteht aus bis zu 32 verschiedenen Isoformen, die sich am amino- und carboxy-terminalen Ende voneinander unterscheiden. Im Bereich der N-terminalen Domäne können vier verschiedene ATG-Startcodons genutzt werden, die die vier Isoformen 1, 2, 3 und 4 bedingen. Weitere Isoformen können durch alternatives Spleißen und Kombination der Exone A (Exon 18) und B (Exon 20), lokalisiert in der

C-terminalen Domäne, und Exon C (Exon 11), lokalisiert im Bereich der *armadillo*-Sequenz, hergestellt werden. Benannt wird eine p120ctn-Isoform nach dem verwendeten Startcodon 1, 2, 3 oder 4 und dem verwendeten Exon A, B und/oder C. Die theoretisch längste Struktur des humanen p120ctn 1ABC ist in Abbildung 7 dargestellt und besteht aus 968 Aminosäuren. Die *coiled-coil*-Domäne wird im aminoterminalen Bereich des Startcodon 1 codiert und besteht aus 45 Aminosäuren. Die Isoformen 2, 3 und 4 weisen einen späteren Translationsstart auf, deshalb haben diese Isoformen keine *coiled-coil*-Domäne. Die regulatorische Domäne tritt nur bei den Isoformen 1-3 auf und beinhaltet Tyrosine, die durch Tyrosinkinasen phosphoryliert werden können (Keirsebilck *et al.*, 1998; Guochuang Hu, 2012). Weitere posttranslationale Modifikationen können durch Phosphorylierung mit Serin/Threonin- oder Tyrosinresten durch verschiedene Proteinkinasen erzeugt werden (Castano *et al.*, 2007; Alema und Salvatore, 2007).

In Abbildung 7 sind die Exone A, B und C markiert. Wird keines dieser Exone verwendet, wird die Isoform mit dem Buchstaben N bezeichnet (z. B. p120ctn Isoform 1N) (Anastasiadis und Reynolds, 2000).

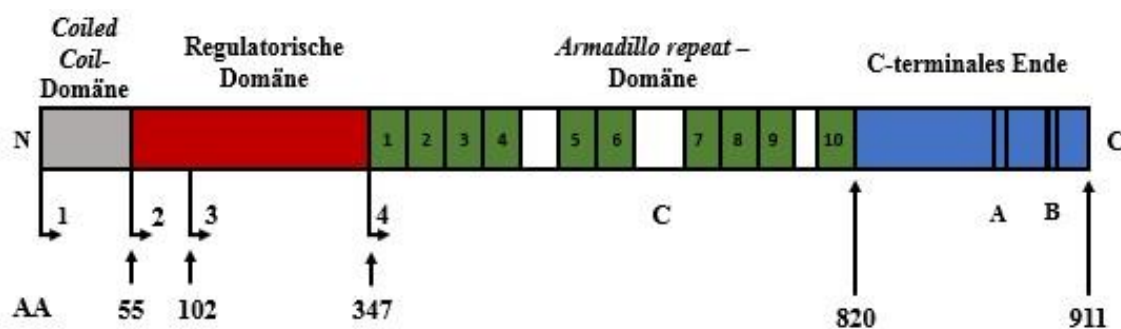


Abbildung 7: Schema der Struktur von Isoform p120ctn(1ABC). p120ctn besteht aus vier funktionellen Regionen: *coiled-coil*-Domäne, regulatorische Domäne, *armadillo repeat*-Domäne und C-terminales Ende. Verschiedene Isoformen werden durch die Kombination der Startcodons 1-4 und der Exone A, B und C generiert. 1, 2, 3, 4: ATG-Startcodons; A, B, C: Exon; N: amino-terminales Ende; C: carboxy-terminales Ende (Abbildung verändert nach Guochuang Hu, 2012).

In verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass p120ctn mit Rho-GTPasen interagiert (Castano *et al.*, 2007; Liska, 2009). Castano und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass verschiedene Deletionsmutanten von p120ctn dabei ein

unterschiedliches Bindungsverhalten in Bezug auf Rho-GTPasen aufweisen. So machte Castano zunächst den Aminosäuresequenzbereich 1-234 in der regulatorischen Domäne von p120ctn als Interaktionsstelle mit der Rho-GTPase RhoA ausfindig. In weiteren Experimenten konnte dargestellt werden, dass die Deletionsmutanten p120ctn(1-234) und p120ctn(102-234) ein identisches Bindungsverhalten mit RhoA zeigen, die Deletionsmutanten p120ctn(1-96) und p120ctn(234-Ende) jedoch keine Bindung an RhoA aufweisen. So ist die Bindungsstelle zwischen p120ctn und der Rho-GTPase RhoA vermutlich im Aminosäuresequenzbereich 102-234 von p120ctn lokalisiert. Außerdem fand Castano heraus, dass die Tyrosinkinasen Src, Fer und Fyn durch Phosphorylierung der regulatorischen Domäne von p120ctn das Bindungsverhalten von p120ctn zu Rho-GTPasen verändern können (Castano *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem die Deletionsmutanten p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234) verwendet, siehe Abbildung 8.

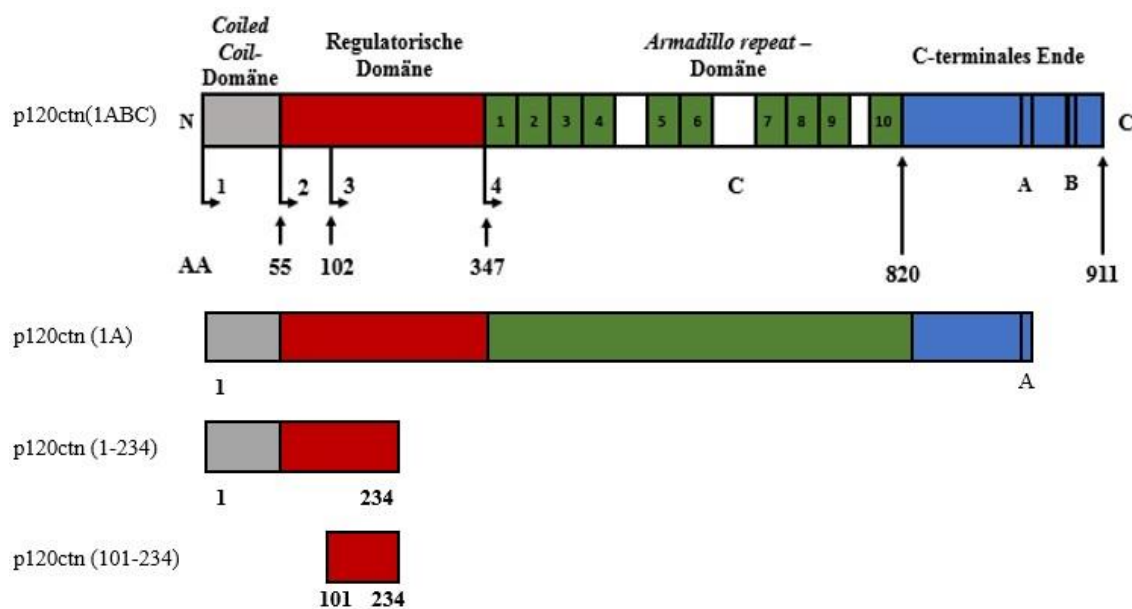


Abbildung 8: Schema der Struktur der Deletionsmutanten von p120ctn. Dargestellt sind die in den Experimenten verwendeten die Deletionsmutanten p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234) und die Isoform p120ctn(1A) im Vergleich zu der Isoform p120ctn(1ABC).

1.3.2 Funktion von p120ctn

p120ctn spielt an der Plasmamembran der Zelle eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion, bei der Regulation der Zytoskelett-Organisation, bei der Regulation der Aktivität von Rho-GTPasen und bei der Genregulation im Zellkern (Reynolds und Carnahan, 2004).

p120ctn beeinflusst die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion, indem es die Stabilität des Cadherin-Catenin-Komplexes an *adherens junctions* reguliert, wobei es im Bereich der Plasmamembran über die *armadillo repeat*-Domäne an die Juxtamembrane-Domäne (JMD) des zytoplasmatischen Teils der Cadherine bindet (Yap *et al.*, 1998; Thoreson *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2003). p120ctn ist essentiell für die Stabilität und Funktion von E-Cadherin und es verlängert die Halbwertszeit von E-Cadherin auf mehr als das Doppelte (Ireton *et al.*, 2002). Davis und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein Ausschalten von p120ctn zu einer Reduktion von E-, N-, P-, und VE-Cadherinen und einem kompletten Verlust der Zell-Zell-Adhäsion führt. Wenn neu synthetisiertes E-Cadherin an der Zelloberfläche erscheint verhindert p120ctn vermutlich dessen vorzeitigen Abbau durch Proteosomen oder Lysosomen (Davis *et al.*, 2003). Außerdem bewirkt die Bindung von p120ctn an E-Cadherine eine Ausbildung von seitlichen Verbindungen zwischen den E-Cadherin-Molekülen zu charakteristischen reisverschlussähnlichen Strukturen, die für den starken mechanischen Zusammenhalt in epithelialen Geweben essentiell sind (Yap *et al.*, 1998; Thoreson *et al.*, 2000). p120ctn selbst ist in Abwesenheit von Cadherinen metabolisch stabil und sammelt sich im Zytoplasma an (Thoreson *et al.*, 2000). Wird p120ctn durch die Tyrosinkinase Src phosphoryliert, so wird seine Bindung an E-Cadherin verstärkt (Roura *et al.*, 1999).

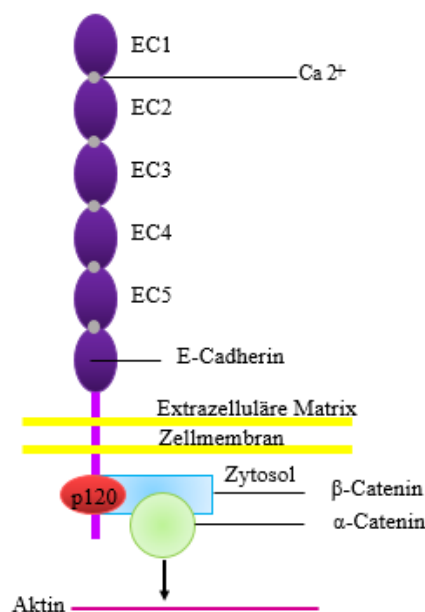


Abbildung 9: Interaktion von E-Cadherin mit Cateninen. β -Catenin bindet an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin und an α -Catenin. α -Catenin reguliert die Polymerisation des Aktinzytoskeletts. β -Catenin und p120-Catenin wirken als Transkriptionsfaktoren (Abbildung verändert nach Gumbiner, 2005).

Auf die Interaktion von p120ctn mit E-Cadherin nehmen die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 Einfluss (Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001). Durch eine Überexpression von p120ctn in Fibroblasten kommt es zur Verlängerung von Filopodien und Lamellopodien und ein sogenannter *dendritic phenotype* entsteht (Reynolds *et al.*, 1996; Grosheva *et al.*, 2001). Noren und ihre Mitarbeiter konnten zeigen, dass der *dendritic phenotype* durch Cdc42, Rac1 und aktives RhoA inhibiert wurde. Gleichzeitig führt eine Überexpression von p120ctn zu einer Aktivierung der Aktivität von Cdc42 und Rac1 im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus. Auf die Aktivität von RhoA hat die Überexpression von p120ctn allerdings einen inhibierenden Einfluss. Außerdem konnte gezeigt werden, dass p120ctn mit dem GTP-Austauschfaktor Vav2 interagiert, was eine Aktivierung der Aktivität von Rac1 und Cdc42, sowie eine Inhibition der Aktivität von RhoA bewirkt und somit die Aktin-Polymerisation und die Reorganisation des Zellzytoskeletts fördert (Noren *et al.*, 2000; Yanagisawa und Anastasiadis, 2006).

Durch Verwendung eines *Drosophila*-Homologs zum humanen RhoA, der Rho-GTPase Rho1, konnte in *in vitro*-Experimenten eine direkte Interaktion von p120ctn mit Rho1 im Zytoplasma gezeigt werden, wobei diese Interaktion vorwiegend für die GDP-gebundene Form der Rho-GTPase festgestellt wurde (Magie *et al.*, 1999; Magie *et al.*, 2002). In *in vivo*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass p120ctn die Aktivität von RhoA in Epithelzellen inhibiert und ebenfalls vorwiegend an die GDP-gebundene Form von RhoA bindet (Anastasiadis *et al.*, 2000). Castano und seine Mitarbeit konnten feststellen, dass sich p120ctn gegenüber RhoA wie eine RhoGDI verhält, indem p120ctn RhoA durch die Interaktion blockiert und den Austausch von Guaninnukleotiden in RhoA verhindern kann (Castano *et al.*, 2007).

In der Arbeitsgruppe von K. Giehl konnte im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. rer. nat. M. Liska erstmals in *in vitro*-Experimenten eine Interaktion zwischen p120ctn und der Rho-GTPase RhoC nachgewiesen werden (Liska, 2009). Außerdem wurde eine differentielle Interaktion der Rho-GTPasen mit p120ctn-Isoformen festgestellt. So zeigte sich in den durchgeführten Interaktionsstudien, dass p120ctn-Isoformen mit GST-RhoC etwa 40 % mehr als mit GST-RhoA präzipitiert werden konnten. In weiterführenden *in vitro*-Bindungsexperimenten konnte des Weiteren festgestellt werden, dass die Aminosäure an Position 152 die unterschiedliche Interaktionsaffinität der Rho-GTPasen gegenüber p120ctn begründet (Liska, 2009). Bei RhoC befindet sich

an Position 152 die Aminosäure Serin, bei RhoA Glycin. Der Aktivitätszustand der Rho-GTPasen schien in den durchgeführten Bindungsstudien keinen Einfluss auf die Interaktion mit den p120ctn Isoformen zu haben. Außerdem wird die Interaktion von p120ctn mit RhoA *in vitro* und *in vivo* durch den Schlüsselregulator Tyr112 beeinflusst (Castano *et al.*, 2007).

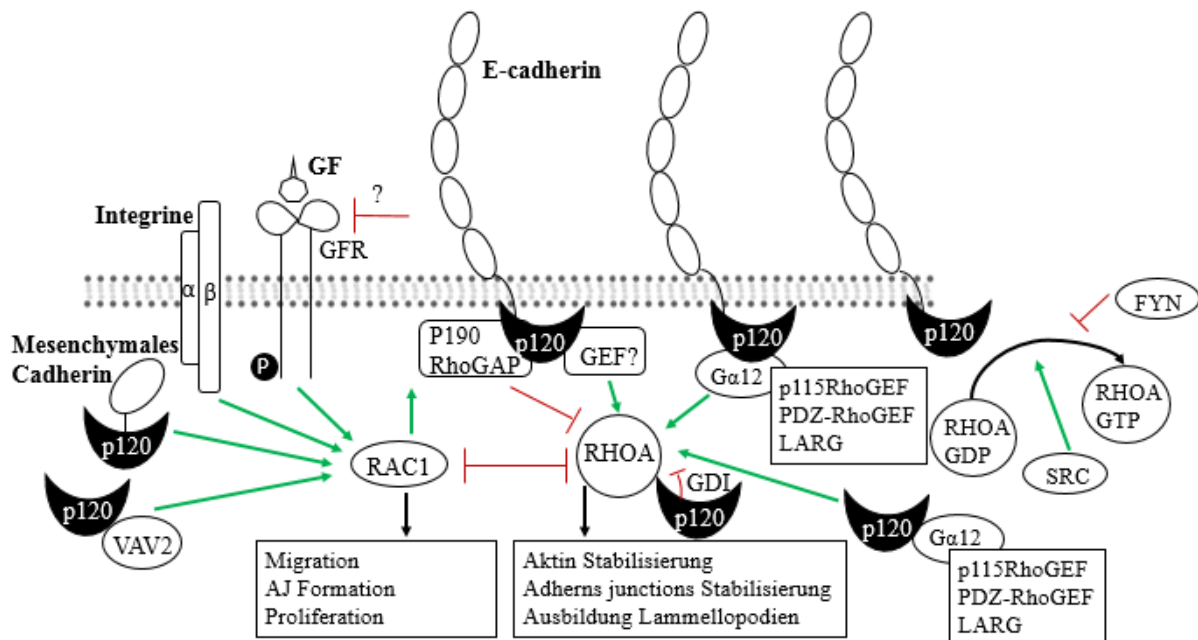


Abbildung 10: Einfluss von p120ctn auf die Aktivität von Rho-GTPasen. Dargestellt sind einige Mechanismen, mit denen p120ctn Einfluss auf die Aktivität von Rho-GTPasen nehmen kann. p120ctn kann zusammen mit mesenchymalem Cadherin oder dem GTP-Austauschfaktor (GEF) Vav2 Rac1 aktivieren. RhoA kann durch zytosolisches p120ctn inhibiert werden, wobei p120ctn vermutlich im Sinne eines RhoGDI agiert. Liegt p120ctn zytosolisch oder membran-assoziiert mit Gα12 vor, so bewirkt es eine Aktivierung von RhoA. Wird p120ctn Src-vermittelt phosphoryliert hat es einen aktivierenden Einfluss auf RhoA. Wird p120ctn hingegen durch Fyn phosphoryliert hat es einen hemmenden Einfluss auf RhoA. Rac1 kann RhoA direkt oder indirekt über p190RhoGAP inhibieren. Alles in allem spielt p120ctn eine wichtige Rolle bei Aktivierung und Inaktivierung von Rho-GTPasen. Aktivierungswege sind in grün, Inhibitionswege in rot dargestellt. GAP: *GTPase activating protein*; GDI: *guanosine nucleotide dissociation inhibitor*; GEF: *guanine nucleotide exchange factor*; AJ: *adherens junctions* (Abbildung verändert nach Schackmann *et al.*, 2013).

p120ctn ist auch im Zellkern lokalisiert, wo es durch seine Interaktion mit dem Transkriptionsrepressor Kaiso einen direkten Einfluss auf die Genexpression nehmen kann. Kaiso ist ein BTB/POZ Transkriptionsfaktor aus der Familie der *zinc finger* Proteine, der an methylierte DNA oder spezifische Kaiso Bindungssequenzen binden kann (TCCTGCNA) (Daniel und Reynolds, 1999; Daniel *et al.*, 2002). Der Transportmechanismus von p120ctn in den Zellkern ist noch nicht abschließend geklärt, möglich wäre ein Transport durch seine *nuclear localization signals* (NLSs) am aminoterminalen Ende bzw. im Bereich der *armadillo repeat*-Domäne oder durch einen Bindungspartner wie z.B. LIS2 (Roczniak-Ferguson und Reynolds, 2003; Kelly *et al.*, 2004; Daniel *et al.*, 2007). Auch ein Transport durch das C-terminale Fragment von E-Cadherin wäre möglich (Ferber *et al.*, 2008). Im Zellkern kann p120ctn an Kaiso binden und dessen Interaktion mit der DNA verhindern, wodurch die Zielgene von Kaiso nicht mehr unterdrückt und abgelesen werden können (Daniel *et al.*, 2002; Schackmann *et al.*, 2013).

1.3.3 Expression und Funktion von p120ctn in Tumoren

Charakteristisch für metastasierende Karzinomzellen sind der Verlust von E-Cadherin und damit eine gestörte Zell-Zell-Adhäsion (Perl *et al.*, 1998). Eine Wiederherstellung der E-Cadherin Expression kann den Metastasierungsprozess *in vitro* und *in vivo* limitieren, E-Cadherin spielt somit eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor. Da p120ctn essentiell für die Stabilität und Funktion von E-Cadherin ist, korreliert die verminderte Expression bzw. das Fehlen von p120ctn mit einer Destabilisierung des Cadherin-Catenin-Komplexes und einem Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, sodass sich Tumorzellen aus dem Zellverband herauslösen können (Reynolds und Carnahan, 2004; Seidel *et al.*, 2004).

In invasiven Karzinomzellen wurde eine Veränderung vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp beobachtet, ein Prozess der als EMT (*epithelial to mesenchymal transition*) bezeichnet wird. Mit dem Wechsel des Phänotyps gehen eine Reduktion der E-Cadherin Expression und damit der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion einher, was zu einer vermehrten Zellmotilität führen kann. Aufgrund des Verlustes von E-Cadherin ist p120ctn vermehrt im Zytoplasma lokalisiert (Thiery, 2002). Untersuchungen an Darmkarzinomzellen konnten ebenfalls zeigen, dass die Veränderung vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp während der

Tumorprogression mit einer vermehrten Lokalisation von p120ctn im Zytoplasma und einem invasiven Phänotyp einhergeht (Bellovin *et al.*, 2005). Auch bei anderen Karzinomarten konnte dieses Phänomen festgestellt werden, was mit einer Verschlechterung der Prognose des Patienten korrelierte (Shibata *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2015).

Eine verminderte oder fehlende Expression von p120ctn bzw. einzelner p120ctn-Isoformen kann ebenfalls zur Tumorbildung in verschiedenen Geweben beitragen, vor allem bei dem Pankreaskarzinom (Seidel *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2015). Untersuchungen an Pankreaskarzinomzellen konnten zeigen, dass eine Erhöhung der mRNA-Expression und des Proteingehaltes von p120ctn im Zytoplasma von Pankreaskarzinomzellen vorliegt (Mayerle *et al.*, 2003). Menke und Mitarbeiter konnten demonstrieren, dass sich die p120ctn-Isoformen, die an E- und N-Cadherin binden, in Pankreaskarzinomzellen unterscheiden, wodurch die Zell-Zell-Adhäsion beeinflusst wird (Seidel *et al.*, 2004).

Die vier verschiedenen p120ctn-Isoformen zeigen eine unterschiedliche Interaktionsaffinität zu Cadherinen. In Pankreaskarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass N-Cadherin bevorzugt mit einer langen, phosphorylierten p120ctn Isoform von 120 kDa und E-Cadherin mit einer kürzeren, unphosphorylierten Isoform von p120ctn von 95 kDa interagiert (Seidel *et al.*, 2004). Die Expression der unterschiedlichen p120ctn-Isoformen ist dabei möglicherweise von der Expression der interaktionsspezifischen Cadherine abhängig. Untersuchungen an Prostatakarzinomzellen konnten beweisen, dass eine Verschiebung der Expression von E- zu N-Cadherinen auch zu einer Verschiebung in der Expression der unterschiedlichen p120ctn-Isoformen führte (Tran *et al.*, 1999).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte mittels biochemischer Methoden die Interaktion der beiden Rho-GTPasen RhoA und RhoC, die eine Aminosäuresequenzidentität von 92 % aufweisen, mit dem *armadillo repeat*-Protein p120ctn untersucht und die Bindungsdomäne in p120ctn charakterisiert werden.

M. Liska hatte in ihrer Dissertation bereits eine Interaktion von RhoA und erstmalig RhoC mit p120ctn festgestellt (Liska, 2009). In *in vitro*-Bindungsexperimenten mit

rekombinanten, in *E. coli* exprimierten und gereinigten GST-RhoA- und GST-RhoC-Fusionsproteinen konnte Liska außerdem eine differentielle Interaktion mit verschiedenen p120ctn-Isoformen nachweisen. Zusätzlich konnte sie zeigen, dass der Aktivitätszustand der Rho-GTPasen in ihren Versuchen keinen Einfluss auf die Interaktion mit den verwendeten p120ctn-Isoformen hatte. Die Arbeitsgruppe von Castano hatte bezüglich der Charakterisierung der Bindungsdomäne auf p120ctn bereits Experimente mit verschiedenen Deletionsmutanten von p120ctn durchgeführt, bei denen Castano und seine Mitarbeiter ebenfalls zeigen konnten, dass unterschiedliche Deletionsmutanten von p120ctn ein differenziertes Bindungsverhalten gegenüber Rho-GTPasen zeigten (Castano *et. al*, 2007). Castano und seine Mitarbeiter konnten die Bindungsdomäne auf p120ctn gegenüber RhoA bereits auf den Aminosäuresequenzbereich 102-234 eingrenzen. Außerdem konnte in der Arbeitsgruppe von Castano festgestellt werden, dass die Tyrosinkinasen Src, Fer und Fyn das Bindungsverhalten von p120ctn gegenüber Rho-GTPasen durch Phosphorylierung der regulatorischen Domäne verändern können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Aminosäuresequenz der Bindungsdomäne auf p120ctn unter Verwendung verschiedener Deletionsmutanten von p120ctn mit Hilfe von *in vitro*-Bindungsstudien gegenüber den Rho-GTPasen RhoA und RhoC weiter einzugrenzen.

2 Material

2.1 Chemikalien

30 % (m/V) Acrylamid (Rotiphorese® Gel A)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Bacto tryptone</i>	Amresco, Darmstadt
<i>Bacto yeast extract</i>	Amresco, Darmstadt
2 % (m/V) Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel B)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA), pH 7,0	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck Millipore, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
1,4-Dithio-DL-threit(ol) (DTT)	AppliChem, Darmstadt
<i>Dulbecco's-Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (<i>molecular biology grade</i>)	Merck Millipore, Darmstadt
Essigsäure (100 %, glazial)	Merck Millipore, Darmstadt
Fötales Bovines Serum (FCS)	PAA, Cölbe
Genitacin 418-Sulfat (G418)	PAA, Cölbe
GlutaMAX™ (200 mM L-alanyl-L-Glutamin)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Glutathione Sepharose <i>Beads</i> ™ 4B	GE Healthcare, Freiburg
Glycerin (<i>molecular biology grade</i>)	VWR, Darmstadt
Glycin	Fisher Scientific, Schwerte
Hefeextrakt (<i>bacteriological grade</i>)	Amresco, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Immobilon™ <i>Western Chemiluminescent HRP Substrate</i>	Merck Millipore, Darmstadt

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hygromycin B	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Isobutanol	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Millipore, Darmstadt
Kupfer(II)-Sulfat	Riedel-de Haen, Seelze
Leupeptin	Serva, Heidelberg
LB-Agar-Medium	Q-Biogene, Heidelberg
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MEM <i>Non-Essential Amino Acids</i> , 100x	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim
Pefabloc	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pierce <i>BCA Protein Assay Reagent A</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein A-Agarose	Roche, Mannheim
Protein G-Agarose	Roche, Mannheim
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Darmstadt
Salzsäure 37 % (m/V)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SuperSignal® <i>West Pico</i> <i>Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (STI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trisma® base)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
0,05 % Trypsin-EDTA (1x), Phenol-Rot	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton (<i>bacteriological grade</i>)	Amresco, Darmstadt
Polyoxymethylensorbitan-monolaurat (Tween®20)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Kanülen 25 G (0,5 x 25 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Latexhandschuhe	Noba Verbandmittel, Wetter
Millex-GS Sterilfilter (0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt
Pasteurpipetten	LLG Labware, Meckenheim
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (200 µl, 10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen Röhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen Röhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Protran BA 85 <i>Nitrocellulose Transfer Membrane</i>	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
µMACS <i>Column</i>	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
Tuberkulin-Spritzen (1 ml)	Dispomed, Gelnhausen
Whatman®-Papier	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber (30 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
6-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch-Mikrotiterplatte	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Enzyme und molekularbiologische Kits

µMACS™ <i>anti-GFP Epitope Tagged Protein Isolation Kit</i>	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
µMACS™ <i>anti-GST Epitope Tagged Protein Isolation Kit</i>	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach
µMACS™ Protein A <i>MicroBeads</i>	Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach

2.4 Marker

Tabelle 1: Marker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i> (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) (Bestellnummer: 26616)
Molekulargewicht
170 kDa
130 kDa
100 kDa
70 kDa
55 kDa
40 kDa
35 kDa
25 kDa
15 kDa
10 kDa

2.5 Medien und Standardlösungen

2.5.1 Bakterienkulturmedium

LB (*lysogeny broth*) Flüssigmedium:

1,0 % (m/V) Bacto™ Trypton

0,5 % (m/V) Hefeextrakt

1,0 % (m/V) NaCl

pH 7,5

in dH₂O

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und ggf. Antibiotika [Ampicillin (75 µg/ml)] zugesetzt.

2.5.2 Zellkulturmedium (Wachstumsmedium)

Die Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 wurde in DMEM (Life Technologies, Darmstadt) (*high glucose*; 4,5 g/l) mit folgenden Zusätzen kultiviert:

10 % (V/V) fötales Kälberserum (FCS)

1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)

Alle Medienzusätze wurden jeweils vor Gebrauch durch einen Sterilfilter (0,22 µm; Merck Millipore, Darmstadt) filtriert.

2.5.3 Standardlösungen

1 x CMF-PBS:

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

pH 7,2

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

1 x TBS:

10 mM Tris/HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

2.6 Prokaryotische und eukaryotische Zellen

2.6.1 *Escherichia coli* Stämme

Competent *E. coli*

New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.6.2 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 2: Herkunft und Beschreibung der eukaryotischen Zelllinien

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, USA

Zelllinie	Beschreibung	Bemerkung
PANC-1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie epithelialer Morphologie (Lieber <i>et al.</i> , 1975), bei der eine monoallelische Punktmutation im Codon 12 des K-ras-Gens (GGT→GAT) zum Austausch von Glyzin gegen Asparaginsäure und damit zu einem konstitutiv-aktiven K-ras-Protein führt (Giehl <i>et al.</i> , 2000).	ATTC® CRL-1469™
PANC-1/EGFP	PANC-1-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pEGFP transfiziert wurden und EGFP exprimieren (Dietrich <i>et al.</i> , 2009).	von Prof. Dr. K. Giehl zur Verfügung gestellt
PANC-1/EGFP-RhoA	PANC-1-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pEGFP /RhoA transfiziert wurden und EGFP-RhoA exprimieren (Dietrich <i>et al.</i> , 2009).	von Prof. Dr. K. Giehl zur Verfügung gestellt
PANC-1/EGFP-RhoC	PANC-1-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pEGFP/RhoC transfiziert wurden und EGFP-RhoC exprimieren (Dietrich <i>et al.</i> , 2009).	von Prof. Dr. K. Giehl zur Verfügung gestellt
HEK-293	Humane, embryonale Nierenzelllinie mit epithelialer Morphologie, die durch Adenovirus 5 (Ad 5) transformiert wurde (Graham <i>et al.</i> , 1977).	ATTC® CRL-1573™

2.7 Antikörper

2.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Puffer A: 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Herkunft
anti- α -Tubulin, Klon B-5-1-2 Verdünnung: 1:10000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Bestellnummer: T5168
anti- β -Aktin, Klon AC-15 Verdünnung: 1:4000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Bestellnummer: A5441
anti-GFP (FL) Verdünnung: 1:1000 in Puffer A	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Bestellnummer: sc-8334
anti-GFP IRDye® 800CW Verdünnung: 1:5000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Rockland, Gilbertsville, USA Bestellnummer: 26615
anti-GFP, Klon 7.1 und 13.1 Verdünnung: 1:1000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Roche, Mannheim Bestellnummer: 11814460001
anti-GFP-HRP Verdünnung: 1:1000 in Puffer A	IgG-Fraktion aus Pferde- Antiserum	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Bestellnummer: 130-091-833
anti-GST Verdünnung: 1:1000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold Bestellnummer: MA4-004
anti-GST Verdünnung 1:1000 in Puffer A	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Bestellnummer: sc-459
anti-HA (12CA5) Verdünnung 1:1000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Roche, Mannheim Bestellnummer: SAB1305536
anti-HA HRP, HRP-linked Verdünnung: 1:1000 in 1 x TBS	IgG-Fraktion aus Pferde- Antiserum	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Bestellnummer: 130-091-972

anti-HA-Tag (6E2) Verdünnung: 1:2000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Cell Signaling, Frankfurt am Main Bestellnummer: 2367
anti-p120 ^{ctn} (<i>Catenin-related</i>) N-terminal Verdünnung: 1:1000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Bestellnummer: P 2732
anti-p120 ^{ctn} (NT) Verdünnung: 1:1000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Zymed, South San Francisco, USA Bestellnummer: 33-9700
anti-p120 (S-19) Verdünnung: 1:2000 in Puffer A	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Bestellnummer: sc-1101
anti-Rac1 Verdünnung: 1:2000 in Puffer A	monoklonal, Maus	BD Biosciences, San Jose, USA Bestellnummer: P2732
anti-Rac1b Verdünnung: 1:2000 in Puffer A	polyklonal, Kaninchen	Merck Millipore, Darmstadt Bestellnummer: 09-271
anti-Rho A (26C4) Verdünnung: 1:5000 in Puffer A	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Bestellnummer: sc-418
anti-Rho (-A, -B, -C), Klon 3L74 Verdünnung: 1:1000 in Puffer A	monoklonal, Kaninchen	Upstate, New York, USA Bestellnummer: 05-822
anti-Rho C (G12) Verdünnung: 1:500 in 1 x TBS mit 0,3 % BSA	polyklonal, Ziege	Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg Bestellnummer: sc-26481

2.7.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 4: 680LT-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Herkunft
anti-Maus IgG 680LT Verdünnung: 1:12000 in 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Bestellnummer: 926-68020
anti-Kaninchen IgG 680LT Verdünnung: 1:20000 in 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Bestellnummer: 926-68021

Tabelle 5: 800CW-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Herkunft
anti-Maus IgG 800CW Verdünnung: 1:10000 in 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Bestellnummer: 926-32210
anti-Kaninchen IgG 800CW Verdünnung: 1:10000 in 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	LI-COR GmbH, Bad Homburg vor der Höhe Bestellnummer: 926-32211

Tabelle 6: Peroxidase (-HRP) gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G; HRP: *horse-radish peroxidase*

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Herkunft
anti-Maus IgG, HRP- <i>linked</i> Verdünnung: 1:5000 in 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver	IgG-Fraktion aus Pferde-Antiserum	New England Biolabs, Frankfurt am Main Bestellnummer: 7076
anti-Kaninchen IgG, HRP- <i>linked</i> Verdünnung: 1:5000 in 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver	IgG-Fraktion aus Ziegen-Antiserum	New England Biolabs, Frankfurt am Main Bestellnummer: 7074
Mouse TrueBlot® ULTRA: anti-Maus Ig HRP Verdünnung: 1:5000 in 1 x TBS mit 0,5 % (m/V) Magermilchpulver	IgG-Fraktion aus Ratten-Antiserum	Rockland, Gilbertsville, USA Bestellnummer: 18-8817-33

Tabelle 7: Alkalische Phosphatase-gekoppelte Antikörper

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G

Antikörper und Verdünnung	Eigenschaften	Herkunft
anti-Maus IgG, Verdünnung: 1:1000 in 1 x TBS	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Bestellnummer: A 5278
anti-Kaninchen IgG, Verdünnung: 1:1000 in 1 x TBS	affinitätsgereinigt aus Ziegen-Antiserum	Sigma, Taufkirchen Bestellnummer: A 6154

2.8 Geräte

BioRad SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories, München
Blotkammer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Elmi <i>Shaker</i> DRS-12	Ltf – Labortechnik GmbH & Co KG, Wasserburg
ELx800 <i>Absorbance Microplate Reader</i>	Biotek, Bad Friedrichshall
Fusion Version 15.18	Vilber Lourmat, Eberhardzell
<i>Chemiluminescence Imagingsystem</i>	
Gelgießständer (4 Gele)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gilson-Pipetten (1000 µl, 200 µl, 20 µl)	Gilson, Limburg-Offheim
Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
HERAcell 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Horizontal-Elektrophoresekammer	MBT-Brand, Heidelberg
Inverses Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81	Olympus, Hamburg
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Licor Odyssey SA	LI-COR Biotechnology, Bad Homburg
MaxQ 400 Bakterienschüttler	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Consort EV243 Netzgerät	Consort bvba, Turnhout, Belgien
<i>Pipetboy acu</i>	Integra Biosciences, Fernwald
Sicherheitslaborbrenner Fuego SCS basic	WLD-Tec, Göttingen
Sicherheitswerkbank	Integra Biosciences, Fernwald
Sonifier® B250	Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA
Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator GeneFlash	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK

Vacusafe comfort

Vertikal-Elektrophoresekammer (10 x 8 cm)

Vertikal-Elektrophoresekammer (10 x 10,5 cm)

Vertikal-Elektrophoresekammer (14,5 x 9 cm)

Wasserbad

X-Cite 120PC Q (Fluoreszenz-Lichtquelle)

Integra Biosciences, Fernwald

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Hoefer, San Francisco, USA

Biometra, Göttingen

Memmert, Schwabach

Olympus, Hamburg

2.9 Software

CellSens Dimension

Fusion Version 15.18

Gen5 2.00

Microsoft Word 2010

Microsoft PowerPoint 2010

Win_Image StudioFull_5.2.5

Olympus, Hamburg

Vilber Lormat, Eberhardzell

Biotek, Bad Friedrichshall

Microsoft, Unterschleißheim

Microsoft, Unterschleißheim

LI-COR, Bad Homburg

3 Methoden

3.1 Proteinbiochemische Methoden

3.1.1 Proteinexpression in *Escherichia coli*

Für die Expression, Aufreinigung und Detektion der in *E. coli* BL(21)DE3 Bakterien hergestellten Fusionsproteine wurde das Glutathion-S-Transferase (GST)-System verwendet.

3.1.2 Expression und Aufreinigung von GST-Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen

Für die Expression der GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine wurde zunächst eine Bakterienkolonie des transformierten *E. coli* Stammes BL21(DE3), und zwar von BL21(DE3)/pGEX4T1, BL21(DE3)/pGEX4T1/p120ctn(1-234), BL21(DE3)/pGEX4T1/p120ctn(101-234) und BL21(DE3)/pGEX4T1/p120ctn(1A) für 6 h bei 200 *rpm* und 37 °C in 3 ml LB-Ampicillin-Medium im MaxQ 400 Bakterienschüttler (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) inkubiert. Danach wurden 3 ml dieser Kultur in 50-100 ml LB-Amp-Medium überführt und über Nacht bei 200 *rpm* und 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert. Zur Expression der rekombinanten Proteine wurden als nächstes 20 ml der über Nacht-Kultur in 400 ml LB-Amp-Medium überführt und das Wachstum der Bakterien durch Messung der optischen Dichte im Spektrophotometer BioRad SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad Laboratories, München) bei 600 nm (OD_{600nm}) verfolgt. Die Extinktion der Kultur sollte zu Beginn der Kultivierung zwischen 0,1 und 0,3 liegen. Die Kultur wurde bei 30 °C im Bakterienschüttler bis zu einer optischen Dichte von 600 nm (OD_{600nm}) von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Proteinexpression erfolgte für 4 h und 180 *rpm* bei 24 °C im Bakterienschüttler.

Für die Ernte der Bakterienkultur wurde die Kultur für 35 min bei 4696 x g und 4 °C in der Kälzentrifuge Heraeus Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Bakterienpellet nach

Überführung in ein Polypropylen Röhrchen (50ml) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von Bakterienlysaten mit löslichen GST-Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen wurde das Bakterienpellet von 1 l *E. coli*-Kultur in lauwarmem Wasser aufgetaut. Danach wurde das Bakterienpellet in 5 ml p120ctn-Lysispuffer aufgenommen und vollständig resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis viermal für je 30 sec mit dem Ultraschallgerät Sonifier® B-12 (4 x 30 sec, Stufe 6, mittlere Spitze, Branson Sonifier 250A, ohne Pulse) (Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA) behandelt und dazwischen für jeweils 30 sec auf Eis abgekühlt. Danach wurde das Bakterienlysat in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 30 min und 10000 x g in der Kühlzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand mit den löslichen Proteinen abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

p120ctn-Lysispuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5

50 mM NaCl

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

1 mM PMSF

0,1 mg/ml Lysozym

Zur Bestimmung der Menge an löslichen GST-Proteinen durch Bindung an Glutathion-Sepharose wurden 25 µl Glutathion-Sepharose-*Beads* mit 500 µl p120ctn-Lysispuffer durch Zentrifugation bei 2300 x g für 1 min bei 4 °C in der Tischzentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg) gewaschen. Anschließend wurden 25 µl gereinigte Glutathion-Sepharose-*Beads* pro Ansatz in ein Eppli gegeben, mit dem jeweiligen GST-p120ctn Lysat versetzt und mit p120ctn-Lysispuffer auf 500 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 45 min bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*Beads* dreimal mit Waschpuffer gewaschen und dazwischen für jeweils 1 min bei 4 °C und 2300 x g zentrifugiert. Schließlich wurden die *Beads* mit einer Hamiltonspritze trocken gesaugt, mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht. Um die Menge der GST-Proteine ermitteln zu können wurde eine BSA-Standard-Konzentrationsreihe hergestellt. Es wurden vier BSA-Proben

mit 2,5 µg, 5 µg, 10 µg und 20 µg hergestellt, mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht. Die BSA- und GST-Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (siehe Kapitel 3.1.5) aufgetragen, im Gel aufgetrennt und die Proteine anschließend durch Färbung in einer Coomassie-Blau Lösung (siehe Kapitel 3.1.6) sichtbar gemacht. Eine Mengenbestimmung der GST/GST-p120ctn-Fusionsproteine erfolgte durch den Vergleich der Bandenstärke der GST/GST-p120ctn-Fusionsproteine mit der Bandenstärke der BSA-Standard-Konzentrationsreihe.

Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,1 % (V/V) Triton X-100
150 mM NaCl
10 mM MgCl₂
1 µM Aprotinin
2 µM Leupeptin
1 mM PMSF

3.1.3 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden PANC-1-Zellen verwendet, die bis zu einer Konfluenz von 90-95 % in Wachstumsmedium kultiviert worden waren.

Zum Lysieren der Zellen wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 5 ml eiskaltem 1 x TBS gewaschen. Danach wurde 500 µl XPLN-Puffer auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Schalenboden gelöst. Die so gewonnenen Zellen wurden sofort in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und durch sechsmaliges Aufziehen mit einer Spritze (Tuberkulin-Spritze 1 ml; Kanüle Gr. 18, 0,45 x 25 mm) homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate bei 16100 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Die löslichen Proteine im Überstand wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit den unlöslichen Zellbestandteilen verworfen. Im Anschluss wurde die Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.4).

XPLN-Puffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
 0,1 % (V/V) Triton X-100
 200 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 10 µg/ml Aprotinin
 10 µg/ml Leupeptin

3.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration der Proteine in einem Zelllysate wurde mittels *bicinchoninic acid* (BCA) *Protein Assay* kolorimetrisch bestimmt. Cu²⁺ wird dabei in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu Cu⁺ reduziert, welches dann mit BCA einen Komplex bildet. Dieser Komplex kann bei 562 nm photometrisch gemessen werden und die erhaltenen Werte werden mit den Messwerten einer Standardreihe verglichen. Die Standardreihe wird erstellt, indem 0 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg und 12,5 µg BSA einer Proteinstandardslösung (2 mg/ml BSA) mit H₂O auf jeweils 20 µl aufgefüllt werden. Die Probe der Standardreihe ohne BSA dient als Nullwert.

Jede Zelllysate-Probe wurde 1:10 mit H₂O verdünnt. Zur Messung der Extinktion wurden jeweils 20 µl aus der verdünnten Probe in die Wells einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Danach wurden je 180 µl der vorbereiteten BCA-Färbelösung (BCA-Reagenz) in jedes Well gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Extinktion mit dem Photometer ELx800 *Absorbance Microplate Reader* (Biotek, Bad Friedrichshall) bei 562 nm gemessen. Aus der Standardreihe wurde eine Eichgerade ermittelt, anhand derer die Proteinkonzentration errechnet wurde.

BCA-Reagenz:

1 ml BCA-Lösung (BCA Protein Assay Reagent A (Pierce), Thermo Fisher Scientific, Langenselbold)
 4 % (m/V) CuSO₄-Lösung

3.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird ein Gemisch aus Acrylamid, Bisacrylamid und Puffer in Anwesenheit von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zusammengefügt. Durch die Radikalkettenpolymerisation entsteht ein quervernetztes Polyacrylamid-Gel. Der Trennbereich der Proteine ist vom Vernetzungsgrad des Polyacrylamid-Gels abhängig und wird bestimmt durch die Acrylamid-Gesamtkonzentration des Trenngels (z.B. 10 %) und durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid.

Die Zusammensetzung des Trenngels ist in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration in Tabelle 8 angegeben. Die einzelnen Lösungen des Trenngels wurden gemischt und zwischen mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegeben, die durch Abstandshalter einen Abstand von 1 mm hatten. Danach wurde das noch flüssige Trenngel mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach ca. einer Stunde wurde das Isobutanol entfernt, das Trenngel mit Wasser überschichtet über Nacht bei 4 °C auspolymerisiert. Anschließend wurde das Trenngel mit H₂O gewaschen, das Sammelgel (siehe Tabelle 8) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt (10, 12 oder 16 Taschen).

Tabelle 8: Zusammensetzung für SDS-Polyacrylamid-Gele

Stammlösung	10 % Trenngel	12,5 % Trenngel	Sammelgel
	2 Gele (8 x 10 cm)	2 Gele (8 x 10 cm)	2 Gele (8 x 10 cm)
30 % Acrylamid	2,6 ml	3,25 ml	0,38 ml
2 % Bisacrylamid	1 ml	1,2 ml	0,15 ml
3 M Tris pH 8,8	1 ml	1 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	-	0,38 ml
10 % SDS	0,08 ml	0,08 ml	0,03 ml
60 % Saccharose	-	-	0,75 ml
dH ₂ O	3,2 ml	2,45 ml	1,3 ml
TEMED	8 µl	8 µl	4 µl
10 % APS	50 µl	40 µl	35 µl
Trennbereich	130-40 kDa	100-20 kDa	

Es wurden drei verschiedene Gelapparaturen je nach Gel Größe verwendet, wobei alle Systeme die gleiche Trennkapazität von 20-70 µg Protein hatten: a) Gelplatten mit einer Größe von 8 x 10 cm und einem Abstandshalter von 1 mm Dicke. Für das Gel wurde eine Vertikal-Elektrophoresekammer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. b) Gelplatten mit einer Größe von 14,5 x 9 cm und einem 1 mm dickem Abstandshalter, für Vertikal-Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen). c) Gelplatten mit einer Größe von 10 x 10,5 cm, einem 1 mm breiten Abstandshalter und die Vertikal-Elektrophoresekammer (Hoefer, San Francisco, USA).

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit mindestens 20 % (V/V) 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht und dadurch denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Für die Elektrophorese wurde 1 x Tris-Glyzin-Puffer als Trennpuffer verwendet und eine konstante Spannung von 80-120 Volt angeschlossen.

1 x Tris-Glyzin-Puffer:

50 mM Tris/HCl
0,5 M Glyzin
0,1 % (m/V) SDS

5 x SDS-Probenpuffer:

200 mM Tris/HCl; pH 8,8
5 mM EDTA
1 M Saccharose
1 mM DTT
2 % (m/V) SDS
0,1 % (m/V) Bromphenolblau

3.1.6 Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gibt es die Möglichkeit, die im Gel aufgetrennten Proteine mit Coomassie-Blau anzufärben. Dafür wird das Trenngel nach dem Gellauf in ca. 50 ml Coomassie-Blau Färbelösung unter leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Danach wird das Gel in ca. 50 ml Entfärbelösung

gegeben und inkubiert, bis sich der Hintergrund entfärbt hat und nur noch die Proteinbanden deutlich in blau zu erkennen sind.

Färbelösung:

- 0,025 % (m/V) Coomassie® Brilliant Blue R 250
- 10 % (V/V) Essigsäure
- 25 % (V/V) 2-Isopropanol

Entfärbelösung:

- 10 % (V/V) Essigsäure
- 12,5 % (V/V) Isopropanol

3.1.7 Immunblotting von Proteinen (Western Blot)

Eine weitere Möglichkeit nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist es, die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren. Für den Transfer werden zwei Schwämme, zwei Filterpapiere, das Gel, eine Nitrozellulosemembran (Protran BA 85 *Nitrocellulose Transfer Membrane*; GE Healthcare, Freiburg), zwei Filterpapiere, zwei Schwämme in ein Kunststoffgitter eingeklemmt und so in der Blotkammer platziert, dass die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigt. Das Gel, die Schwämme, das Filterpapier und die Nitrozellulosemembran wurden zuvor 10 min in Transferpuffer eingelegt.

Der Transfer der durch das SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulose erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V über den Zeitraum von 50 min.

1 x Transferpuffer:

- 25 mM Tris/HCl; pH 8,3
- 0,1 % (m/V) SDS
- 1,5 % (m/V) Glyzin
- 20 % (V/V) Methanol

3.1.8 Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern

Zur Transferkontrolle der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Blotten für 5 min in 0,2 % (m/V) Ponceau S-Lösung gefärbt und mit destilliertem Wasser teilweise wieder entfärbt. Die Markerbanden wurden auf der Nitrozellulosemembran mit einem Bleistift gekennzeichnet und die Färbung der Membran digital erfasst. Danach wurde die Membran mit 1 x TBS komplett entfärbt. Für 1 h wurde die Membran in 1 x TBS mit 3 % (m/V) BSA (BSA, Serva, Heidelberg) oder in 1 x TBS mit 5 % (m/V) Milchpulver (Milchpulver, Roth, Karlsruhe) inkubiert, wodurch unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper blockiert wurden.

Um immunreaktive Proteine nachzuweisen wurde die Nitrozellulosemembran anschließend mit einem spezifischen primären Antikörper bei 4 °C über Nacht auf einer Wippe inkubiert. Der primäre Antikörper wurde, wie in Kapitel 2.7.1 beschrieben, in 1 x TBS mit 0,3 % (m/V) BSA oder in 0,5 % (m/V) Milchpulver verdünnt. Danach wurde die Membran für jeweils 10 min dreimal mit 1 x TBS gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben verdünnt wurde, erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde dreimal mit 1 x TBS für jeweils 10 min gewaschen. Abhängig von der Modifikation des sekundären Antikörpers wurden unterschiedliche Detektionssysteme verwendet. Die mit CFTM680- bzw. CFTM770-gekoppelten, fluoreszierenden sekundären Antikörper wurden am Licor Odyssey SA System entwickelt. Sekundäre Antikörper mit Koppelung an HRP wurden mit dem SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) bzw. bei sehr schwachen Signalen mit dem ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, Darmstadt) inkubiert und das emittierte Licht mit Hilfe des Fusion SL4-3500.WL Imaging-Systems (Vilber Lourmat, Eberhardzell) nachgewiesen. Erfolgte der Nachweis mit einem alkalischen Phosphatase-gekoppelten Antikörper, so wurde der Protein-Antikörper-Komplex mittels alkalischer Phosphatase in Form einer Farbreaktion nachgewiesen.

Ponceau S-Lösung:

0,2 % (m/V) Ponceau S

3 % (m/V) TCA

3.1.8.1 Nachweis immunreaktiver Proteine durch Chemilumineszenz

Substrate

Zum Nachweis der HRP-gekoppelten Antikörper wurden die beiden ECL-Lösungen 1 und 2 des SuperSignal® *West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) bzw. des Immobilon™ *Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Merck Millipore, Darmstadt) Sets im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Nitrozellulosemembran wurde in dieser Mischung für 2 min inkubiert. Danach wurde die Membran mit Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und die Chemilumineszenz mit Hilfe des Fusion SL4-3500.WL (Vilber Lourmat, Eberhardzell) detektiert.

3.1.8.2 Nachweis immunreaktiver Proteine mittels alkalischer Phosphatase

Die alkalischen Phosphatase-gekoppelten Antikörper wurden nachgewiesen, indem die Nitrozellulosemembran zunächst zweimal mit TBS und danach einmal mit dem AP-Puffer inkubiert wurde, um einen basischen pH-Wert zu erzielen. Danach wurde die Membran in eine Entwicklungslösung gelegt, welche aus jeweils 1 Teil NBT-Lösung (4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 1 Teil BCIP-Lösung (5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit 25 Teilen AP-Puffer besteht. Der Blot verblieb solange in der Entwicklungslösung, bis die Banden gut erkennbar waren, jedoch nicht länger als 30 min. Danach wurde die Entwicklungslösung mit Wasser abgewaschen und die Färbung auf der Membran digital dokumentiert.

AP-Puffer:

50 mM Tris/HCl; pH 9,5

50 mM MgCl₂

NBT-Lösung:

10 mg NBT in 1 ml H₂O, bei -20 °C lagern.

BCIP-Lösung:

10 mg BCIP in 1 ml H₂O, bei -20 °C lagern.

3.1.9 Elution gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Um gebundene Antikörper von der Nitrozellulosemembran zu entfernen wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min in einem Elutionspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal in 200 ml dH₂O für jeweils 10 min und zweimal in 1 x TBS für jeweils 10 min gewaschen. Danach wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h abgesättigt und erneut mit einem primären und sekundären Antikörper inkubiert.

Elutionspuffer:

200 mM Glyzin

500 mM NaCl

pH 2,8

3.1.10 Co-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation von Proteinen wird eingesetzt, um Proteine aus einem Zelllysat mittels spezifischer Antikörper selektiv anreichern zu können. Die spezifischen Antikörper binden über die Immunglobulin-Fc-Bindungsstelle (Fc: *fragment crystallizable*) an Protein A oder Protein G. Protein A und G sind zur Sedimentation an Agarose-*Beads* gebunden und werden über Zentrifugation aus der Proteinlösung sedimentiert.

3.1.10.1 Co-Immunpräzipitation von EGFP-Rho-Fusionsprotein mit GST-p120ctn unter Verwendung von anti-GST-μMACS-*Beads*

Um die Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC zu analysieren wurden GST-p120ctn-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, die Bakterien lysiert und die löslichen Proteine mit den anti-GST-μMACS-*Beads* aus dem μMACS™ *anti-GST Epitope Tagged Protein Isolation Kit* (Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach) inkubiert. Mit diesem System können Protein-Protein-Komplexe isoliert werden, indem GST-Proteine und assoziierte Proteine durch Zugabe von anti-GST-Antikörper-haltigen paramagnetischen *MicroBeads* präzipitiert und mit Hilfe von μMACS *Column* (Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach) gereinigt werden. Die Säulen befinden sich in einem magnetischen Feld, wodurch die paramagnetischen *MicroBeads* in der Säule gebunden werden.

Die *E. coli* GST-p120ctn-Lysate wurden mit 25 μ l anti-GST- μ MACS-*Beads* zusammengefügt, mit Lysispuffer auf mindestens 1 ml aufgefüllt und für 1 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. In diesem Versuchsschritt bindet der spezifische Antikörper der anti-GST- μ MACS-*Beads* an das GST der GST-p120ctn-Fusionsproteine. Anschließend wurden Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen hinzugegeben und für 1 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. Diese Inkubation hatte das Ziel, Komplexe mit GST-p120ctn-Protein zu erhalten, die weiterführend isoliert werden können.

Pro Ansatz wurde eine μ MACS *Column* in das magnetische Feld eines μ MACS-Magneten platziert und mit 200 μ l Lysispuffer äquilibriert. Danach wurde jeweils eine Probe auf eine μ MACS *Column* luftblasenfrei gegeben. Die magnetischen anti-GST- μ MACS-*Beads* mit dem Protein-Protein-Komplex wurden durch das Feld des μ MACS-Magneten in die μ MACS *Column* fixiert. Anschließend wurde die Säule viermal mit 200 μ l XPLN-Puffer und einmal mit 100 μ l Waschpuffer 2 gewaschen, um Detergenzien und Salze zu entfernen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden zunächst 20 μ l 95 °C heißer Elutionspuffer auf die μ MACS Säule gegeben und für 5 min inkubiert. Durch Zugabe von 50 μ l oder weniger 95 °C heißem Elutionspuffer erfolgte dann die Elution der Proteine. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen, mit mindestens 20 % (V/V) 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht. Die eluierten Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und danach erfolgte ein Westernblot wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben.

Lysispuffer:

- 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 0,1 % (V/V) Triton X-100

XPLN-Puffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
 10 mM MgCl₂
 200 mM NaCl
 0,1 % (V/V) Triton X-100
 10 µg/ml Aprotinin
 10 µg/ml Leupeptin

Waschpuffer 2:

20 mM Tris/HCl, pH 7,5

Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 6,9
 50 mM DTT
 1 % (m/V) SDS
 1 mM EDTA
 10 % (V/V) Glycerin
 0,005 % (m/V) Bromphenolblau

3.1.10.2 Co-Präzipitation von EGFP-Rho-Fusionsprotein mit GST-p120ctn**unter Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads**

Der Nachweis einer Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen EGFP-RhoA und EGFP-RhoC erfolgte in diesem Versuchsansatz mit Hilfe der Präzipitation von GST-p120ctn mit Glutathion-Sepharose-Beads. Durch die hohe Affinität von GST an die Glutathion-Sepharose-Beads wurden die GST-p120ctn-Fusionsproteine gebunden und immobilisiert. Anschließend wurden EGFP-Rho-Fusionsproteine hinzugefügt, um diese an p120ctn zu binden. Der dadurch entstandene Protein-Protein-Komplex konnte mit Hilfe der Glutathion-Sepharose-Beads präzipitiert und durch Waschen gereinigt werden.

Vor diesen Versuchen wurden Zelllysate von EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, hergestellt.

Die Glutathion-Sepharose-Beads wurden durch Zugabe von 500 µl XPLN-Puffer gewaschen, die Beads für 1 min bei 4 °C und 4696 x g in der Tischzentrifuge 5415R

(Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und danach der Überstand vorsichtig von den *Beads* abgenommen.

Um Proteine aus den EGFP-Rho-Lysaten zu entfernen, die unspezifisch an die Glutathion-Sepharose-*Beads* binden, wurden die EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Lysate pro Ansatz mit 25 µl gereinigten Glutathion-Sepharose-*Beads* versetzt und der Ansatz mit XPLN-Puffer auf mindestens 500 µl aufgefüllt. Danach wurden die Proben für 1 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert, der Überstand mit den EGFP-Rho-Fusionsproteinen abgenommen und für die Inkubation an den Glutathion-Sepharose-*Beads* der immobilisierten GST-p120ctn-Proteine verwendet.

Um die *E. coli* GST-p120ctn-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose-*Beads* zu binden wurden die *E. coli* GST-p120ctn-Lysate pro Ansatz mit 25 µl gereinigten Glutathion-Sepharose-*Beads* versetzt und mit XPLN-Puffer auf mindestens 500 µl aufgefüllt. Danach wurden die Proben für 1 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert, wodurch die *E. coli* GST-p120ctn-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose-*Beads* binden konnten. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-*Beads* durch Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 800 x g sedimentiert und die *Beads* weiterverwendet. Der Überstand mit den Proteinen, die nicht an die Glutathion-Sepharose-*Beads* gebunden hatten, wurde verworfen.

Zu dem Überstand der EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteine wurden die *Beads* mit den gebundenen GST-p120ctn-Fusionsproteinen gegeben und die Ansätze für 2 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. Diese Inkubation hatte das Ziel, die EGFP-Rho-Proteine an das GST-p120ctn-Fusionsprotein und somit auch an Glutathion-Sepharose-*Beads* zu binden.

Nach der Inkubation wurden die *Beads* viermal mit 1 ml XPLN-Puffer gewaschen und dazwischen jeweils zentrifugiert für 1 min bei 4 °C und 800 x g. Zwischen den Waschschritten wurden die *Beads* für jeweils 10 min bei 4 °C im Überkopf-Rotor gewaschen. Durch das Waschen sollten Detergenzien und Salze entfernt werden. Nach dem letzten Waschschriff wurden die *Beads* für 1 min bei 4 °C und 800 x g sedimentiert. Schließlich wurden die *Beads* mit einer Hamiltonspritze trocken gesaugt, mit mindestens 20 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock

aufgekocht. Die fertigen Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, danach erfolgten der Gellauf und anschließend ein Westernblot.

XPLN-Puffer:

20 mM HEPES, pH 7,4
10 mM MgCl₂
200 mM NaCl
0,1 % (V/V) Triton X-100
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

RacRIPA-Puffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM MgCl₂
150 mM NaCl
1 % (V/V) Triton X-100
0,1 % (m/V) SDS
1 mM PMSF
1 % Proteaseinhibitor-Mix

PAK-Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,2
150 mM NaCl
10 mM MgCl₂
0,1 % (V/V) Triton X-100
1 mM PMSF
1 % Proteaseinhibitor-Mix

Proteaseinhibitor-Mix:

0,25 mg/ml Pefabloc
50 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (STI)
1 µg/ml Aprotinin
1 µg/ml Leupeptin

Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 6,9
 50 mM DTT
 1 % (m/V) SDS
 1 mM EDTA
 10 % (V/V) Glycerin
 0,005 % (m/V) Bromphenolblau

3.1.10.3 Co-Immunpräzipitation von EGFP-Rho-Fusionsprotein mit GST-p120ctn mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers und Protein G-Agarose

Für die Untersuchung der Interaktion der Rho-GTPasen RhoA und RhoC mit p120ctn wurden in diesem Versuchsansatz die EGFP-Rho-Fusionsproteine immunpräzipitiert und danach mit *E. coli* GST-p120ctn-Lysaten inkubiert.

Zu den Zelllysaten mit EGFP-, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC wurden jeweils 25 µl Protein A-Agarose (Roche, Mannheim) und 3 µl Maus IgG2a (DakoCytomation, Hamburg) hinzugegeben, mit GST-p120ctn-Lysispuffer auf 1 ml aufgefüllt und 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Durch dieses Vorgehen werden unspezifische Bindungsproteine präzipitiert, die an Protein A-Agarose *Beads* und/oder an IgG binden. Danach wurden die Proben 1 min bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert (Heraeus Labofuge 400, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), der Überstand abgenommen und die Protein A-Agarose *Beads* verworfen.

Zum gewonnenen Überstand wurden erneut 25 µl Protein A-Agarose und 0,8 µg Kaninchen GFP-Antikörper (Santa Cruz Biotech. Inc., Heidelberg) hinzugegeben und erneut für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Protein A-Agarose *Beads* dreimal mit jeweils 1 ml GST-p120ctn-Lysispuffer gewaschen und dazwischen zentrifugiert für 1 min bei 4 °C und 800 x g, wodurch die *Beads* sedimentiert wurden. In diesem Versuchsschritt bindet der Kaninchen GFP-Antikörper an das EGFP der EGFP-Rho-Fusionsproteine und an die Protein A-Agarose *Beads*.

Die *E. coli* GST-p120ctn-Lysate wurden mit 25 µl Protein A-Agarose und 3 µl Maus IgG2a 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert und danach für 1 min bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde weiterverwendet und die *Beads*, die mögliche unspezifische Bindungsproteine gebunden hatten, verworfen.

Zu den Protein A-Agarose *Beads* mit den gebundenen EGFP-, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC Proteinen wurde der Überstand der *E. coli* GST-p120ctn-Lysate hinzugefügt. Die Co-Immunpräzipitation der GST-p120ctn Proteine erfolgte für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C. Anschließend wurden die Agarose-*Beads* viermal mit 0,5 ml Castano-Puffer gewaschen und dazwischen jeweils für 1 min bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert. Danach wurden die Agarose-*Beads* trocken gesaugt und in 25 µl 5 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht. Die fertigen Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, danach erfolgten der Gellauf und anschließend ein Westernblot.

GST-p120ctn-Lysisbuffer:

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 5 mM MgCl₂
- 50 mM NaCl
- 1 mM DTT (vor Gebrauch dazugeben)
- 10 µg/ml Aprotinin
- 10 µg/ml Leupeptin

Castano-Puffer:

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,3
- 3 mM MgCl₂
- 150 mM NaCl
- 0,1 % (V/V) Triton X-100
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT

Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 6,9
 50 mM DTT
 1 % (m/V) SDS
 1 mM EDTA
 10 % (V/V) Glycerin
 0,005 % (m/V) Bromphenolblau

3.1.10.4 Co-Immunpräzipitation von GST-p120ctn mit HA-Rho-

**Fusionsprotein mit Hilfe eines anti-HA Antikörpers und Protein G-
 Agarose**

Für diesen Versuchsansatz wurden Zelllysate von HEK293 und HA-RhoA- und HA-RhoC-exprimierende HEK293-Zellen verwendet.

Zu 30 µl Protein G-Agarose (Roche, Mannheim) wurden 75 µl Hybridoma-Überstand mit anti-HA (12CA5) Antikörper hinzugegeben, mit GST-p120ctn-Lysispuffer auf 0,5 ml aufgefüllt und 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit 0,5 ml Castano-Puffer gewaschen und zwischendurch jeweils 1 min bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert im Heraeus Labofuge 400 (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Der Überstand wurde verworfen und die Protein G-Agarose *Beads* weiterverwendet.

Zu den Protein G-Agarose *Beads* wurden die Zelllysate von HEK293, HA-RhoA und HA-RhoC hinzugegeben und für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit 0,5 ml Castano-Puffer gewaschen und zwischendurch jeweils 1 min bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protein G-Agarose *Beads* weiterverwendet.

Danach wurden zu den Protein G-Agarose *Beads* die *E. coli* GST-p120ctn-Lysate hinzugegeben und für 2 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Agarose-*Beads* viermal mit 0,5 ml Castano-Puffer gewaschen und dazwischen jeweils für 1 min bei 4 °C und 800 x g zentrifugiert. Als nächstes wurden die Agarose-*Beads* trocken gesaugt, in 25 µl 5 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei

95 °C im Heizblock aufgekocht. Die fertigen Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, danach erfolgten der Gellauf und anschließend ein Westernblot.

GST-p120ctn-Lysispuffer:

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 5 mM MgCl₂
- 50 mM NaCl
- 1 mM DTT (vor Gebrauch dazugeben)
- 10 µg/ml Aprotinin
- 10 µg/ml Leupeptin

Castano-Puffer:

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,3
- 3 mM MgCl₂
- 150 mM NaCl
- 0,1 % (V/V) Triton X-100
- 1 mM EDTA
- 1 mM DTT

3.1.10.5 Co-Immunpräzipitation von GST-p120ctn mit gereinigtem GST-

Rho-Fusionsprotein mit Hilfe eines Rho-Antikörpers und Protein A

µMACS-Beads

Im folgenden Versuchsansatz wurden gereinigte rekombinante GST, GST-RhoA und GST-RhoC Proteine verwendet, die von K. Giehl zur Verfügung gestellt wurden, sowie *E. coli* Lysate, die GST und GST-p120ctn Fusionsproteine enthielten.

Zu den von K. Giehl zur Verfügung gestellten und gereinigten GST-Rho Proben wurden 2 µl anti-Rho(-A, -B, -C) Antikörper (Upstate, New York, USA) hinzugegeben, mit Lysispuffer 2 auf 300 µl aufgefüllt und 30 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert. Durch diesen Versuchsschritt sollten die GST-Rho-Fusionsproteine an den Rho-Antikörper gebunden werden. Danach wurden GST-, GST-p120ctn(101-234)-, GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A)-haltige Lysate aus *E. coli* hinzugefügt und für 1 h im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert, um eine Bindung zwischen p120ctn und Rho

zu ermöglichen. Anschließend wurde jeder Versuchsansatz mit 30 µl Protein A µMACS-Beads für 30 min im Überkopf-Rotor bei 4 °C inkubiert, um den Protein-Protein-Komplex an die Protein A µMACS-Beads zu binden.

Pro Ansatz wurde eine µMACS Column in das magnetische Feld eines µMACS-Magneten platziert und mit 200 µl Lysispuffer 2 äquilibriert. Danach wurde jeweils eine Probe auf eine µMACS Column luftblasenfrei gegeben. Die magnetischen Protein A µMACS-Beads mit dem Protein-Protein-Komplex wurden durch das Feld des µMACS-Magneten in die µMACS Column fixiert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 300 µl Lysispuffer 2, zweimal mit 300 µl Waschpuffer 1 und zweimal mit 200 µl Waschpuffer 2 gewaschen, um Detergenzien und Salze zu entfernen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden zunächst 20 µl 95 °C heißer Elutionspuffer auf die µMACS Säule gegeben und für 5 min inkubiert. Durch Zugabe von 40 µl 95 °C heißem Elutionspuffer erfolgte dann die Elution der Proteine. Das Eluat wurde mit mindestens 20 % (V/V) 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 6 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht. Die eluierten Proteine wurden in einem 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und danach erfolgte ein Westernblot wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben.

Lysispuffer 2:

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 50 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT
- 1 mM PMSF

Waschpuffer 1:

- 50 mM Tris, pH 8,0
- 150 mM NaCl
- 1 % (V/V) NP40
- 0,5 % (V/V) Natriumdeoxycholat
- 0,1 % (m/V) SDS

Waschpuffer 2:

- 20 mM Tris/HCl, pH 7,5

Elutionspuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 6,8
50 mM DTT
1 % (m/V) SDS
1 mM EDTA
10 % (V/V) Glycerin
0,005 % (m/V) Bromphenolblau

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen des Pankreaskarzinoms PANC-1 wachsen adhärent. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank (Integra Biosciences, Fernwald) und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium (*Dulbecco's-Modified Eagle Medium* (DMEM), Life Technologies, Darmstadt) mit Zusätzen (siehe Kapitel 2.5.2) bei 37 °C, 10 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % in einem CO₂-Inkubator (HERAcell 150i CO₂-Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) kultiviert. Zur Kultivierung der Zellen wurden 100 mm-Zellkulturschalen und 8-10 ml Wachstumsmedium verwendet. Alle 2-3 Tage wurde das Wachstumsmedium erneuert. Nachdem die Zellen eine konfluente Zellschicht erreicht hatten wurden sie durch Passagieren auf neue Kulturschalen verteilt.

3.2.2 Passagieren von Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung

Die adhärennten PANC-1-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und danach durch Passagieren auf neue 100 mm-Zellkulturschalen verteilt. Zum Passagieren wurde zuerst das Wachstumsmedium entfernt. Danach wurden die Zellen mit 7 ml 1 x CMF-PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Groningen, Niederlande) für 5-7 min bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator inkubiert, wodurch die bestehenden Zell-Zell-Kontakte und die Zell-Matrix-Kontakte gelöst wurden. Dieser Ablösungsprozess wurde durch Zugabe von 5 ml Wachstumsmedium gestoppt. Die Zellen wurden vorsichtig von der Schale gespült und in ein steriles 15 ml-Polypropylenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen

2,5 min bei 800 x g sedimentiert (Heraeus Labofuge 400, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Der Überstand wurde abgesaugt und die abgesetzten Zellen wurden mit 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung auf neue 100 mm-Zellkulturschalen verteilt.

Das Wachstumsmedium und die 1 x CMF-PBS-Lösung wurden vorher im Wasserbad (Memmert, Schwabach) auf 37 °C erwärmt. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde bei Zimmertemperatur verwendet.

3.2.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Um die Zellzahl der Zellen bestimmen zu können wurden diese wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Schalenboden gelöst, durch Zentrifugation sedimentiert und in Wachstumsmedium resuspendiert. Danach wurden 10 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt und die Anzahl der Zellen in einem der vier großen Quadrate mit dem Volumen von 0,1 mm bzw. 1×10^{-4} ml mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml Medium}$$

Aus dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Bestimmungen wurde dann die Zellzahl bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen

4.1.1 Nachweis der Expression von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Expression von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC wurden humane PANC-1-Pankreaskarzinomzellen verwendet, die EGFP und EGFP-Rho-Fusionsproteine dauerhaft und grünfluoreszierend exprimierten. Die stabil exprimierenden Zelllinien PANC-1-EGFP Klon 21 (EGFP 21), PANC-1-EGFP-RhoA Klon 7 (EGFP-RhoA 7) und PANC-1-EGFP-RhoC Klon 3 (EGFP-RhoC 3) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Giehl durch Selektion mit G418-haltigem Wachstumsmedium hergestellt (Dietrich *et al.*, 2009). Die Zellen wurden mit Fluoreszenzlicht mit Wellenlängen um 488 nm angeregt und die Emission bei 507 nm detektiert. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Expression und Lokalisation der EGFP-Proteine und EGFP-Rho-Fusionsproteine in den Zellen festgestellt werden. Die Morphologie der Zellen wurde mit Phasenkontrast-Analysen untersucht. Zur Kontrolle wurden parenterale PANC-1-Zellen benutzt.

Repräsentative Fluoreszenzmikroskopie- und Phasenkontrast-Aufnahmen sind in Abbildung 11 dargestellt. Hier ist die Expression und Morphologie von EGFP-, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in lebenden PANC-1-Zellen erkennbar.

Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die Morphologie der EGFP/EGFP-Rho-exprimierenden Zellen (A-C), die zum Zeitpunkt der Aufnahmen konfluent gewachsen waren. In den Abbildungen A-C ist ein epithelialer Phänotyp mit rundlicher bis leicht länglicher Zellmorphologie zu erkennen. In Abbildung A'-C' sind korrespondierende Fluoreszenzaufnahmen dargestellt, die die Expression von EGFP in den Zellen durch die grüne Fluoreszenz zeigen. Die Abbildung A' verdeutlicht, dass die exprimierten EGFP-Proteine im Zellkern und im gesamten Zytosol diffus verteilt vorliegen. Die exprimierten EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-Fusionsproteine (B' und C') befinden sich

hingegen im Zytosol und in der Zellmembran, hingegen ist der Zellkern weitestgehend frei von EGFP-Rho-Fusionsproteinen.

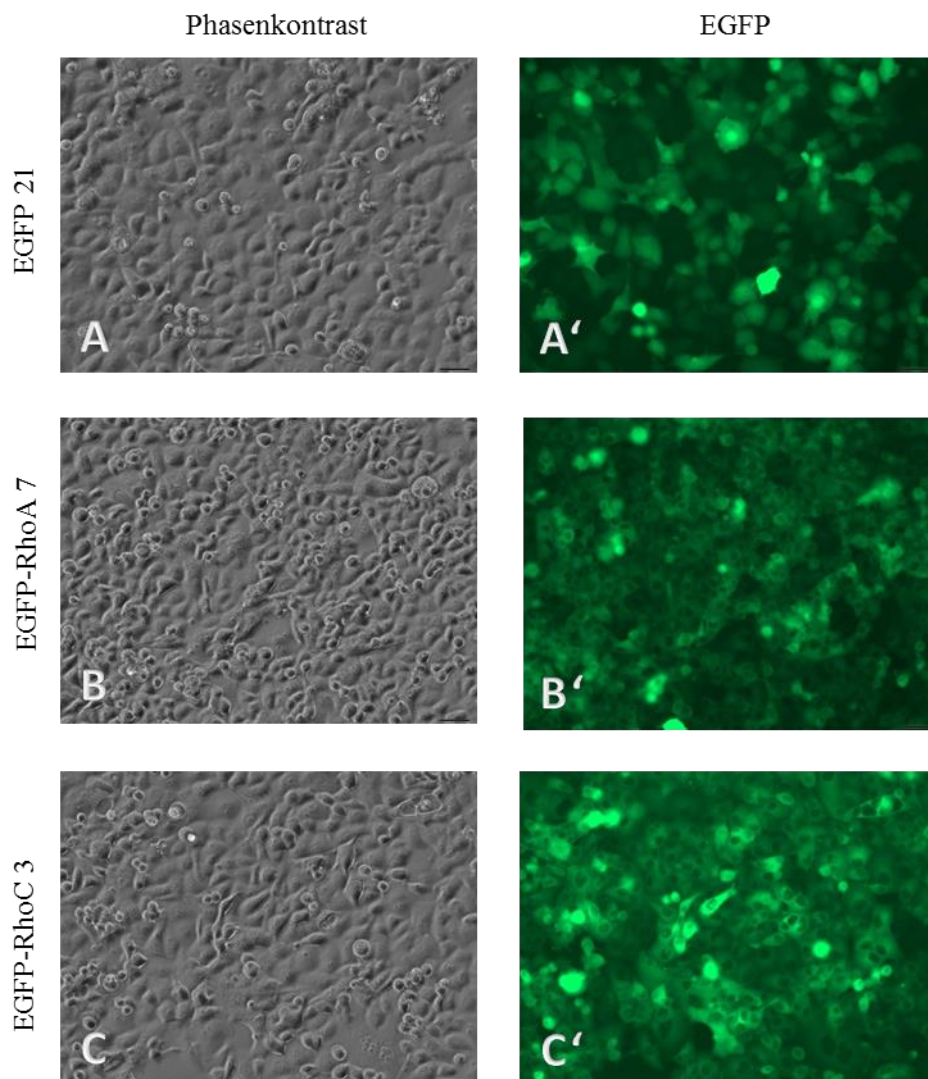


Abbildung 11: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen von lebenden EGFP-, EGFP-RhoA-, und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Dargestellt sind die Phasenkontrastaufnahmen (A-C) und die entsprechenden EGFP-Fluoreszenzaufnahmen (A'-C') von EGFP-exprimierenden PANC-1-Zellen des Klons 21, von EGFP-RhoA-exprimierenden PANC-1-Zellen des Klons 7 und von EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen des Klons 3. Die Proteine wurden mit Fluoreszenzlicht bei Wellenlängen um 488 nm angeregt und die Emission bei 507 nm detektiert. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die Morphologie der Zellen, die Fluoreszenzaufnahmen die Verteilung der exprimierten EGFP-Proteine bzw. EGFP-Rho-Fusionsproteine in den Zellen. Die Zellen wurden mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

4.1.2 Nachweis der Expression von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in PANC-1-Zellen im Immunblotverfahren

Um die Expression der Proteine EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC und ihre relativen Mengen in den stabil exprimierenden PANC-1-Zellen zu untersuchen, wurden Immunblots angefertigt.

Dafür wurden PANC-1-Zellen, die EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC stabil exprimieren, in Wachstumsmedium mit 1 mg/ml G418 bis zur Konfluenz kultiviert. Danach wurden die Zellen in XPLN-Puffer, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, lysiert und das so erzeugte Gesamtzelllysat in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der EGFP-Proteine und der EGFP-Rho-Fusionsproteine erfolgte im Immunblotverfahren. Für das Immunblotverfahren wurde ein monoklonaler Maus anti-GFP-Antikörper als primärer und ein anti-Maus IgG 800CW als sekundärer Antikörper verwendet. Die jeweiligen Proteinpräparationen wurden unabhängig voneinander hergestellt.

Der in Abbildung 12 dargestellte Immunblot zeigt exemplarisch die Expression der EGFP-Proteine und der EGFP-Rho-Fusionsproteine. Das EGFP-Protein ist bei einem Molekulargewicht von 29 kDa, die EGFP-Rho-Fusionsproteine sind bei einem Molekulargewicht von 50 kDa nachweisbar, was den errechneten apparenten Molekulargewichten entspricht.

Im dargestellten Immunblot wurden 2 µg Gesamtzelllysat von EGFP und jeweils 50 µg Gesamtzelllysat von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Ein Vergleich der Bandenstärken ergibt, dass EGFP-RhoA im Vergleich zu EGFP-RhoC deutlich schwächer exprimiert wurde. Die Expression des eingesetzten EGFP-Proteins entspricht in etwa der Expression des EGFP-RhoA. Da 2 µg Gesamtzelllysat von EGFP und 50 µg von EGFP-RhoA eingesetzt wurden, sind die EGFP-Proteine etwa 25 x mehr im PANC-1-Lysat vorhanden als die EGFP-RhoA-Proteine.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe des Immunblotverfahrens gezeigt werden, dass unterschiedliche Mengen von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC im Gesamtzelllysat von stabil exprimierenden PANC-1-Zellen nachweisbar sind. Für den Einsatz von

vergleichbaren Mengen EGFP bzw. EGFP-Rho-Proteinen muss die Lysatmenge in den Interaktionsstudien entsprechend angepasst werden.

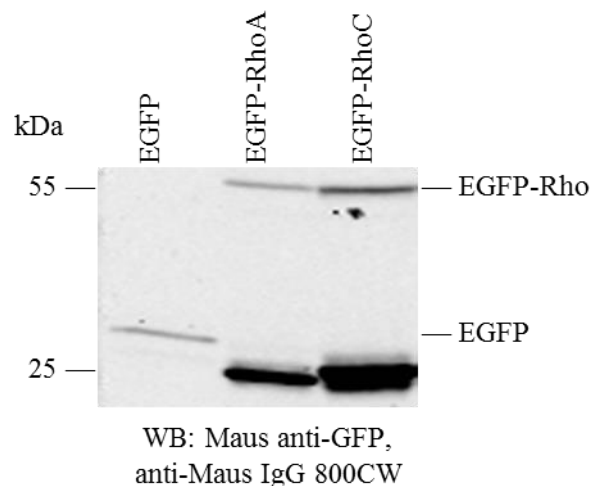


Abbildung 12: Nachweis der Expression von EGFP-Proteinen und EGFP-Rho-Fusionsproteinen in EGFP-, EGFP-RhoA-, und EGFP-RhoC-exprimierenden PANC-1-Zellen. Zur Analyse der Expression von EGFP und EGFP-Rho-Fusionsproteinen wurden 2 µg EGFP und jeweils 50 µg EGFP-RhoA und EGFP-RhoC Zelllysat in einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Analyse der Proteine erfolgte im Immunblotverfahren. Nachgewiesen wurden die EGFP-Proteine und EGFP-Rho-Fusionsproteine mit einem primären monoklonalen Anti-GFP-Antikörper (Roche) und einem sekundären anti-Maus IgG 800CW Antikörper im Licor Odyssey SA System. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.2 Interaktion von GST-p120ctn mit Rho-Fusionsproteinen

Die Interaktion von p120ctn mit Rho-GTPasen wurde in der Literatur von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Anastasiadis *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001; Magie *et al.*, 2002; Noren *et al.*, 2000; Castano *et al.*, 2007). Diese Interaktion wird im Zusammenhang mit der Entstehung und Metastasierung von Tumorzellen diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde vor diesem Hintergrund eine mögliche differentielle Interaktion der Rho-GTPasen RhoA und RhoC mit p120ctn untersucht. Außerdem war es das Ziel, die Bindungsdomäne von p120ctn an RhoA und RhoC einzugrenzen, deshalb wurden verschiedene Deletionsmutanten von p120ctn verwendet, siehe Kapitel 1.3.1. Für die Interaktionsstudien wurden mit *E. coli* exprimierte GST-Fusionsproteine und EGFP-Rho-haltige PANC-1-Lysate verwendet.

4.2.1 Expression und Anreicherung von GST-Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen in *E. coli*

Für die Expression von GST-Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21(DE3) wurden folgende Bakterienkolonien verwendet: BL21(DE3)/pGEX4T1, BL21(DE3)/pGEX4T1/p120ctn(101-234), BL21(DE3)/pGEX4T1/p120ctn(1-234) und BL21(DE3)/pGEX4T1/p120ctn(1A). Diese wurden in einer Über-Nacht-Kultur, siehe Kapitel 3.1.2, angezüchtet. Die verschiedenen Deletionsmutanten von p120ctn wurden in Kapitel 1.3.1 ausführlich beschrieben.

Die Proteinexpression der GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine wurde nach Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und für 4 h und 160 rpm bei 24 °C durchgeführt. Für die Anreicherung der GST-Proteine wurden die Bakterien in p120ctn-Lysispuffer aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen. Zur anschließenden semiquantitativen Bestimmung der GST-Proteine in den Lysaten wurden die GST-Proteine und die GST-p120ctn-Fusionsproteine mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase-Anteils an das Glutathion der Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt und danach auf ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde eine BSA-Standard-Konzentrationsreihe parallel im Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.1.4). Die Proteine im Gel wurden durch Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht. In Abbildung 13 sind exemplarisch die GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine in einer von vier Proteinpräparationen dargestellt. Anhand der blau angefärbten Proteine des SDS-Polyacrylamid-Gels konnte die Menge und das Verhältnis der GST-Proteine und der GST-p120ctn-Proteine zueinander und im Vergleich zur BSA-Standard-Konzentrationsreihe abgeschätzt werden, die in den folgenden *in vitro*-Bindungsexperimenten eingesetzt wurden.

In Abbildung 13 zeigt sich, dass GST-p120ctn(Aminosäuren 101-234) und GST-p120ctn(Aminosäuren 1-234) in vergleichbarer Menge exprimiert wurden, sowie 4-mal stärker als GST und 6-mal stärker als GST-p120ctn(1A) im Lysat vorhanden bzw. durch die Bindung an Glutathion-Sepharose-Beads präzipitiert wurden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) in unterschiedlichen Mengen exprimiert wurden. Auch bei den GST-

Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen muss die in den Interaktionsstudien eingesetzte Lysatmenge entsprechend angepasst werden.

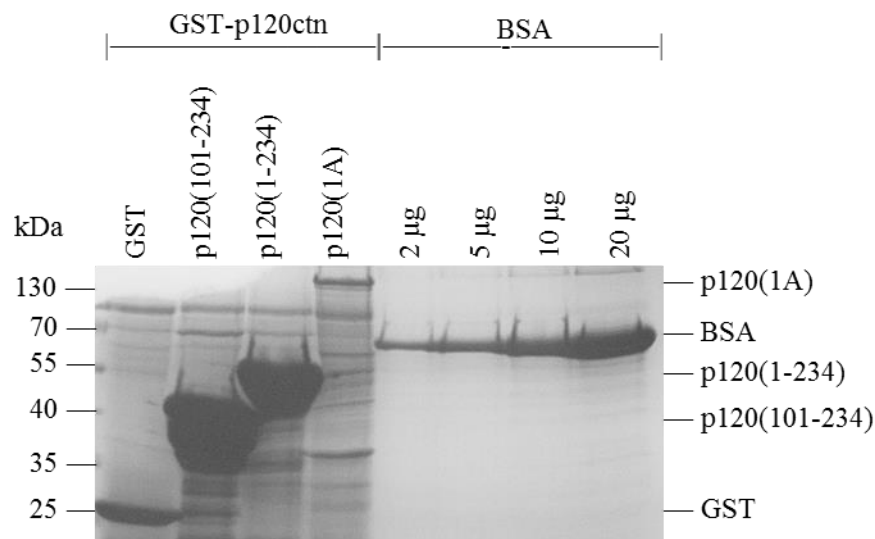


Abbildung 13: Nachweis der Expression und Anreicherung von GST-Proteinen und GST-p120ctn-Fusionsproteinen aus *E. coli*. GST und die GST-p120ctn-Fusionsproteine (p120) GST-p120ctn(101-234) (p120(101-234)), GST-p120ctn(1-234) (p120(1-234)) und GST-p120ctn(1A) (p120(1A)) wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Proteine wurden für 45 min an Glutathion-Sepharose-Beads gebunden und danach auf ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Um die Menge der GST-p120ctn-Fusionsproteine zu bestimmen wurden in demselben Gel 2, 5, 10 und 20 µg BSA aufgetrennt. Abschließend wurde eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Ein Proteinstandard ist links markiert.

4.2.2 Co-Immunpräzipitation von EGFP-RhoC mit GST-p120

Cateninen mit Hilfe des anti-GST-µMACS-Systems

Um die Interaktion von p120ctn mit RhoC zu untersuchen, wurden zunächst Bindungsstudien mit GST, GST-p120ctn(101-234), GST-p120ctn(1-234) und EGFP-RhoC unter Verwendung von anti-GST-µMACS-Beads durchgeführt. Eingesetzt wurden EGFP-Rho-Fusionsproteine, die wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, in PANC-1-Zellen exprimiert wurden. Die Kultivierung der PANC-1-Zellen fand bis zu einer Konfluenz von 90-95 % statt, danach wurden Zelllysate in XPLN-Puffer hergestellt (Kapitel 3.1.3). Die Expression der GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine erfolgte wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben in *E. coli*.

Die *E. coli* GST- bzw. GST-p120ctn-haltigen Lysate wurden mit anti-GST- μ MACS-*Beads* inkubiert, wodurch die GST bzw. GST-p120ctn-Proteine über den Glutathion-S-Transferase-Anteil an den spezifischen Antikörper der anti-GST- μ MACS-*Beads* gebunden wurden. Hierdurch konnten die GST-p120ctn-Fusionsproteine immobilisiert und angereichert werden. Danach wurden die EGFP-RhoC-haltigen PANC-1-Lysate hinzugegeben und der Ansatz für 1 h inkubiert, um eine mögliche Interaktion des Rho-Anteils der Rho-Fusionsproteine an das p120ctn zu erreichen und später analysieren zu können. Anschließend wurde jeder Ansatz auf ein μ MACS *Column* aufgetragen und die μ MACS *Column* wie in Kapitel 3.1.10.1 beschrieben behandelt. So konnte die Menge an mit GST-p120ctn co-präzipitiertem EGFP-RhoC analysiert werden. Um zu kontrollieren, dass in jedem Versuchsansatz die gleiche Menge EGFP-Rho-Fusionsprotein eingesetzt wurde, wurde die Menge von EGFP-RhoC in jedem eingesetzten PANC-1-Lysat im Immunblot bestimmt. Zusätzlich wurden aus jedem *E. coli*-Lysat mit GST-Protein und GST-p120ctn-Fusionsprotein ein Aliquot entnommen, um die in den *E. coli*-Lysaten enthaltenen und im Versuch eingesetzten Mengen der GST-Proteine und GST-p120ctn Fusionsproteine zu überprüfen. Um unspezifische Bindungen der EGFP-Rho-Fusionsproteine an das GST ausschließen zu können wurde eine Kontrolle mitgeführt, die GST und EGFP-RhoC enthielt. Zur Kontrolle des immunpräzipitiertem GST bzw. GST-p120ctn wurde aus jedem Eluat 1/10 Eluatmenge abgenommen. Alle Ansätze und Kontrollen wurden auf 12,5 %ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen und danach im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der EGFP-Rho-Fusionsproteine erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper. Der Nachweis der GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine wurde mit einem anti-GST-Antikörper durchgeführt.

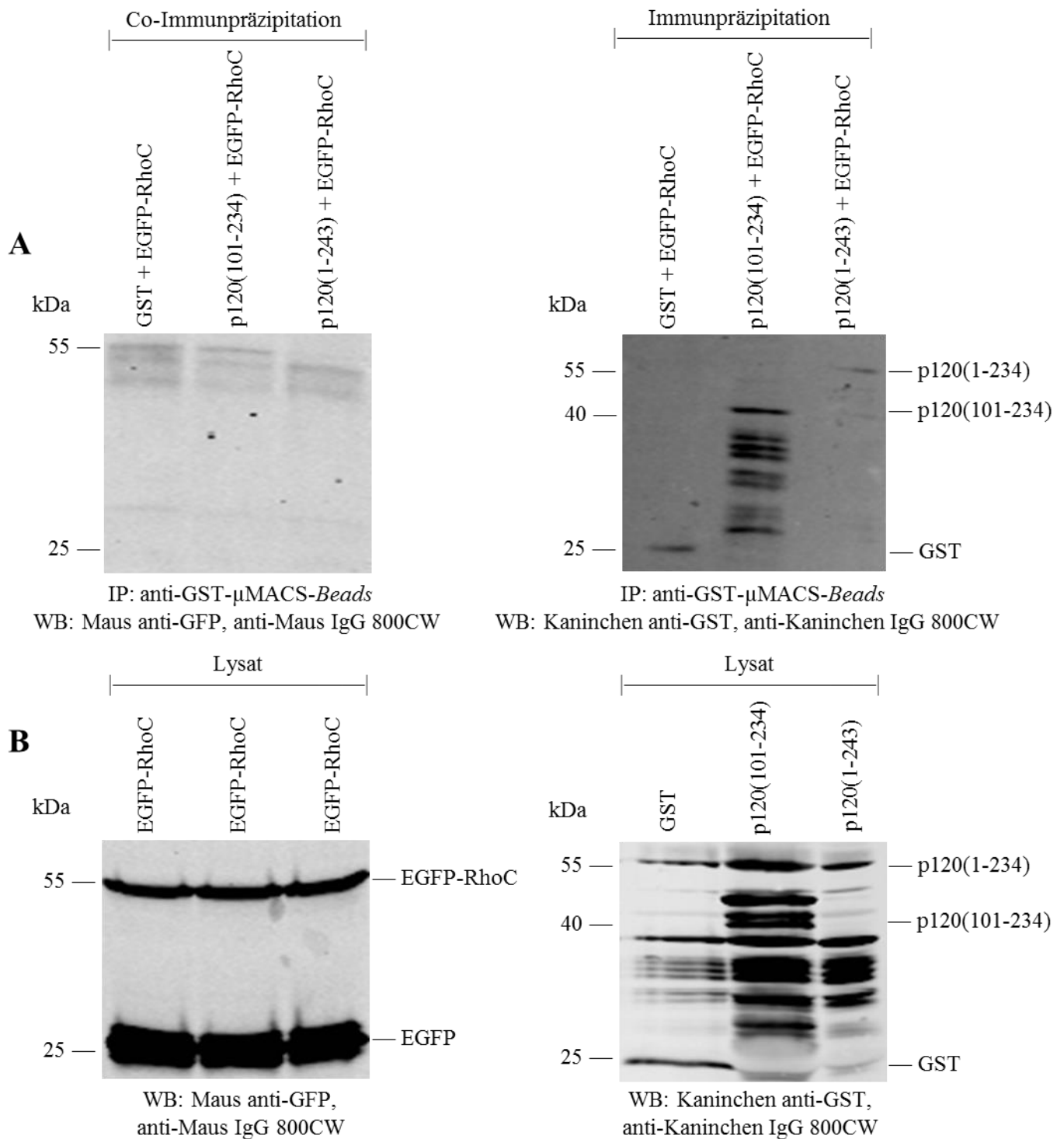


Abbildung 14: Interaktionsanalyse von EGFP-RhoC-Fusionsproteinen mit GST-Proteinen und GST-p120ctn-Proteinen unter Verwendung von GST- μ MACS-Beads. Zum Nachweis der Interaktion von GST-p120ctn Deletionsmutanten mit EGFP-Rho-Fusionsproteinen wurden mittels anti-GST- μ MACS-Beads GST-Protein-Protein-Komplexe immunpräzipitiert. Für die Ansätze wurden *E. coli*-Lysate mit rekombinantem GST, GST-p120ctn(101-243) [p120(101-234)] und GST-p120ctn(1-234) [p120(1-234)] mit jeweils 50 μ l anti-GST- μ MACS-Beads für 1 h inkubiert, um die GST-Proteine zu immobilisieren. Danach wurden jeweils 500 μ l PANC-1 EGFP-RhoC-Lysat hinzugegeben und der Ansatz erneut für 1 h bei 4 °C inkubiert, um die Bindung der Rho-GTPase des EGFP-Rho an das p120ctn der GST-p120ctn-Fusionsproteine zu ermöglichen. Vor der Präzipitation wurden aus jedem *E. coli* Ansatz 1/100 entnommen,

um die Menge der eingesetzten GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine zu überprüfen. Zur Kontrolle der eingesetzten Menge EGFP-Rho-Fusionsprotein im PANC-1-Lysat wurden pro Ansatz jeweils 1/50 der eingesetzten EGFP-Rho Menge entnommen. Nach der Inkubation wurden die Proteine von der μ MACS-Säule eluiert. Zum Nachweis der immunpräzipitierten GST bzw. GST-p120ctn-Proteine wurden 1/10 Eluat abgenommen. Alle Ansätze und Kontrollen wurden in 12,5 % Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und die Proteine im Immunblotverfahren analysiert. Zum Nachweis von EGFP-RhoC wurde ein anti-GFP-Antikörper (Roche) und ein anti-Maus IgG 800CW Antikörper verwendet. Der Nachweis von GST und GST-p120ctn erfolgte mit einem anti-GST-Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper. **A)** Der linke Immunblot zeigt kein co-immunpräzipitiertes EGFP-RhoC. Stattdessen ist vermutlich die schwere und leichte Kette des GST-Antikörpers zu erkennen. Ein Proteinstandard ist links markiert. Der rechte Immunblot veranschaulicht die Menge des in 1/10 Eluat vorhandenen immunpräzipitierten GST-p120ctn. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der linke Immunblot demonstriert das im eingesetzten PANC-1-Zelllysate enthaltene EGFP-RhoC. Ein Proteinstandard ist links markiert. Der rechte Immunblot zeigt die im *E. coli*-Zelllysate enthaltenen GST- bzw. GST-p120ctn-Fusionsproteine. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Im linken Immunblot der Abbildung 14 A ist kein mit GST, GST-p120ctn(101-234) oder GST-p120ctn(1-234) co-immunpräzipitiertes EGFP-RhoC nachweisbar. Die schwach erkennbaren Banden sind vermutlich die leichte und schwere Kette des GST-Antikörpers, der mit eluiert wurde. Im rechten Immunblot von Abbildung 14 B ist zu erkennen, dass das GST-Protein und die GST-Fusionsproteine immunpräzipitiert wurden. Allerdings wurden weniger GST und GST-p120ctn(1-234) als GST-p120ctn(101-234) immunpräzipitiert.

Die Analyse der Expression der GST-Proteine im rechten Immunblot von Abbildung 14 B zeigt neben den spezifischen Banden auf der jeweiligen Höhe von GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) auch zahlreiche unspezifische Banden, die vom Antikörper erkannt werden.

Der linke Immunblot von Abbildung 14 B zeigt, dass das im PANC-1-Lysat enthaltene EGFP-RhoC in allen drei Ansätzen in gleicher Menge eingesetzt wurde.

Als Ergebnis aus diesen Versuchen, die 5-mal durchgeführt worden waren, zeigt sich, dass EGFP-RhoC in dem verwendeten System nicht mit GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) co-immunpräzipitiert wurde. Somit kann mit den hier verwendeten Versuchsbedingungen keine spezifische Interaktion von RhoC mit p120ctn festgestellt werden.

4.2.3 Interaktionsstudien von GST-p120 Cateninen mit EGFP-Rho-Fusionsproteinen unter Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads

4.2.3.1 Immobilisierung von GST-p120ctn(1-234) durch Bindung an Glutathion-Sepharose-Beads und Inkubation mit EGFP-RhoC

Da bisher unter Verwendung des μ MACS-Systems keine Bindung zwischen p120ctn und RhoC aufgrund zu geringer Proteinmengen nachgewiesen werden konnte wurde nun untersucht, ob eine Interaktion unter Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads nachweisbar ist. Prinzip dieses Versuchssystems war, dass die Anreicherung und Immobilisation der im *E. coli*-Lysat enthaltenen GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine über die Bindung des Glutathion-S-Transferase-Anteils der GST-Proteine an das Glutathion der Glutathion-Sepharose-Beads hergestellt wird. Anschließend wurden, wie auch im vorherigen Versuchssystem, EGFP-RhoC-haltige PANC-1-Lysate hinzugefügt und eine Analyse der Mengen des co-präzipitierten EGFP-RhoC durchgeführt.

Im Experiment wurden die gleichen EGFP bzw. EGFP-Rho-Fusionsproteine aus PANC-1-Zelllysaten und GST-p120ctn-Fusionsproteine aus *E. coli*-Zelllysaten wie im vorherigen Versuch, beschrieben in Kapitel 4.2.2, verwendet.

Es wurde jeweils EGFP-RhoC-haltige PANC-1-Lysate mit Glutathion-Sepharose-Beads (Kapitel 3.1.10.3) im Überkopf-Rotor inkubiert, um Proteine aus dem PANC-1-Zelllysate zu entfernen, die unspezifisch an die Glutathion-Sepharose-Beads binden. Zur Kontrolle wurde aus jedem Ansatz vorher Lysat abgenommen, um die eingesetzte Menge an EGFP und EGFP-RhoC im PANC-1-Lysat nachzuweisen. Gleichzeitig wurden die *E. coli*-Lysate mit den enthaltenen GST-Proteinen und GST-p120ctn(1-234)-Fusionsproteinen mit Glutathion-Sepharose-Beads inkubiert. Anschließend wurden diese Glutathion-Sepharose-Beads mit dem Überstand der PANC-1 EGFP-Rho-Ansätze versetzt, 2 h inkubiert, mit XPLN-Puffer gewaschen, sedimentiert und die Proben durch Zugabe von SDS-Probenpuffer eluiert. Aus dem Eluat wurde zur Kontrolle der präzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine 1/10 Eluat abgenommen. Die

Proteine wurden im Immunblotverfahren mit spezifischen Antikörpern analysiert (siehe Abbildung 15).

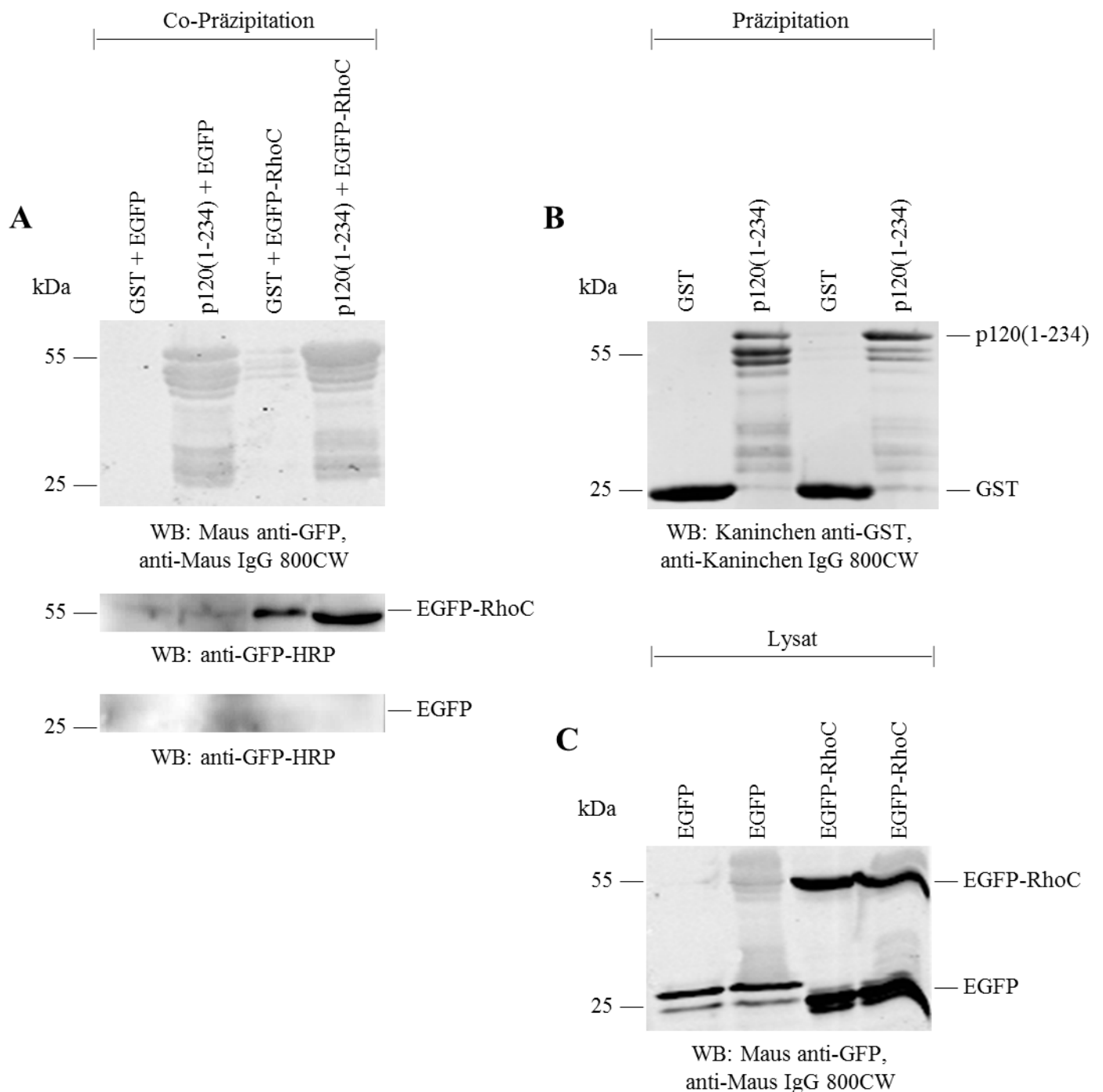


Abbildung 15: Co-Präzipitation von EGFP und EGFP-RhoC mit GST und GST-p120ctn(1-234) durch Glutathion-Sepharose-Beads. Zur Analyse der Interaktion von EGFP und EGFP-RhoC mit GST und GST-p120ctn(1-234) [p120(1-234)] wurden die im *E. coli*-Lysat enthaltenen GST-haltigen Proteine mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Beads immobilisiert und danach mit EGFP-RhoC-haltigen PANC-1-Lysaten für 2 h inkubiert. Zur Kontrolle möglicher unspezifischer Interaktionen wurde ein Ansatz mit GST und EGFP und ein Ansatz mit GST und EGFP-RhoC mitgeführt. Die gebundenen Proteine wurden sedimentiert, mit SDS-Probenpuffer eluiert, in 12,5 %igen

Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Die EGFP-Rho-Fusionsproteine wurden zunächst mit einem monoklonalen Maus anti-GFP-Antikörper und einem sekundären anti-Maus IgG 800CW Antikörper nachgewiesen (A, oben und C). Anschließend wurde dieser Immunblot mit einem anti-GFP-HRP Antikörper behandelt und eine ECL-Detektion durchgeführt (A, Mitte und unten). Zum Nachweis der präzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-GST-Antikörper und ein sekundärer anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper eingesetzt. **A)** Der obere Immunblot zeigt zahlreiche Banden, die eine eindeutige Zuordnung von co-präzipitiertem EGFP-RhoC nicht ermöglichen. Mit einer Detektion durch einen HRP-gekoppelten GFP-Antikörper und einer Entwicklung im ECL System zeigt sich im gleichen Blot eindeutig co-präzipitiertes EGFP-RhoC und kein co-präzipitiertes EGFP, dargestellt im mittleren und unteren Immunblotauszug. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Immunblot zeigt die im Versuchsansatz präzipitierten GST und GST-p120ctn(1-234) aus *E. coli*. Ein Proteinstandard ist links markiert. **C)** Der Immunblot zeigt den Nachweis von EGFP und EGFP-RhoC in den PANC-1-Lysaten, die im Versuch eingesetzt wurden. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Der obere Immunblot in Abbildung 15 A, der mit einem monoklonalen Maus anti-GFP-Antikörper und einem sekundären anti-Maus IgG 800CW Antikörper gefärbt wurde, zeigt, dass mit diesem Detektionssystem und diesem Antikörperpaar kein spezifischer Nachweis der Interaktion von RhoC mit p120ctn erbracht werden konnte. Auf dem mittleren Immunblot, der direkt mit HRP-gekoppeltem GFP-Antikörper und dem ECL-System entwickelt wurde, ist zu erkennen, dass EGFP-RhoC mit GST und mit GST-p120ctn(1-234) co-präzipitiert wurde. Im Vergleich konnte mehr EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(1-234) als mit GST co-präzipitiert werden. Somit kann die Interaktion von RhoC mit p120ctn(1-234) nachgewiesen werden, wobei jedoch gleichzeitig auch eine Bindung an GST vorliegt. Im unteren Immunblot in 15 A ist keine Co-Präzipitation von EGFP mit GST oder GST-p120ctn(1-234) zu erkennen.

In Abbildung 15 B konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung der Glutathion-Sepharose-Beads GST und GST-p120ctn(1-234) präzipitiert werden konnten, wobei 2-mal mehr GST als GST-p120ctn(1-234) präzipitiert wurde. Außerdem wurden wie in Abbildung 15 C dargestellt vergleichbare Mengen von EGFP und EGFP-RhoC im Versuchsansatz eingesetzt.

Somit konnte mit diesem Versuchssystem gezeigt werden, dass RhoC mit p120ctn(1-234) interagiert. Gleichzeitig liegt jedoch auch eine Bindung von EGFP-RhoC an GST vor, die aber geringer ist. Es konnte gezeigt werden, dass EGFP und GST nicht miteinander interagieren. Die Interaktion von EGFP-RhoC und GST besteht somit zwischen der RhoC und GST. Zwischen EGFP und GST liegt keine Interaktion vor.

4.2.3.2 Eingrenzung der Bindungsdomäne von RhoC an p120ctn durch Nachweis der Interaktion von EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(101- 234)

In diesem Versuch wurde in Anlehnung an das in Kapitel 4.2.3.1 beschriebene Versuchsschema zusätzlich die Interaktion von RhoC mit der Deletionsmutante p120ctn(101-234) analysiert. Ziel war in diesem Versuchsansatz, die Bindungsstelle von RhoC an p120ctn einzugrenzen, indem zwei unterschiedlich lange Abschnitte des p120ctn [(101-234) und (1-234)] verwendet wurden.

GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) aus *E. coli*-Lysaten wurden durch Bindung an Glutathion-Sepharose-Beads immobilisiert und durch Inkubation mit EGFP-RhoC-haltigen PANC-1-Lysaten wurde EGFP-RhoC co-präzipitiert.

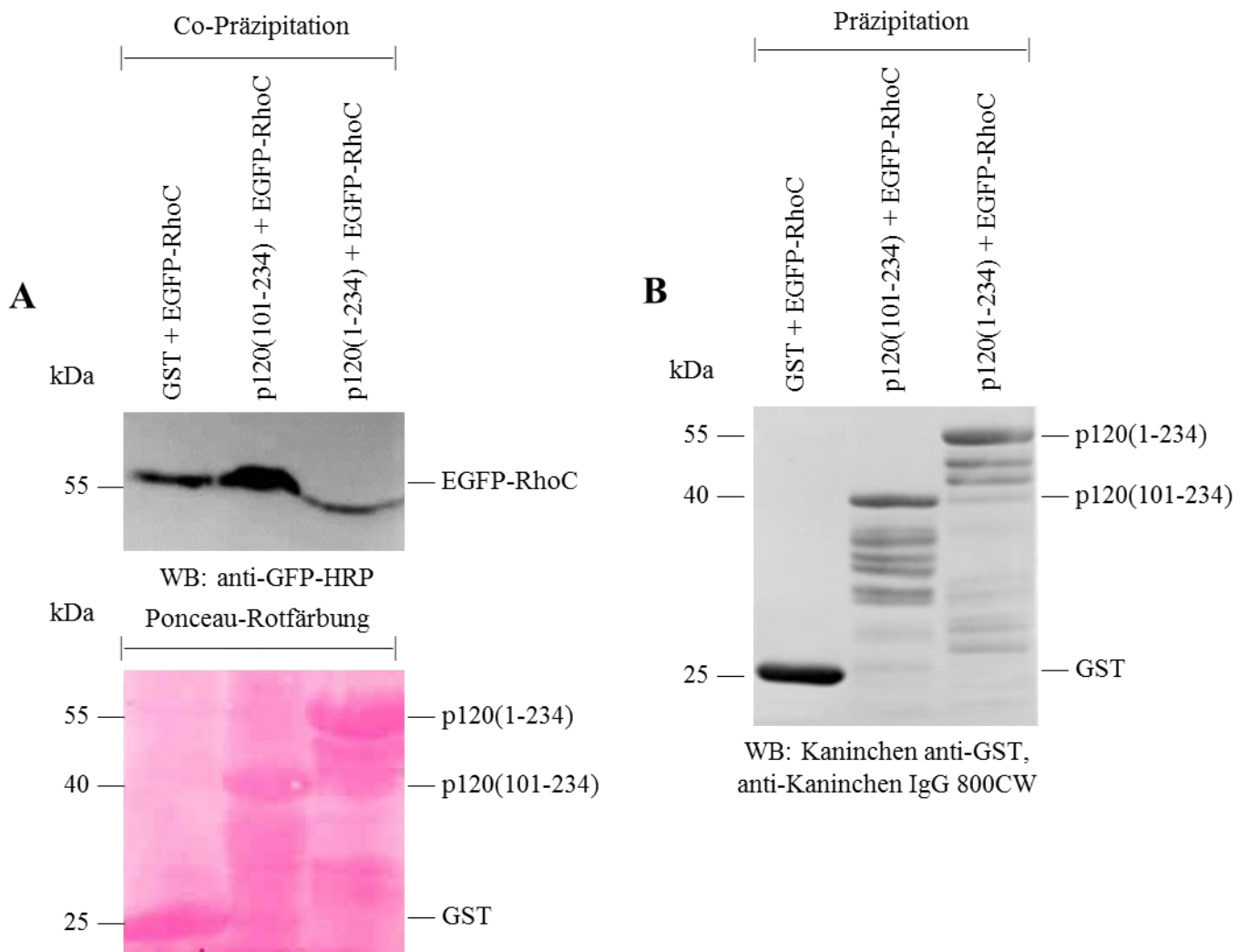


Abbildung 16: Interaktionsanalyse von EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Beads. Zur

Untersuchung der Interaktion von EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234) [p120(101-234)] und GST-p120ctn(1-234) [p120(1-234)] aus *E. coli*-Lysaten wurden mit Glutathion-Sepharose-Beads vorgereinigte EGFP-Rho-haltige PANC-1-Lysate mit immobilisierten GST-p120ctn-Proteinen inkubiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde ein Ansatz mit EGFP-RhoC und GST mitgeführt. Die GST-p120ctn-Lysate wurden für 1 h bei 4 °C mit Glutathion-Sepharose-Beads inkubiert, danach mit EGFP-Rho-Lysaten versetzt und für 2 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. Nach Sedimentation der Glutathion-Sepharose-Beads wurden diese mit SDS-Probenpuffer versetzt und die eluierten Proteine im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der co-präzipitierten EGFP-RhoC-Fusionsproteine erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-HRP Antikörper und ECL-Detektion. Zum Nachweis der präzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine wurde ein primärer polyklonaler Kaninchen anti-GST-Antikörper und ein sekundärer anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper eingesetzt. **A)** Der obere Immunblot zeigt co-präzipitiertes EGFP-RhoC. Der untere Immunblot zeigt die Ponceau-Rotfärbung des Immunblots. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Immunblot zeigt präzipitiertes GST, GST-p120ctn(101-134) und GST-p120ctn(1-234). Ein Proteinstandard ist links markiert.

Der obere Immunblot in Abbildung 16 A zeigt, dass EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(101-234) und mit GST-p120ctn(1-234) co-präzipitiert wurde. Aufgrund des Laufverhaltens der EGFP-RhoC-Band in Spur C und der Analyse der Ponceau-Rotfärbung des Immunblots zeigt sich, dass GST-p120ctn(1-234) und EGFP-RhoC auf der gleichen Höhe von 55 kDa laufen und die Auftrennung von EGFP-RhoC aufgrund der hohen Proteinmenge von GST-p120ctn(1-234) beeinträchtigt wird. Ob EGFP-RhoC somit schwächer an GST-p120ctn(1-234) als an GST-p120ctn(101-234) bindet kann nicht eindeutig gesagt werden. EGFP-RhoC wurde auch mit GST präzipitiert, jedoch im Vergleich mit GST-p120ctn(101-234) 2-mal so viel wie mit GST.

Der Immunblot in Abbildung 16 B verdeutlicht, dass GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) mit den Glutathion-Sepharose-Beads in vergleichbarer Menge präzipitiert wurden. Jedoch wurde im Vergleich 1,5-mal mehr GST präzipitiert.

Mit Hilfe dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass RhoC an p120ctn(101-234) und an p120ctn(1-234) bindet. Die Interaktion zwischen p120ctn und der Rho-GTPase RhoC konnte in diesem Versuch somit nachgewiesen werden. Da eine Interaktion sowohl mit der langen Deletionsmutante [p120ctn(1-234)], als auch mit der kurzen Deletionsmutante [p120ctn(101-234)] von p120ctn mit RhoC festgestellt wurde, liegt der Bereich der Bindungsdomäne von p120ctn an RhoC auf dem Abschnitt der Aminosäuresequenz 101-234 von p120ctn.

An welche Deletionsmutante RhoC stärker bindet konnte nicht eindeutig geklärt werden. Zusätzlich besteht weiterhin eine Interaktion von EGFP-RhoC und GST. In den nachfolgenden Versuchen wurde durch eine Optimierung der Puffer- und Waschbedingungen versucht, diese Interaktion zu reduzieren.

4.2.3.3 Veränderungen der Versuchsbedingungen

In den nachfolgenden Versuchsansätzen wurde zur möglichen Reduktion der Bindungen von EGFP-RhoA bzw. -RhoC an GST zahlreiche Optimierungen der Puffer- und Waschbedingungen ausprobiert, die hier exemplarisch dargestellt sind.

Zusätzlich wurde die Reihenfolge der Inkubationsschritte verändert, indem zuerst die GST-p120ctn-Fusionsproteine mit den EGFP-Rho-Fusionsproteinen inkubiert und danach erst die Glutathion-Sepharose-Beads hinzugefügt wurden. Es wurde so versucht eine Interaktion der beiden Proteine vor der Immobilisierung an die Glutathion-Sepharose-Beads zu erreichen.

In dem nachfolgend dargestellten Versuchsansatz wurde der bisher verwendete XPLN-Puffer durch den GST-p120ctn-Lysispuffer und den Castano-Puffer ersetzt (siehe Kapitel 3.1.10.1.4). Zur Vorbereitung der Lysate wurde der GST-p120ctn-Lysispuffer verwendet, der im Vergleich zum XPLN-Puffer eine verringerte Salzkonzentration und anstatt HEPES und Triton X-100, Tris/HCl und DTT enthielt. Für die Waschschrte wurde anstelle des XPLN-Puffers der Castano-Puffer benutzt, der ebenfalls eine verringerte Salzkonzentration und einen veränderten Detergenzienzusatz enthielt. Bei dem Castano-Puffer wurde HEPES durch Tris/HCl ersetzt, sowie EDTA und DTT hinzugefügt. Die Waschzyklen der Co-Präzipitation von EGFP-Rho-Fusionsproteinen mit GST-p120ctn-Proteinen wurden von 4-mal auf 3-mal reduziert. Außerdem wurde die Dauer der Inkubation von den Proteinen mit den Glutathion-Sepharose-Beads von 1 h auf 30 min verkürzt und die Inkubationen bei Raumtemperatur anstelle von 4 °C durchgeführt.

Durch die veränderte Salzkonzentration sollten ionische Wechselwirkungen minimiert und durch den Detergenzienzusatz die Hydrophilie erhöht werden. Die immobilisierten Proteine wurden in 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der eingesetzten und präzipitierten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

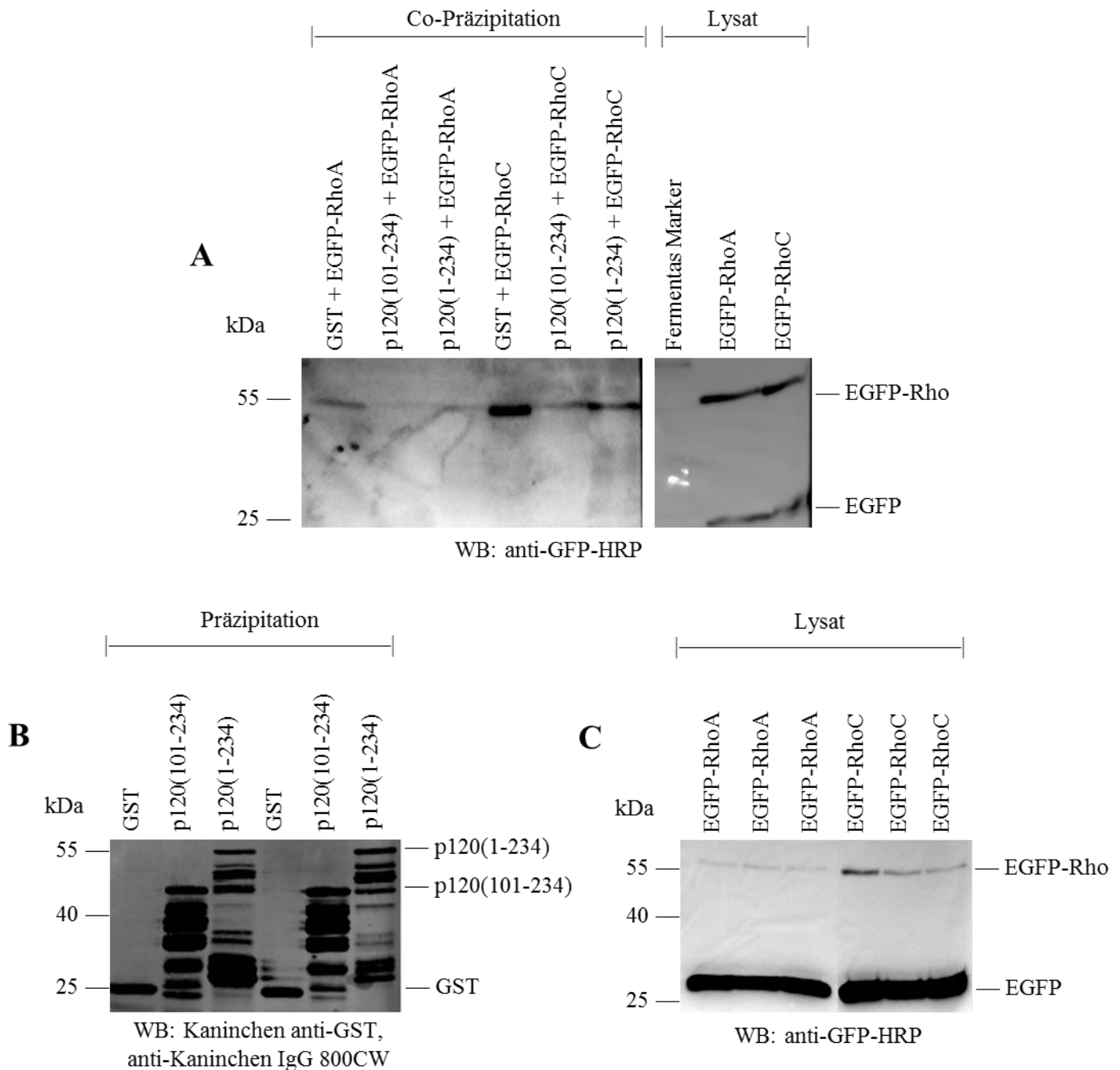


Abbildung 17: Interaktionsanalyse unter Veränderung der Versuchsbedingungen von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) mit Hilfe von Glutathion-Sephrose-Beads. Zur vergleichenden Analyse der Interaktion von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC aus PANC-1-Lysaten mit GST, GST-p120ctn(101-234) [p120(101-234)] und GST-p120ctn(1-234) [p120(1-234)] wurden zuerst die EGFP-Rho-Fusionsproteine mit den *E. coli* GST-p120ctn-Lysaten zusammengefügt, mit GST-p120ctn-Lysispuffer auf 5 ml aufgefüllt und für 45 min bei Raumtemperatur im Überkopf-Rotor inkubiert. Danach wurden die Glutathion-Sephrose-Beads hinzugegeben und es wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Glutathion-Sephrose-Beads 3-mal mit Castano-Puffer gewaschen. Nach Sedimentation der Glutathion-Sephrose-Beads wurden diese mit SDS-Probenpuffer versetzt und die eluierten Proteine im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde jeweils ein Ansatz mit

EGFP-RhoA/EGFP-RhoC und GST mitgeführt. Der Nachweis der eingesetzten EGFP-Rho-Fusionsproteine erfolgte mit einem anti-Maus HRP-*linked* Antikörper und mittels ECL-Detektion. Zum Nachweis der co-präzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteine wurde ein monoklonaler Maus anti-GFP-Antikörper als primärer und ein anti-Maus HRP-*linked* Antikörper als sekundärer Antikörper verwendet. Der Nachweis der präzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen anti-GST-Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper. **A)** Der Immunblot zeigt, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) in unterschiedlichen Mengen co-präzipitiert wurden. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Immunblot zeigt präzipitiertes GST, GST-p120ctn(101-134) und GST-p120ctn(1-234) in 1/10 der präzipitierten Proben. Ein Proteinstandard ist links markiert. **C)** Auf dem Immunblot ist zu erkennen, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC im Zelllysate enthalten waren. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Der Immunblot in Abbildung 17 A veranschaulicht, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) co-präzipitiert wurden. EGFP-RhoA wurde schwächer als EGFP-RhoC co-präzipitiert. Allerdings wurde, wie in Abbildung 17 C zu erkennen ist, EGFP-RhoC 2-mal so viel wie EGFP-RhoA im Versuch eingesetzt. Zum Nachweis unspezifischer Bindungen wurde jeweils ein Ansatz mit EGFP-RhoA und GST, sowie EGFP-RhoC und GST mitgeführt. Auch in diesen beiden Ansätzen ist co-präzipitiertes EGFP-RhoA und EGFP-RhoC zu erkennen, was auf Interaktion von EGFP-Rho mit GST hinweist. Im Vergleich zu den GST-p120ctn Ansätzen wurde bei GST 2-mal EGFP-RhoC eingesetzt (siehe Abbildung 17 C), so dass die co-präzipitierten EGFP-RhoC-Mengen nicht direkt miteinander verglichen werden können.

In Abbildung 17 B zeigt der Immunblot auf, dass GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) in vergleichbaren Mengen präzipitiert wurden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Interaktion von EGFP-RhoA bzw. -RhoC mit GST auch unter den hier dargestellten veränderten Versuchsbedingungen nicht reduziert werden konnte.

Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen fällt unter den veränderten Versuchsbedingungen die Interaktion von p120ctn mit EGFP-RhoA bzw. -RhoC deutlich schwächer aus. Auch die Änderung der Versuchsreihenfolge, unter der zunächst die GST-p120ctn-Fusionsproteine mit den EGFP-Rho-Fusionsproteinen inkubiert und erst danach die Glutathion-Sepharose-Beads hinzugefügt wurden, konnte

die Bindung von EGFP-RhoA bzw. -RhoC an GST nicht reduzieren und die spezifische Bindung der Rho-GTPasen an p120ctn nicht verstärken.

Als Fazit lässt sich zusammenfassen, dass durch Veränderungen der Versuchsbedingungen in Form von Umstellung der Versuchsreihenfolge, Veränderung der Pufferbedingungen, Reduzierung der Inkubationszeit und Inkubation unter Raumtemperatur die Interaktion von p120ctn mit Rho-GTPasen nicht eindeutig dargestellt werden konnte.

4.2.3.4 Veränderungen der Inkubationsbedingungen

Da im vorherigen Versuch trotz der Veränderung der Puffer- und Waschbedingungen weiterhin eine Interaktion von GST und EGFP-Rho nachgewiesen wurde, wurden in dieser Versuchsserie Strategien zur Optimierung der Inkubationsbedingungen im Vergleich zu Kapitel 4.2.3.3 getestet.

Die Inkubationszeit von den GST-p120ctn-Fusionsproteinen mit den EGFP-Rho-Fusionsproteinen wurde im Vergleich mit dem Versuch von Kapitel 4.2.3.3 von 45 min auf 2 h verlängert und anstatt bei Raumtemperatur bei 4 °C durchgeführt. Hierdurch wurde versucht eine bessere Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen zu erreichen. Die anschließende Inkubation mit den Glutathion-Sepharose-Beads wurde ebenfalls 30 min lang durchgeführt, allerdings bei 4 °C. Durch die Temperatur von 4 °C sollte einer vorzeitigen Proteindegradation entgegengewirkt werden.

Zusätzlich wurde der Waschvorgang im Vergleich mit Kapitel 4.2.3.3 mit Castano-Puffer von 3- auf 4-mal erhöht, mit dem Ziel die Interaktion von GST und EGFP-Rho zu minimieren.

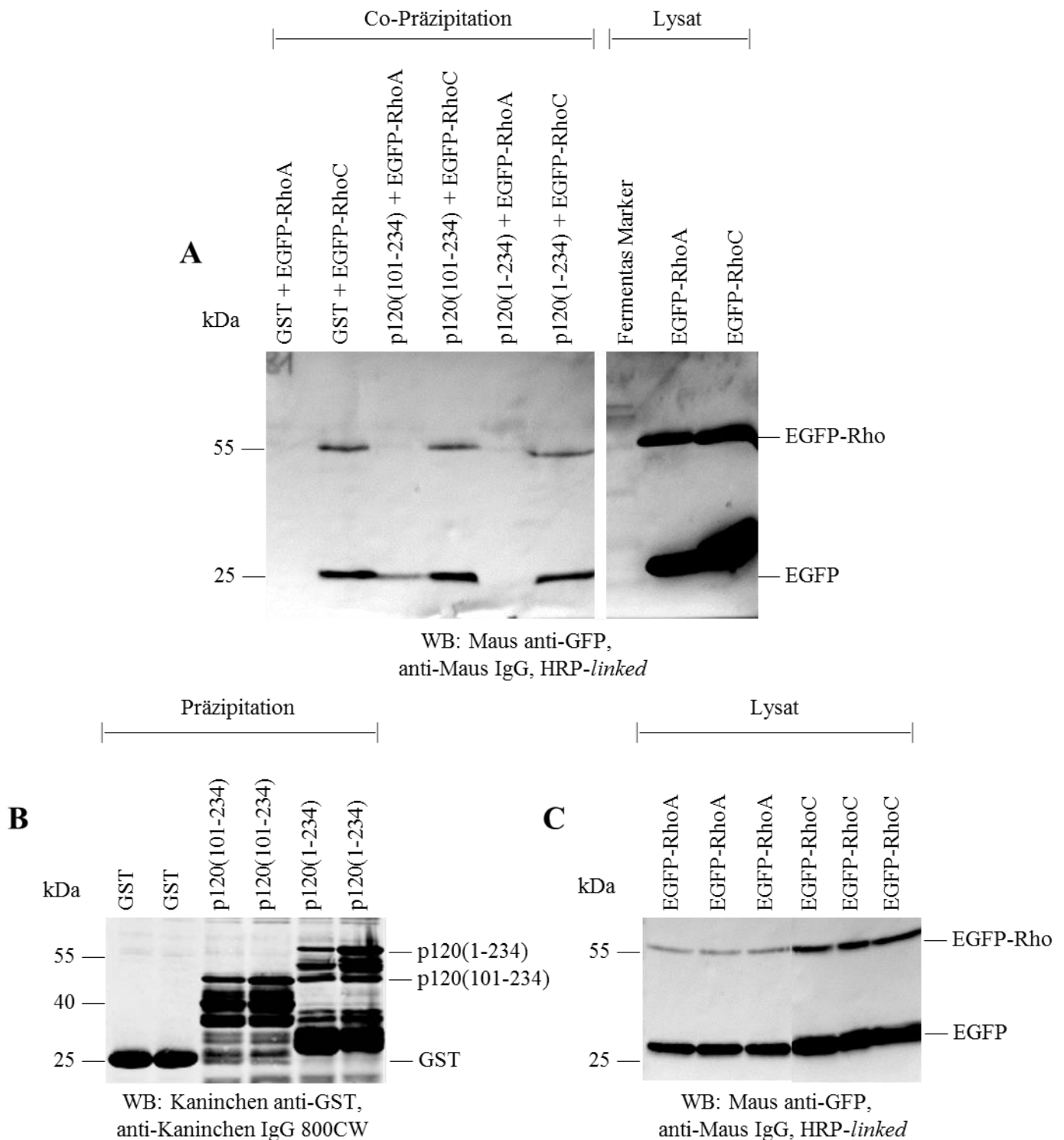


Abbildung 18: Interaktionsnachweis von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) unter Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads. Um die Interaktion von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234) [p120(101-234)] und GST-p120ctn(1-234) [p120(1-234)] zu analysieren wurden EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-haltige PANC-1-Lysate mit GST-p120ctn-*E. coli*-Lysaten für 2 h bei 4 °C im Überkopf-Rotor inkubiert. Danach wurden die vorbereiteten Glutathion-Sepharose-Beads hinzugefügt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Glutathion-Sepharose-Beads 4-mal mit Castano-Puffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu überprüfen wurde jeweils ein

Ansatz mit EGFP-RhoA/EGFP-RhoC und GST mitgeführt. Danach wurden die Glutathion-Sepharose-Beads sedimentiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt, die eluierten Proteine in 10 %igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der eingesetzten sowie der co-präzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteine erfolgte mit einem monoklonalen Maus anti-GFP-Antikörper als primärem und einem anti-Maus HRP-linked Antikörper als sekundärem Antikörper. Zum Nachweis der präzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-GST-Antikörper und ein sekundärer anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper eingesetzt. **A)** Der Immunblot zeigt co-präzipitiertes EGFP-RhoA und EGFP-RhoC. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Immunblot zeigt präzipitiertes GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234). Ein Proteinstandard ist links markiert. **C)** Der Immunblot zeigt, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC im Versuch eingesetzt wurden. Ein Proteinstandard ist links markiert.

EGFP-RhoC wurde mit GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234), demonstriert in Abbildung 18 A, co-präzipitiert. Eine Co-Präzipitation von EGFP-RhoA mit GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) konnte nicht festgestellt werden. Wobei zu beachten ist, dass in diesem Versuch deutlich weniger EGFP-RhoA als EGFP-RhoC eingesetzt wurde, was in Abbildung 18 C gezeigt wird. Nach Variation der Inkubationszeit von 30 min auf 2 h und der Inkubationstemperatur von 4 °C anstelle von Raumtemperatur ist keine signifikante Veränderung der Interaktion von p120ctn mit EGFP-RhoC zu verzeichnen gewesen. Somit konnte die Interaktion von p120ctn mit EGFP-RhoA weiterhin nicht nachgewiesen werden.

Ein Ansatz mit EGFP-Rho-GTPasen und GST wurde mitgeführt, um deren Interaktion zu überprüfen. Trotz Erhöhung der Waschfrequenz mit Castano-Puffer von 3- auf 4-mal waren in den Ansätzen mit GST co-präzipitiertes EGFP-RhoC zu erkennen, was auf eine Interaktion von EGFP-RhoC mit GST oder der Glutathion-Sepharose hinweist.

Der Immunblot in Abbildung 18 B zeigt, dass 4-mal mehr GST als GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) präzipitiert wurde. GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) wurden in vergleichbarer Menge präzipitiert. In Abbildung 18 C demonstriert der Immunblot, dass doppelt so viel EGFP-RhoC wie EGFP-RhoA im Versuch eingesetzt wurde.

Ergebnis dieses Versuches ist, das trotz der veränderten Versuchsbedingungen keine Verbesserung der Interaktion zwischen EGFP-Rho und p120ctn erreicht werden konnte und weiterhin eine Interaktion zwischen EGFP-Rho und GST bzw. Glutathion-Sepharose vorliegt.

4.2.3.5 Interaktion von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit immobilisiertem GST-p120ctn

In dem hier dargestellten Experiment wurde nach den Versuchsreihen zur Optimierung der Versuchs- und Inkubationsbedingungen eine abschließende Interaktionsanalyse der Rho-GTPasen RhoA und RhoC mit p120ctn unter Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads durchgeführt. In Bezug auf die beiden oben beschriebenen Versuchsschemata, Kapitel 4.2.3.3 und 4.2.3.4, wurde zusätzlich die Interaktion der Rho-GTPase RhoA mit den Deletionsmutanten p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234) untersucht. Außerdem wurde erstmals die Interaktion von RhoA und RhoC mit der Isoform p120ctn(1A) analysiert. Zusätzlich wurden die Puffer variiert und RacRIPA-Puffer zur Lyse der Zellen und für die Waschschrte PAK-Waschpuffer verwendet, siehe Kapitel 3.1.10.2.

Die verwendeten EGFP- und EGFP-Rho-Fusionsproteine aus PANC-1-Zelllysaten und die GST-p120ctn-Fusionsproteine aus *E. coli*-Zelllysaten wurden wieder wie in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 erläutert eingesetzt.

Die Glutathion-Sepharose-Beads wurden zunächst mit RacRIPA-Puffer gewaschen. Danach wurden GST, GST-p120ctn(101-234), GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A) aus *E. coli*-Zelllysaten zu den Glutathion-Sepharose-Beads hinzugefügt und mit RacRIPA-Puffer für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert, um die GST-p120ctn-Proteine zu präzipitieren. Anschließend wurde mit PAK-Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Proben mit EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC aus PANC-1-Zelllysaten für 2 h bei 4 °C inkubiert, wodurch die EGFP-Rho-Fusionsproteine co-präzipitiert wurden. Anschließend wurde wieder mit PAK-Waschpuffer gewaschen, sedimentiert und die Proben durch Zugabe von SDS-Probenpuffer eluiert.

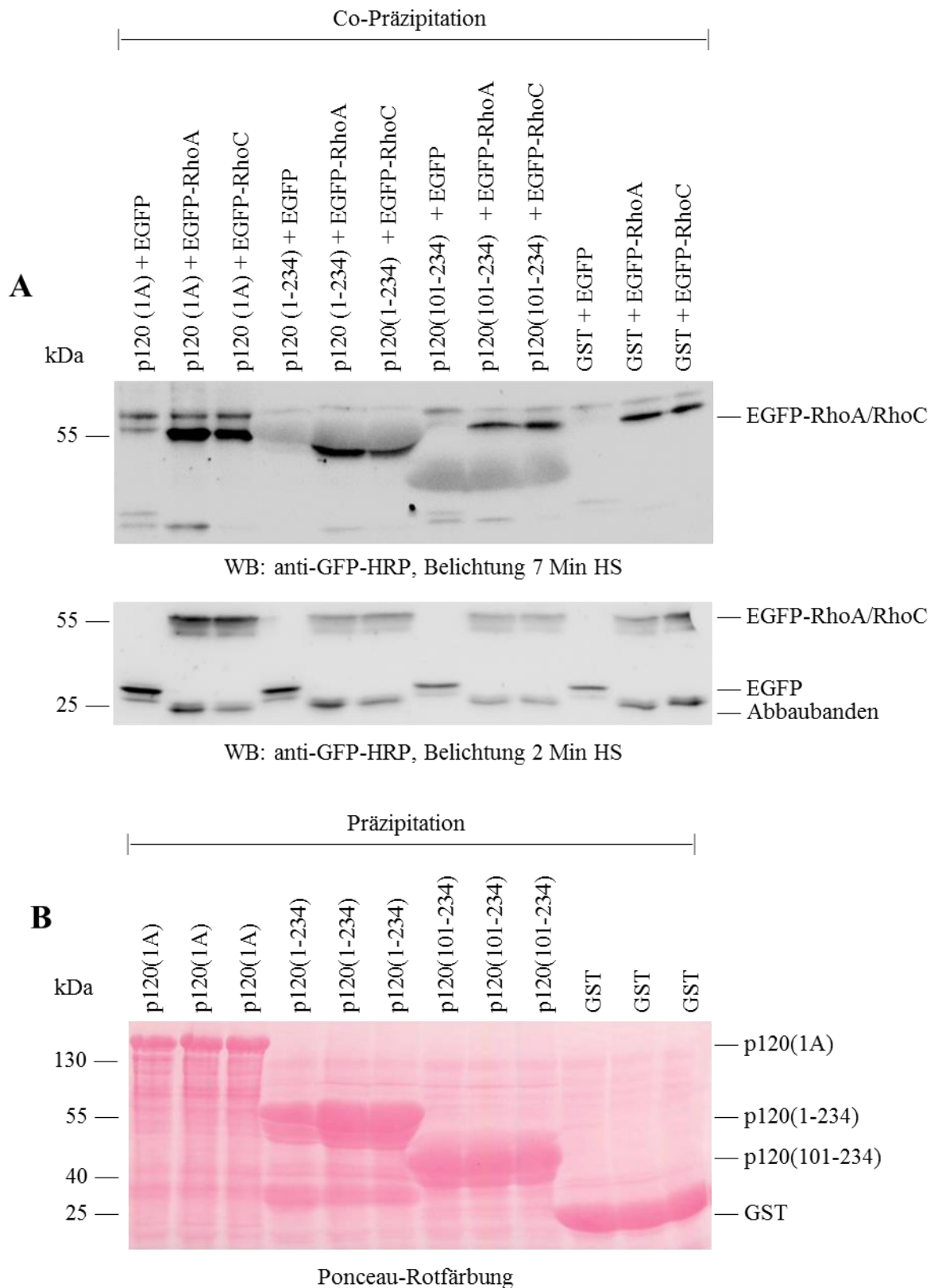


Abbildung 19: Co-Präzipitation von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234), GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A) durch Glutathion-Sepharose-Beads. Zur Analyse der Interaktion von EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST, GST-p120ctn(101-234) [p120(101-234)], GST-p120ctn(1-234) [p120(1-234)] und GST-p120ctn(1A) [p120(1A)] wurden die im *E. coli*-Lysat enthaltenen GST-haltigen Proteine mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Beads für 1 h

immobilisiert und danach mit EGFP-RhoA, -RhoC oder EGFP-haltigen PANC-1-Lysaten für 2 h inkubiert. Zur Kontrolle möglicher unspezifischer Interaktionen wurden ein Ansatz mit GST und EGFP und ein Ansatz mit GST und EGFP-RhoA/RhoC mitgeführt. Die gebundenen Proteine wurden sedimentiert, mit SDS-Probenpuffer eluiert, in 10 %igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Zur Kontrolle der eingesetzten EGFP bzw. EGFP-Rho-Fusionsproteine wurde 1/20 der für die Präzipitation verwendeten Lysatmenge in einem separaten Blot analysiert. Die co-präzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteine wurden mit einem anti-GFP-HRP Antikörper nachgewiesen und eine ECL-Detektion durchgeführt (A, oben und unten). Es wurde eine Belichtung mit 7 min (A, oben, Co-Präzipitation) und eine Belichtung mit 2 min (A, unten, EGFP-, EGFP-RhoA/C-haltige Lysate) durchgeführt. Zum Nachweis der präzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine wurde eine Ponceau-Rotfärbung durchgeführt (B). **A)** Der obere Immunblot zeigt co-präzipitiertes EGFP-RhoA und EGFP-RhoC, der untere Immunblot die eingesetzten EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC Mengen. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Ponceau-Rot gefärbte Blot zeigt das im Versuchsansatz präzipitierte GST, GST-p120ctn(101-234), GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A) aus *E. coli*. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Auf dem Immunblot in Abbildung 19 A ist zu erkennen, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit der langen Form von p120ctn, GST-p120ctn(1A), co-präzipitiert wurden. EGFP-RhoA und EGFP-RhoC wurden auch mit GST co-präzipitiert, allerdings wurde eine deutlich größere Menge von den EGFP-Rho-Fusionsproteinen mit GST-p120ctn(1A) als mit GST co-präzipitiert. Auch mit GST-p120ctn(1-234) wurden EGFP-RhoA und EGFP-RhoC co-präzipitiert, allerdings zeigen die Banden von EGFP-RhoA bzw. RhoC aufgrund des auf gleicher Höhe laufenden präzipitierten GST-p120ctn(1-234) ein ungewöhnliches Laufverhalten, was keine Mengenabschätzung zulässt. Die Menge, mit der EGFP-RhoA/RhoC mit GST-p120ctn(101-234) co-präzipitiert wurde, entspricht der mit GST co-präzipitierten Menge. Die Interaktion von EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(101-234) ist deshalb vermutlich nicht spezifisch. EGFP konnte in keinem Ansatz als co-präzipitiertes Protein nachgewiesen werden.

In Abbildung 19 B konnte mit Hilfe der Ponceau-Rotfärbung gezeigt werden, dass GST, GST-p120ctn(101-234), GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A) in erheblichen Mengen präzipitiert wurden.

Zusammenfassend zeigen diese und die weiteren Versuche mit diesem Versuchsaufbau, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(1A) co-präzipitiert werden können. Die Interaktion der Rho-GTPasen RhoA und RhoC mit p120ctn konnte nachgewiesen werden. Allerdings ist die Interaktion der EGFP-Rho-Fusionsproteine mit

den beiden Deletionsmutanten von p120ctn, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234), schwächer und aufgrund der starken Interaktion mit GST kann keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden, ob es sich hierbei um eine Rho- oder GST-vermittelte spezifische Interaktion handelt.

4.2.3.6 **Fazit**

Zusammenfassend konnte in den bisherigen Versuchen gezeigt werden, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC mit GST-p120ctn(101-234), GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A) interagieren, siehe Kapitel 4.2.3.5. Gleichzeitig liegt jedoch auch eine Interaktion der EGFP-Rho-Fusionsproteine mit GST vor, wobei experimentell dargestellt werden konnte, dass die Interaktion zwischen der Rho-GTPase RhoC und GST und nicht zwischen EGFP und GST besteht. Durch Veränderung der Puffer- und Waschbedingungen konnte diese Interaktion jedoch nicht reduziert werden. Eine versuchte Optimierung der Inkubationsbedingungen und Veränderung der Inkubationsreihenfolge konnte die Interaktion zwischen EGFP-RhoC und p120ctn nicht verbessern. Die bisher dargestellte Methodik mit den verwendeten GST-p120ctn und EGFP-Rho-Fusionsproteinen stellt somit kein geeignetes Verfahren dar, um die Interaktionsdomäne von p120ctn mit RhoA bzw. RhoC zu bestimmen.

Im nächsten Versuchsabschnitt wurde versucht die Interaktion von EGFP-Rho-Fusionsproteinen und GST durch Einsatz anderer Methoden zu minimieren und somit eine spezifische Methode zur vergleichenden Analyse der Interaktion von p120ctn und den Rho-GTPasen RhoA und RhoC, sowie zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne, zu etablieren.

4.2.4 Co-Immunpräzipitation von GST-p120 Cateninen und EGFP-Rho-Fusionsproteinen

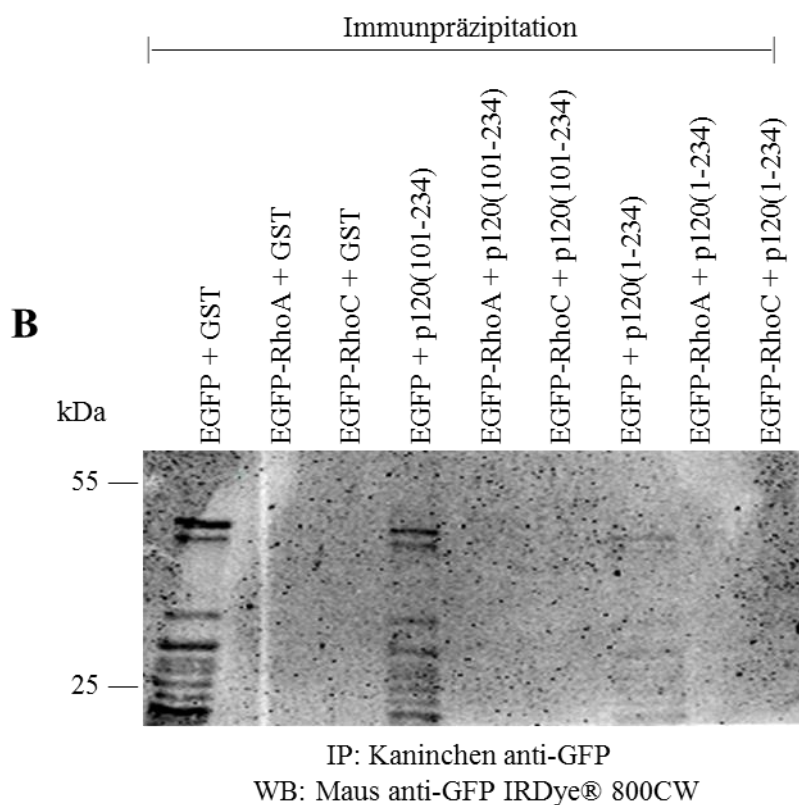
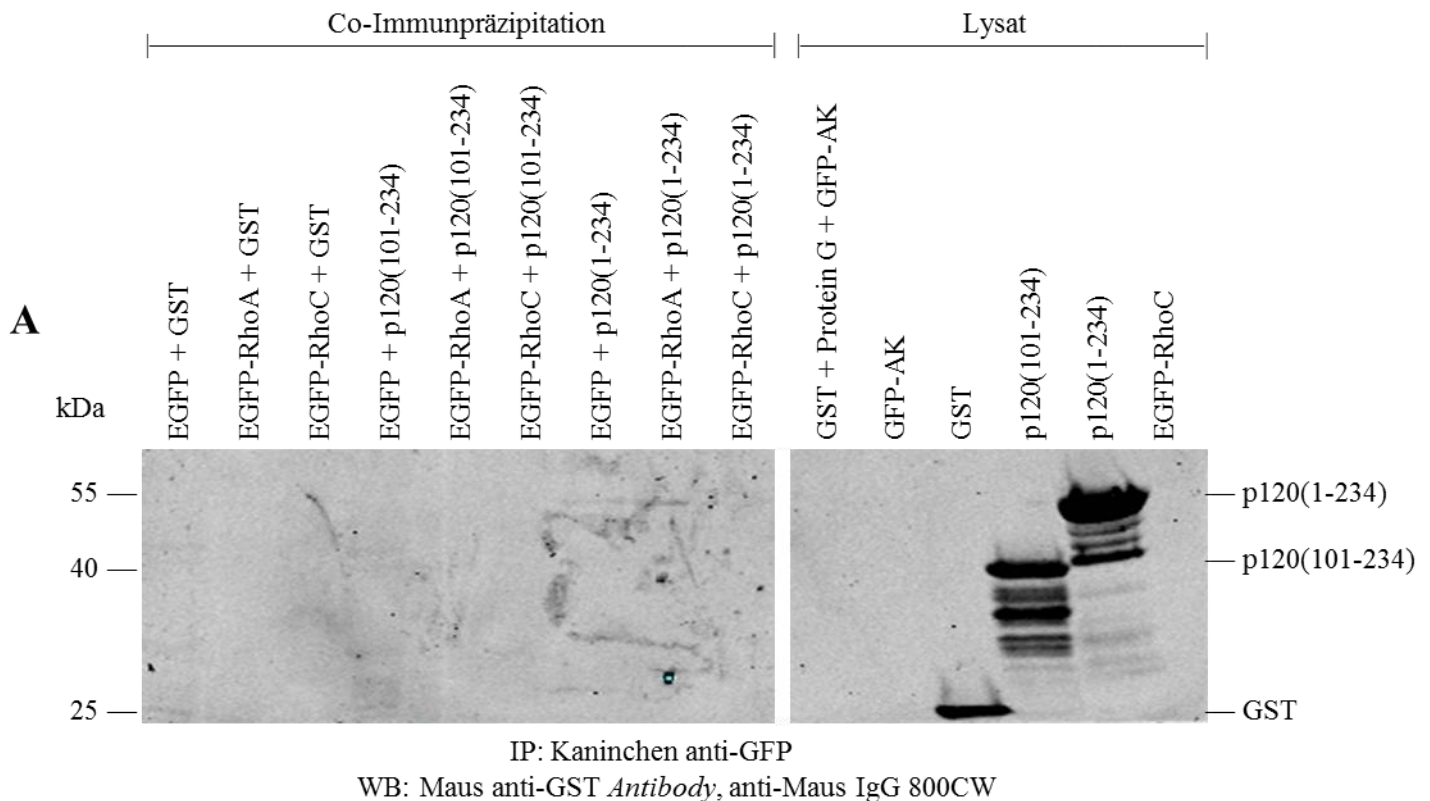
4.2.4.1 Co-Immunpräzipitation von GST-p120 Cateninen mit EGFP-Rho-Fusionsproteinen mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers und Protein G-Agarose

In den Versuchen mit Glutathion-Sepharose-Beads zur Präzipitation von GST-p120 Cateninen und zum Nachweis der Bindung von RhoA bzw. RhoC an p120ctn ist es zur Interaktion zwischen den Rho-GTPasen und GST gekommen. In diesem Versuch wurde deshalb ein anderes Versuchssystem zur Analyse der Interaktion gewählt, indem die EGFP-Rho-Fusionsproteine mit Hilfe eines anti-GFP Antikörpers und Protein-G-Agarose gebunden wurden, um so eine Immobilisierung der Rho-GTPasen anstelle von GST-p120ctn zu erzielen.

Für diesen Versuchsansatz wurden EGFP-Rho-haltige PANC-1-Lysate und GST-p120ctn-Fusionsproteine aus *E. coli*-Lysaten, wie in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben, verwendet. Für die Immunpräzipitation wurden die EGFP-Rho-Fusionsproteine aus PANC-1-Lysaten, Protein G-Agarose und Kaninchen anti-GFP Antikörper für 2 h bei 4 °C inkubiert, um die EGFP-Rho-Fusionsproteine über den EGFP-Anteil an den GFP-Antikörper zu binden, der mit der Protein G-Agarose eine Bindung eingeht. Danach wurde das Präzipitat für 2 h bei 4 °C mit GST-p120ctn-haltigen *E. coli*-Lysaten inkubiert, um eine Bindung von p120ctn an die Rho-GTPase zu ermöglichen.

Zur Überprüfung der eingesetzten Proteinmengen wurden aus jedem Lysat jeweils gleiche Mengen an EGFP-Rho-Fusionsprotein oder GST-p120ctn-Fusionsprotein entnommen und nachgewiesen. Um eine Interaktion der EGFP-Rho-Fusionsproteine mit GST ausschließen zu können wurden Kontrollen mitgeführt, die GST und EGFP-Rho-Fusionsproteine enthielten. Außerdem wurde eine Kontrolle mitgeführt, die GST, Protein G und Kaninchen anti-GFP enthielt, um eine Bindung von GST an Protein G bzw. den Antikörper zu überprüfen.

Das Präzipitat wurde anschließend 3-mal mit Castano-Puffer gewaschen und sedimentiert. Die gebundenen Proteine wurden in 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der eingesetzten und präzipitierten Proteine erfolgte mit Antikörpern, die in der Bildunterschrift angegeben sind, siehe Abbildung 20.



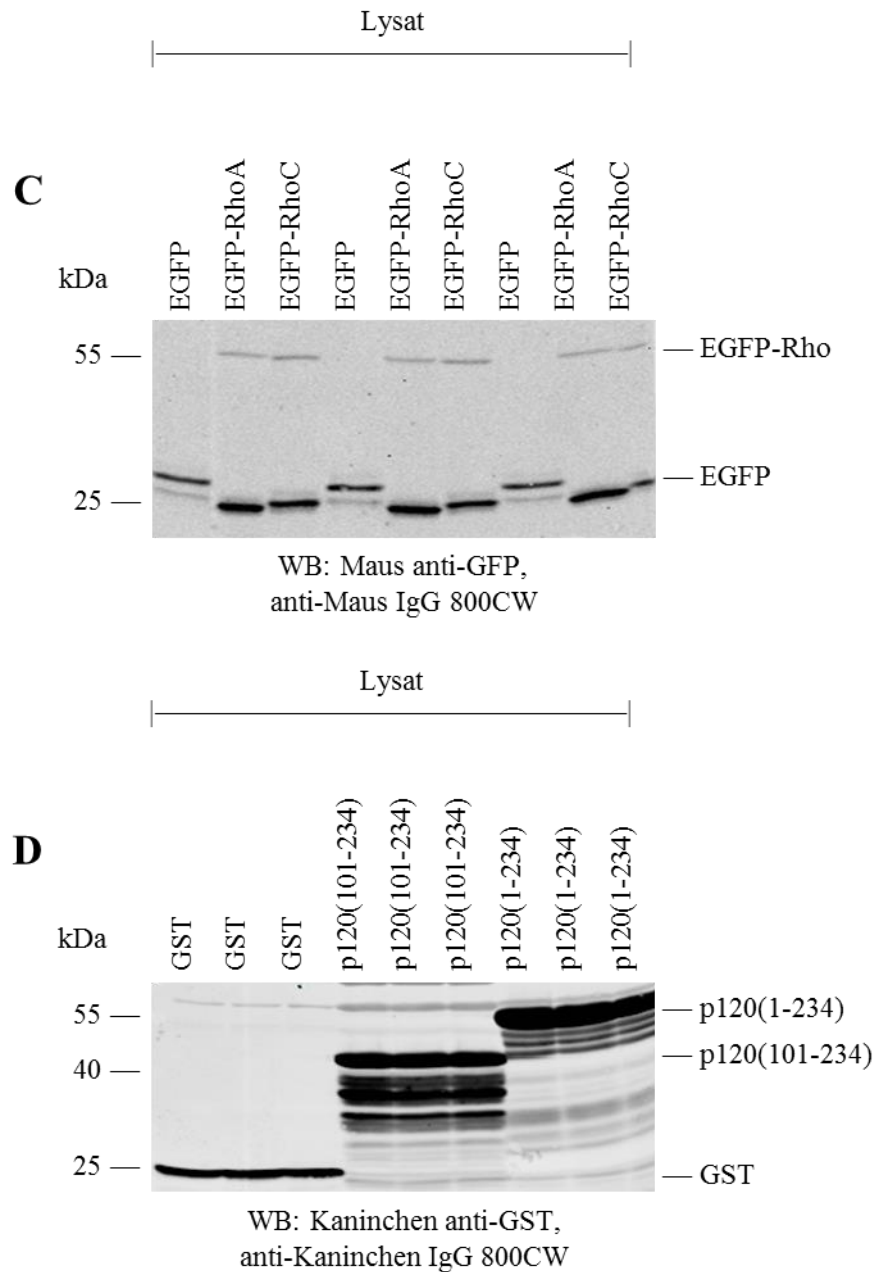


Abbildung 20: Nachweis der Interaktion von GST-p120 Cateninen mit EGFP-Rho-Fusionsproteinen unter Verwendung von anti-GFP-Antikörper und Protein G-Agarose. Für die Immunpräzipitation wurden EGFP-, EGFP-RhoA- und EGFP-RhoC-haltige PANC-1-Lysate mit Protein G und Kaninchen anti-GFP für 2 h bei 4 °C inkubiert und anschließend 4-mal mit Castano-Puffer gewaschen. Danach wurden GST-, GST-p120ctn(101-234)- [p120ctn(101-234)] und GST-p120ctn(1-234)-haltige [p120ctn(1-234)] *E. coli*-Lysate hinzugegeben und erneut für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer eluiert und die Eluate im Gel aufgetrennt. Zum Nachweis der präzipitierten EGFP-Rho-Fusionsproteine wurden aus dem Eluat 1/10 Eluat abgenommen. Vor der Präzipitation wurden aus jedem Ansatz 1/20 GST- bzw. GST-p120ctn-Lysat entnommen, um die Menge der eingesetzten GST-Proteine und GST-p120ctn-Fusionsproteine zu überprüfen. Zur Kontrolle der EGFP-Rho-Fusionsproteine wurde pro Ansatz jeweils 1/250 der eingesetzten EGFP-Rho-Lysatmenge entnommen. Alle Ansätze und Kontrolle wurden auf 10 %ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen und die aufgetrennten Proteine im Immunblotverfahren

analysiert. Der Nachweis von co-immunpräzipitiertem GST-p120ctn-Fusionsprotein erfolgte mit einem anti-GST Antikörper (Maus) und einem sekundären anti-Maus IgG 800CW Antikörper. Die eingesetzten GST-p120ctn-Proteine wurden mit einem anti-GST-Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper überprüft. Zum Nachweis der immunpräzipitierten EGFP-Rho-Proteine wurde ein anti-GFP IRDye® 800CW Antikörper eingesetzt. Die im Zelllysate enthaltenen EGFP-Rho-Proteine wurden mit einem anti-GFP-Antikörper (Roche) und einem sekundären anti-Maus IgG 800CW Antikörper nachgewiesen. **A)** Der linke Abschnitt des Immunblots zeigt co-immunpräzipitierte GST-p120ctn-Proteine. Der rechte Abschnitt des Immunblots zeigt den Nachweis der eingesetzten GST, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) Proteine. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Immunblot zeigt den Nachweis von immunpräzipitiertem EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC. Ein Proteinstandard ist links markiert. **C)** Der Immunblot zeigt, dass EGFP, EGFP-RhoA und EGFP-RhoC im Zelllysate enthalten waren. Ein Proteinstandard ist links markiert. **D)** Der Immunblot veranschaulicht, dass GST, GST-p120ctn(101-134) und GST-p120ctn(1-234) im *E. coli*-Lysat enthalten waren. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Der in Abbildung 20 B dargestellte exemplarische Immunblot von drei Versuchen zeigt, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC nicht in nachweisbaren Mengen immunpräzipitiert wurden. Es konnte keine Bindung von EGFP-Rho-Fusionsproteinen über den Kaninchen anti-GFP Antikörper, der an Protein-G-Agarose gebunden vorlag, festgestellt werden.

Aufgrund der nicht nachweisbaren Menge von präzipitiertem EGFP-Rho konnte kein co-immunpräzipitiertes GST-p120ctn nachgewiesen werden, zu sehen in Abbildung 20 A. In der Spur von GST-p120ctn(1-234) mit EGFP und EGFP-RhoA sind Banden erkennbar, jedoch handelt es sich aufgrund des fehlenden Nachweises einer Präzipitation von EGFP und EGFP-RhoA vermutlich um unspezifische Banden.

Der Immunblot in Abbildung 20 C zeigt, dass EGFP-RhoA und EGFP-RhoC in vergleichbarer Menge eingesetzt wurden. Im Vergleich dazu wurde EGFP 2-mal mehr eingesetzt. In Abbildung 20 D ist zu erkennen, dass GST-p120ctn(1-234) 2-mal mehr als GST-p120ctn(101-234) und 4-mal mehr als GST eingesetzt wurde.

Dieser und ein weiterer, hier nicht abgebildeter Versuch zeigen, dass unter den hier gewählten Versuchsbedingungen keine ausreichende Menge von EGFP-Rho präzipitiert werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass der verwendete Kaninchen anti-GFP-Antikörper für die Immunpräzipitation von EGFP-Rho nicht geeignet ist.

4.2.4.2 Interaktionsstudie von GST-p120 Cateninen mit HA-Rho-

Fusionsproteinen unter Verwendung von anti-HA Antikörper und Protein G-Agarose

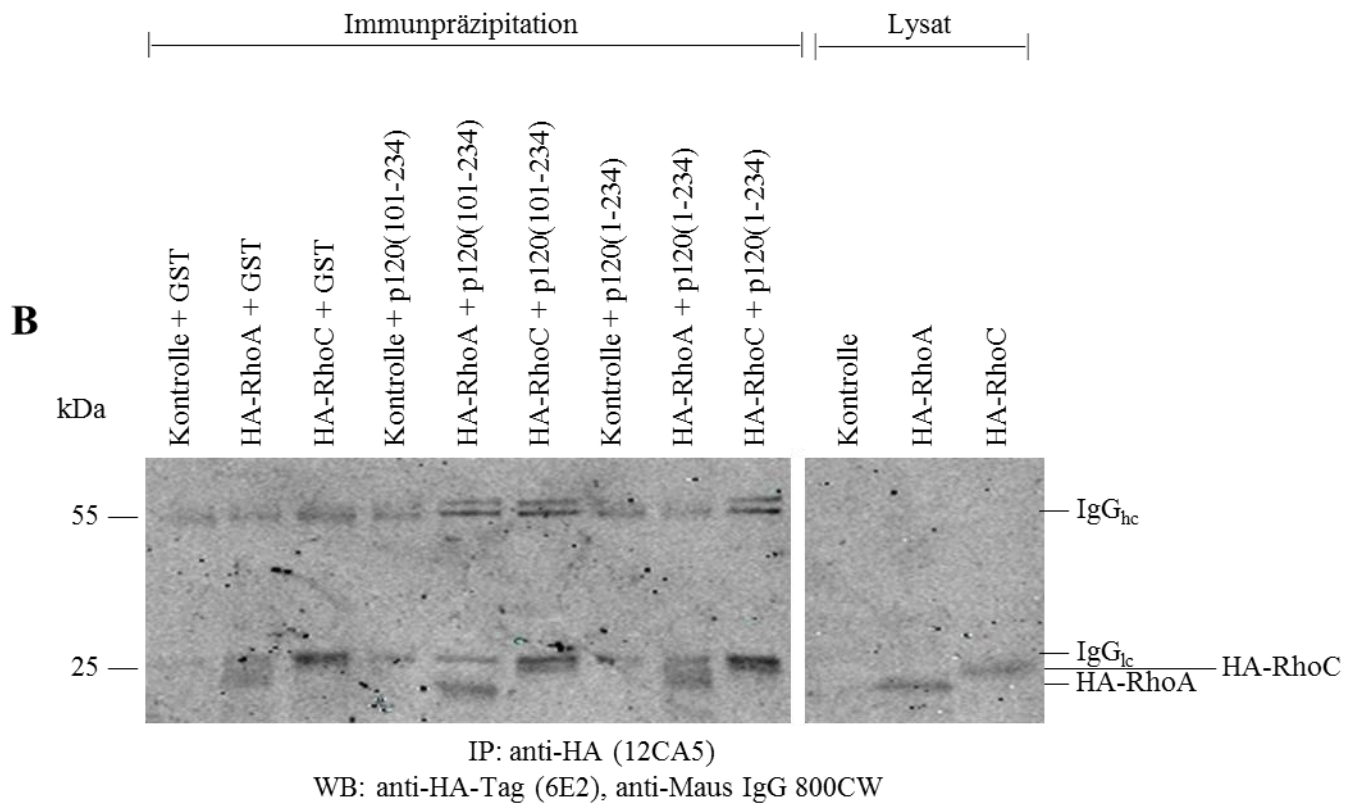
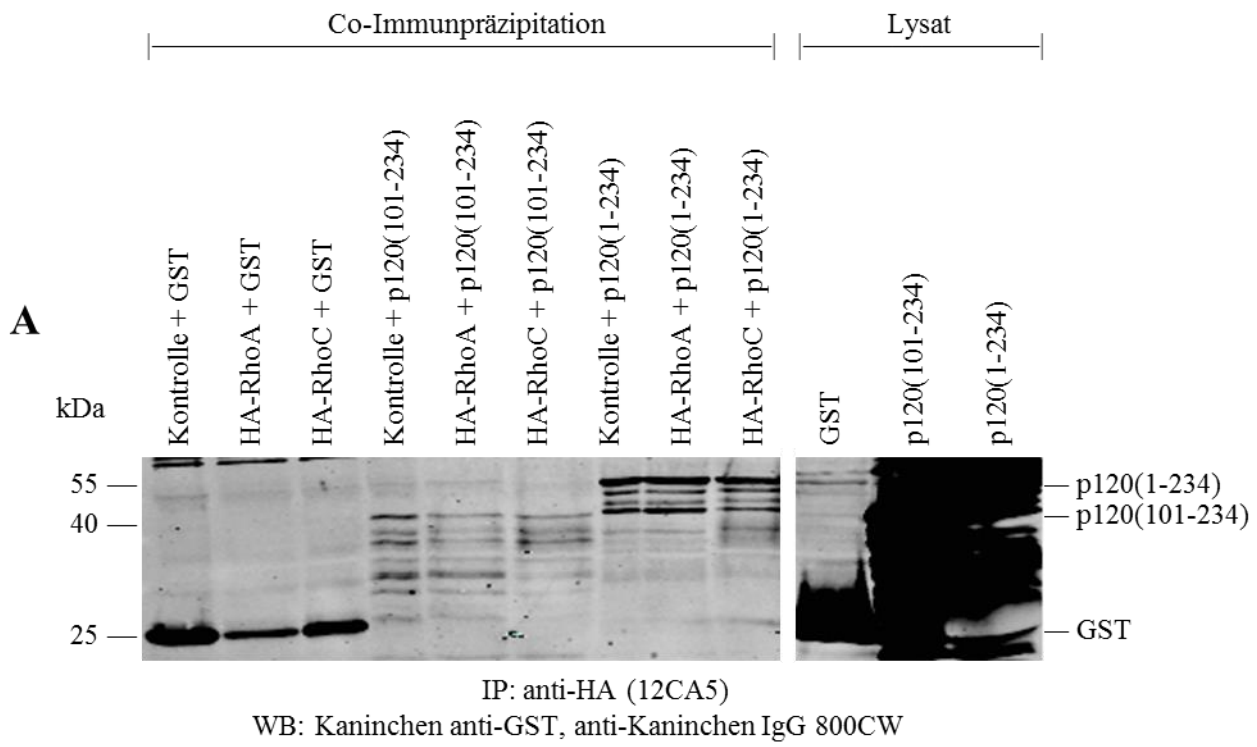
Da im vorangegangenen Versuch eine Präzipitation der Rho-GTPasen als EGFP-Rho-Fusionsprotein mit Hilfe von Protein G und einem anti-GFP Antikörper nicht erreicht werden konnte, weil vermutlich der anti-GFP Antikörper für die Präzipitation von EGFP-Rho nicht geeignet ist, wurde im folgenden Versuch ein anderer Tag an den Rho-GTPasen verwendet. Die Rho-GTPasen waren N-terminal mit einem HA-Tag versehen und für die Detektion des HA-Tags wurde ein hochspezifischer anti-HA (12CA5) Antikörper benutzt.

Für diesen Versuchsansatz wurden Zelllysate von HA-RhoA- und HA-RhoC-exprimierenden HEK293-Zellen hergestellt, siehe Kapitel 3.1.10.4. Die GST-p120ctn-Fusionsproteine wurden wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben in *E. coli* exprimiert und die Bakterien entsprechend lysiert.

Protein G und anti-HA (12CA5) Antikörper wurden für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert, um den Antikörper an Protein G zu binden. Anschließend wurde der immobilisierte Antikörper für 2 h bei 4 °C mit HA-haltigen HEK293-Lysaten inkubiert. Danach wurden die GST-p120ctn-haltigen *E. coli*-Lysate hinzugegeben und wieder für 2 h bei 4 °C inkubiert, um das p120ctn an das immobilisierte HA-Rho zu binden und damit co-immunpräzipitieren zu können.

Zur Überprüfung der eingesetzten Mengen wurden aus jedem Lysat jeweils entsprechende Mengen an Gesamtprotein entnommen. Zusätzlich wurden Kontrollen mitgeführt, die nur GST und HEK293-Zelllysate oder HA-Rho-Fusionsprotein enthielten.

Der Präzipitationsansatz wurde 4-mal mit Castano-Puffer gewaschen und sedimentiert. Die gebundenen Proteine wurden in 12,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der eingesetzten und präzipitierten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern, siehe Bildunterschrift Abbildung 21.



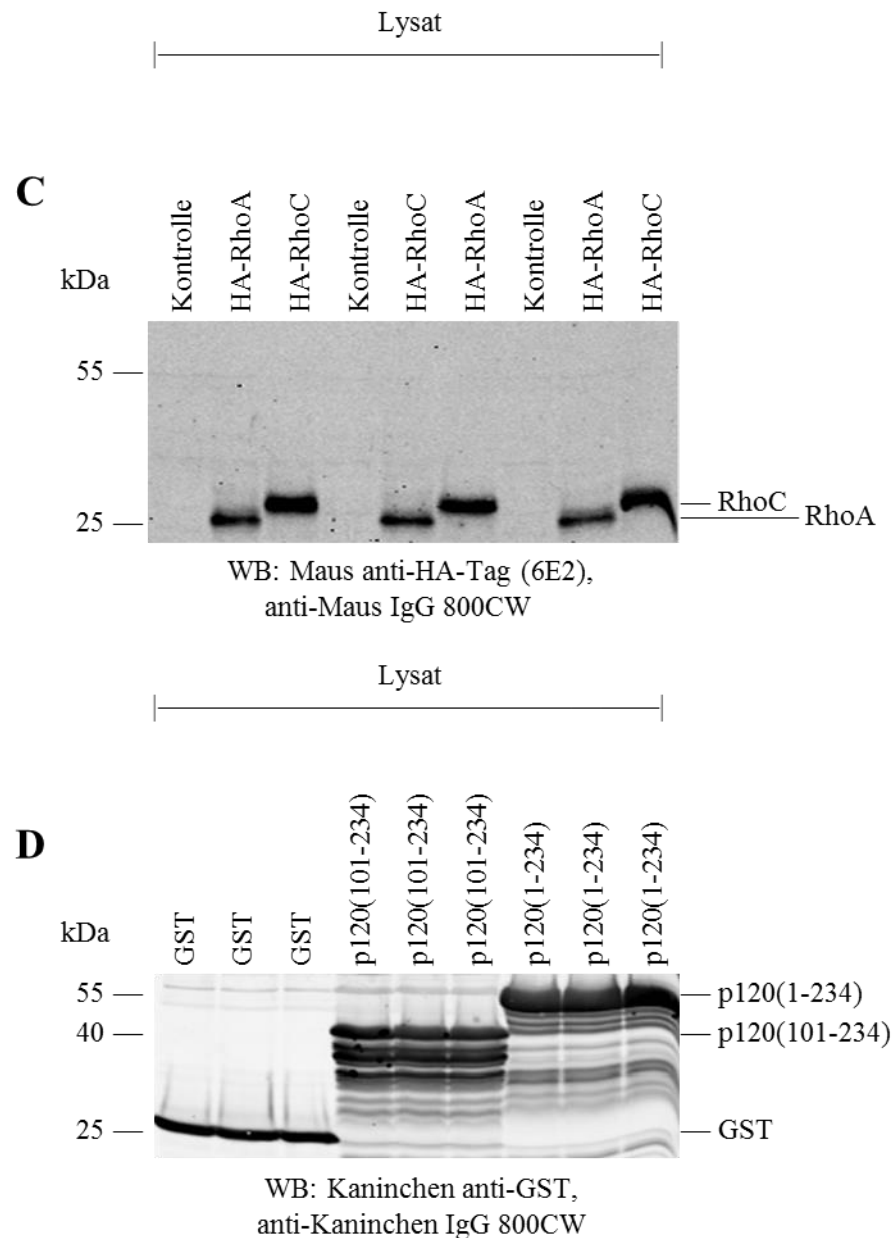


Abbildung 21: Co-Immunpräzipitation von GST-p120 Cateninen mit HA-Rho-Fusionsproteinen mit Hilfe von Protein G und anti-HA Antikörper. Für die Co-Immunpräzipitation wurden HA-RhoA und HA-RhoC aus HEK293-Zelllysaten, sowie GST, GST-p120ctn(101-234) [p120ctn(101-234)] und GST-p120ctn(1-234) [p120ctn(1-234)] aus *E. coli*-Zelllysaten verwendet. Protein G und anti-HA (12CA5) Antikörper wurden für 1 h bei 4 °C inkubiert, danach wurden HA-RhoA- und HA-RhoC-haltige Lysate hinzugegeben und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die GST-p120ctn-Fusionsprotein-haltigen Lysate hinzugegeben und erneut für 2 h bei 4 °C inkubiert. Vor der Präzipitation wurden aus jedem Ansatz 1/100 HA-Rho-Fusionsprotein entnommen, um die eingesetzte Menge an HA-Rho-Fusionsprotein zu überprüfen. Zur Kontrolle, dass in jedem Versuchsansatz die gleiche Menge GST-Protein und GST-p120ctn-Fusionsprotein enthalten waren, wurde pro Ansatz jeweils 1/20 der eingesetzten GST-p120ctn-Lysate entnommen. Zum Nachweis der präzipitierten HA-Rho-Fusionsproteine wurden aus dem Eluat 1/10 Eluat abgenommen.

Die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer eluiert, auf 12,5 %ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der co-immunpräzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine und der eingesetzten GST-p120ctn-Proteine erfolgte mit einem anti-GST-Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper. Zum Nachweis der immunpräzipitierten HA-Rho-Proteine wurden ein anti-HA-Tag (6E2) und ein sekundärer anti-Maus IgG 800CW Antikörper eingesetzt. Die im Zelllysat enthaltenen HA-Rho-Proteine wurden mit einem primären monoklonalen Anti-GFP-Antikörper (Roche) und einem sekundären anti-Maus IgG 800CW Antikörper nachgewiesen. **A)** Der Immunblot veranschaulicht co-immunpräzipitierte GST-p120ctn-Proteine. Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Immunblot zeigt immunpräzipitierte HA-Rho-Fusionsproteine. Ein Proteinstandard ist links markiert. **C)** Der Immunblot demonstriert, dass HA-RhoA und HA-RhoC im Zelllysat enthalten waren. Ein Proteinstandard ist links markiert. **D)** Der Immunblot zeigt, dass GST, GST-p120ctn(101-134) und GST-p120ctn(1-234) im Zelllysat enthalten waren. Ein Proteinstandard ist links markiert.

Auf dem Immunblot in Abbildung 21 A ist zu erkennen, dass GST-p120ctn(101-234) in Ansätzen mit HA-RhoA, HA-RhoC und der Kontrolle des HEK293-Lysates co-immunpräzipitiert wurde. GST-p120ctn(101-234) wurde stärker mit der Kontrolle des HEK293-Lysates co-immunpräzipitiert als mit den Ansätzen von HA-RhoA oder HA-RhoC. Auch die Deletionsmutante GST-p120ctn(1-234) wurde mit HA-RhoA, HA-RhoC und der Kontrolle des HEK293-Lysates co-immunpräzipitiert. Da im Versuch mehr GST-p120ctn(1-234) als GST-p120ctn(101-234) eingesetzt wurde, zu sehen in Abbildung 21 D, kann nicht beurteilt werden welche Deletionsmutante mehr mit den Rho-GTPasen co-immunpräzipitiert wurde. Ebenfalls wurde GST mit HA-RhoA, HA-RhoC und der Kontrolle des HEK293-Lysates co-immunpräzipitiert. Auf Höhe von ca. 55 kDa ist die schwere Kette des Antikörpers (IgG hc) und auf Höhe von ca. 27 kDa die leichte Kette des Antikörpers (IgG lc) zu erkennen. Unterhalb der Bande der leichten Kette des Antikörpers (IgG lc) verläuft die Bande von HA-RhoC.

In Abbildung 21 B demonstriert der Immunblot, dass HA-RhoA und HA-RhoC immunpräzipitiert wurden, wobei 4-mal so viel HA-RhoC wie HA-RhoA präzipitiert wurde.

Der Immunblot in Abbildung 21 C zeigt, dass 1,5-mal so viel HA-RhoC wie HA-RhoA im Versuch eingesetzt wurde. Im Immunblot in Abbildung 21 D ist zu erkennen, dass GST-p120ctn(1-234) 2-mal mehr als GST-p120ctn(101-234) und 4-mal mehr als GST eingesetzt wurde.

Dieser Versuch veranschaulicht, dass durch den Einsatz eines spezifischen anti-HA (12CA5) Antikörpers eine Immunpräzipitation von RhoA und RhoC nachweisbar gemacht werden konnte. Es hat sich bestätigt, dass der anti-GFP Antikörper aus dem vorherigen Versuch, Kapitel 4.2.4.1, für die Immunpräzipitation von Rho-GTPasen nicht geeignet ist.

Es fand eine Co-Immunpräzipitation beider Deletionsmutanten von GST-p120ctn mit den Rho-GTPasen statt, wobei auch eine Interaktion von GST mit HA-RhoA, HA-RhoC und der HEK293-Zelllysatskontrolle nachweisbar war. Hieraus kann gefolgert werden, dass entweder eine Interaktion von GST mit der Protein G-Agarose oder mit dem anti-HA Antikörper besteht. Auch dieses Versuchssystem war somit für die Interaktionsanalyse von GST-p120 Cateninen mit Rho-GTPasen nicht geeignet.

4.2.4.3 Immunpräzipitation von GST-RhoA bzw. GST-RhoC mit Rho-Antikörper und Co-Immunpräzipitation von GST-p120ctn

Nachdem in den bisherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass p120ctn in hoher Affinität an Protein G-Agarose bindet, wurde erneut das μ MACS System verwendet. Diesmal wurden GST-Rho-Fusionsproteine eingesetzt und ein Rho-Antikörper für die Immunpräzipitation verwendet, der sowohl RhoA als auch RhoC detektiert. Außerdem wurde die Inkubationszeit mit den Protein A μ MACS-Beads auf 30 min begrenzt, mit dem Ziel unspezifische Bindungen zu reduzieren.

In diesem Experiment wurden in *E. coli* exprimierte, gereinigte GST-RhoA und GST-RhoC Proteine verwendet, die von K. Giehl zu Verfügung gestellt wurden. Außerdem wurden die gleichen GST-120ctn-Fusionsproteine aus *E. coli*-Zelllysaten wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben benutzt.

GST-RhoA und GST-RhoC (jeweils 20 μ g) wurden mit dem anti-Rho(-A, -B, -C) Antikörper in Lysispuffer 2 für 30 min bei 4 °C inkubiert, um die Rho-GTPasen an den Rho-Antikörper zu binden. Danach wurden GST-p120ctn(101-234)-, GST-p120ctn(1-234)- und GST-p120ctn(1A)-haltige Lysate aus *E. coli* hinzugefügt und für 1,5 h bei 4 °C inkubiert, um p120ctn an Rho zu binden und damit co-immunpräzipitieren zu können. Anschließend wurden die Lysate mit Protein A μ MACS-Beads für 30 min bei 4 °C inkubiert, um den Komplex aus anti-Rho(-A, -B, -C) Antikörper, GST-Rho und GST-p120ctn an die Protein A μ MACS-Beads zu binden und präzipitieren zu können.

Anschließend wurde jeder Ansatz auf eine zuvor mit Lysispuffer 1 inkubierte μ MACS *Column* aufgetragen und die μ MACS *Column* wie in Kapitel 3.1.10.1 beschrieben behandelt, um die Menge an co-präzipitiertem GST-p120ctn analysieren zu können. Alle Ansätze und Kontrollen wurden auf 10 %ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen und danach im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der eingesetzten und präzipitierten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern, siehe Bildunterschrift Abbildung 22.

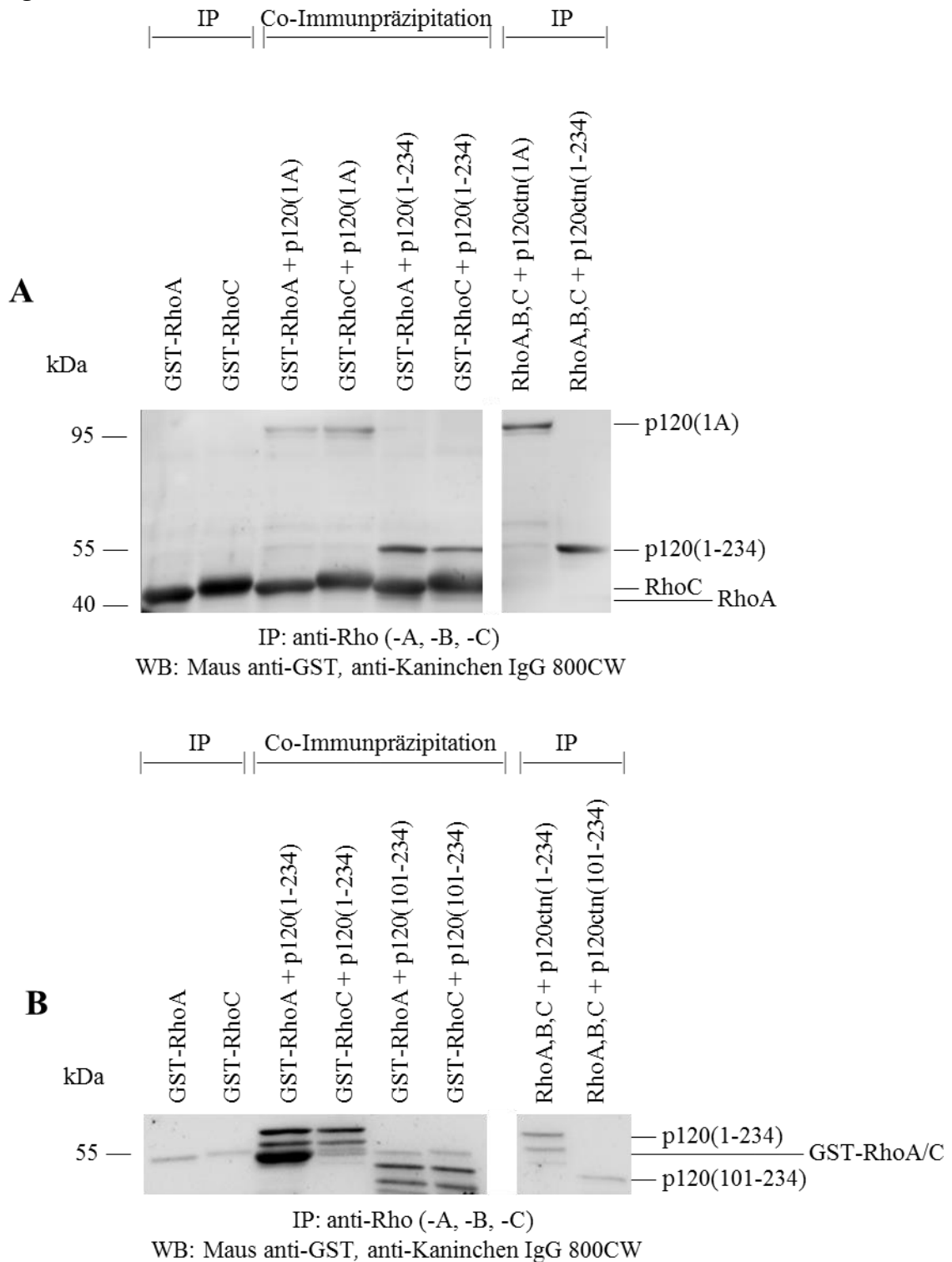


Abbildung 22: Immunpräzipitation von GST-RhoA bzw. GST-RhoC mit Rho Antikörper und Co-Immunpräzipitation von GST-p120ctn. Es wurden 20 µg gereinigtes GST-RhoA und GST-RhoC, sowie GST, GST-p120ctn(101-234) [p120ctn(101-234)], GST-p120ctn(1-234) [p120ctn(1-234)] und GST-p120ctn(1A) [p120ctn(1A)] aus *E. coli*-Zelllysaten für die Co-Immunpräzipitation verwendet. GST-RhoA bzw. RhoC wurden mit anti-Rho (-A, -B, -C) Antikörper [RhoA,B,C] für 30 min bei 4 °C mit Lysispuffer 2 inkubiert. Danach wurden die GST-p120ctn-Fusionsprotein-haltigen Lysate hinzugegeben und für 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Protein A µMACS-Beads hinzugefügt und die Ansätze für 30 min bei 4 °C inkubiert. Letztendlich wurde jeder Ansatz auf eine zuvor mit Lysispuffer 1 inkubierte µMACS Column aufgetragen und die µMACS Column mit Lysispuffer 1, Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit Elutionspuffer eluiert, auf 10 %ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen und im Immunblotverfahren analysiert. Der Nachweis der co-immunpräzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine und der immunpräzipitierten GST-Rho-Fusionsproteine erfolgte mit einem anti-Rho (-A, -B, -C) Antikörper. Die eingesetzten GST-p120ctn-Proteine wurden mit einem anti-GST-Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen IgG 800CW Antikörper nachgewiesen. **A)** Der Immunblot veranschaulicht co-immunpräzipitiertes GST-120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A) (Mitte), sowie immunpräzipitierte GST-Rho-Fusionsproteine (links) und GST-p120ctn-Fusionsproteine, die mit dem Antikörper interagiert haben (rechts). Ein Proteinstandard ist links markiert. **B)** Der Immunblot demonstriert co-immunpräzipitiertes GST-120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234) (Mitte), sowie immunpräzipitierte GST-Rho-Fusionsproteine (links) und GST-p120ctn-Fusionsproteine, die mit dem Antikörper interagiert haben (rechts). Ein Proteinstandard ist links markiert.

In Abbildung 22 A veranschaulicht der Immunblot, dass GST-p120ctn(1A) mit GST-RhoA und GST-RhoC co-immunpräzipitiert werden konnte, wobei GST-p120ctn(1A) in größerer Menge mit GST-RhoC co-immunpräzipitiert wurde. Es liegt also eine Bindung zwischen p120ctn(1A) und RhoA bzw. RhoC vor. Außerdem konnte gezeigt werden, dass RhoC stärker an p120ctn(1A) bindet als RhoA. Zusätzlich demonstriert der Immunblot, dass GST-p120ctn(1-234) in vergleichbaren Mengen mit GST-RhoA und GST-RhoC co-immunpräzipitiert werden konnte. Ein stärkeres Interaktionsverhalten von RhoC an p120ctn(1-234) als RhoA konnte nicht eindeutig belegt werden.

Auf dem Immunblot in Abbildung 22 B ist zu erkennen, dass GST-p120ctn(1-234) auch in diesem Versuch in vergleichbarer Menge mit GST-RhoA und GST-RhoC co-immunpräzipitiert werden konnte. Zusätzlich zeigt sich, dass GST-p120ctn(101-234) ebenfalls mit GST-RhoA und GST-RhoC in vergleichbarer Menge co-immunpräzipitiert wurde. Da beide Mutanten von p120ctn, p120ctn(101-234) und p120ctn(1-234), in vergleichbarer Menge mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC co-

immunpräzipitiert werden konnten, ist es möglich die Bindungsdomäne auf den Aminosäuresequenzbereich 101-234 von p120ctn einzugrenzen.

Auf dem rechten Abschnitt auf dem Immunblot 22 A und 22 B konnte veranschaulicht werden, dass GST-p120ctn(101-234), GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(1A) unspezifisch an den Rho-Antikörper binden, wobei mehr GST-p120ctn-Fusionsprotein mit GST-RhoA/C co-immunpräzipitiert wurde, als unspezifisch an den Antikörper gebunden hat.

Der linke Abschnitt auf dem Immunblot in Abbildung 22 A und 22 B zeigt, dass GST-RhoA und GST-RhoC mit dem verwendeten Rho-Antikörper in vergleichbaren Mengen präzipitiert werden konnten.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuch belegt werden, dass GST-RhoA und GST-RhoC mit Hilfe eines spezifischen Rho-Antikörpers und den Protein A μ MACS-*Beads* präzipitiert werden konnten.

Es fand eine Co-Immunpräzipitation von GST-p120ctn(1A) mit GST-RhoA und GST-RhoC statt, wobei GST-p120ctn(1A) in größerer Menge mit RhoC co-immunpräzipitiert werden konnte. Hieraus kann gefolgert werden, dass RhoC eine höhere Bindungsaffinität an p120ctn(1A) zeigt als RhoA. Außerdem fand eine Co-Immunpräzipitation von GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(101-234) mit GST-RhoA und GST-RhoC in vergleichbarer Menge statt, sodass hier kein Unterschied in der Bindungsaffinität der Deletionsmutanten von p120ctn gegenüber RhoA und RhoC festgestellt werden konnte. Schließlich konnte die Bindungsdomäne von den Rho-GTPasen RhoA und RhoC an p120ctn auf den Aminosäuresequenzbereich 101-234 auf p120ctn eingegrenzt werden. Da eine schwächere unspezifische Bindung von p120ctn an den Rho-Antikörper und an die Protein A μ MACS-*Beads* vorlag als an die Agarose- und Sepharose-Matrix, ist dieses Versuchssystem für die Interaktionsanalyse von p120ctn mit Rho-GTPasen bedingt geeignet.

5 Diskussion

Das *armadillo repeat*-Protein p120ctn gehört zur Familie der p120ctn Proteine (Reynolds *et al.*, 1992; Peifer *et al.*, 1994; Hatzfeld, 2005). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zytoskelettorganisation, indem es unter anderem an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin bindet und dadurch den für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Cadherin-Catenin-Komplex an *adherens junctions* stabilisiert (Yap *et al.*, 1998; Thoreson *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2003). Auf die Interaktion von p120ctn mit E-Cadherin nimmt unter anderem die Rho-GTPase RhoA Einfluss, welche in einem aktiven Zustand die von p120ctn induzierte Ausbildung eines *dendritic phenotype* inhibieren kann (Reynolds *et al.*, 1996; Noren *et al.*, 2000; Grosheva *et al.*, 2001). Die Arbeitsgruppen von K. Giehl und A. Ridley konnten in *in vitro*-Bindungsexperimenten erstmals eine Interaktion der Rho-GTPase RhoC mit p120ctn feststellen, welche zu RhoA eine Aminosäuresequenzidentität von 92 % aufweist (Wheeler und Ridley, 2004; Liska, 2009). Die Rho-GTPasen RhoA und RhoC sind Mitglieder der Ras-Superfamilie (Bishop und Hall, 2000), die ebenfalls an der Regulation der Organisation des Zytoskelettes und Zellmigration beteiligt sind (Bishop und Hall, 2000; Jaffe und Hall, 2005; Heasman und Ridley, 2008). Dabei können die Rho-GTPasen zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven, GTP-gebunden Zustand wechseln und durch die Signalübertragung von extrazellulären Signalen zu intrazellulären Effektorproteinen als molekulare Schalter agieren (Ridley und Hall, 1992). Obwohl RhoA und RhoC eine hohe Sequenzidentität ihrer Aminosäuren aufweisen zeigen sie in der Regulation von Invasion und Migration von Tumorzellen funktionelle Unterschiede (Ridley, 2013; Orgaz *et al.*, 2014). In den von M. Liska durchgeführten Experimenten in der Arbeitsgruppe von K. Giehl zeigte p120ctn eine höhere Affinität zu RhoC, was auf eine unterschiedliche Aminosäure auf Position 152 bei RhoC zurückzuführen ist. Der Aktivitätszustand, und damit das gebundene Nukleotid der Rho-GTPasen RhoA und RhoC, hatte keinen Einfluss auf die Interaktion mit p120ctn (Liska, 2009). Castano und seine Arbeitsgruppe konnte durch Verwendung unterschiedlicher Deletionsmutanten von p120ctn eine Interaktion mit der Rho-GTPase RhoA feststellen und den Bereich der Bindungsdomäne auf p120ctn für RhoA bereits auf den Aminosäuresequenzbereich 101-234 eingrenzen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Tyrosinkinasen Src, Fer und Fyn durch Phosphorylierung der

regulatorischen Domäne von p120ctn das Bindungsverhalten gegenüber Rho-GTPasen verändern können (Castano *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht eine biochemische Methode zum Nachweis einer möglichen differentiellen Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC zu etablieren und die Bindungsdomäne auf p120ctn weiter einzugrenzen.

5.1 Nachweis der Interaktion von p120ctn mit RhoA und RhoC mit Hilfe von anti-GST- μ MACS-Beads und Glutathion-Sepharose-Beads

Für die Interaktionsanalyse von p120ctn mit der Rho-GTPase RhoC wurde zunächst das GST- μ MACS-System unter Verwendung von anti-GST- μ MACS-Beads benutzt. In den durchgeführten Versuchen mit diesem Versuchssystem zeigte sich, dass EGFP-RhoC in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mengen nicht mit den Mutanten von p120ctn, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234), co-immunpräzipitiert werden konnte. Es konnte mit dem GST- μ MACS-System unter Verwendung von anti-GST- μ MACS-Beads somit keine Interaktion von p120ctn mit der Rho-GTPase RhoC festgestellt werden. Die GST-p120ctn-Fusionsproteine konnten mit Hilfe der anti-GST- μ MACS-Beads nur in sehr geringen Mengen immunpräzipitiert werden, deshalb wurde als nächstes auf ein Versuchssystem mit Glutathion-Sepharose-Beads gewechselt mit dem Ziel, höhere Mengen von GST-p120ctn zu präzipitieren und somit auch nachweisbare Mengen von co-präzipitiertem EGFP-RhoC erreichen zu können.

In den folgenden Bindungsexperimenten mit Glutathion-Sepharose-Beads konnte eine Interaktion von RhoC mit der Mutante p120ctn(1-234) festgestellt werden. Die Menge der präzipitierten GST-p120ctn-Fusionsproteine war unter Verwendung der Glutathion-Sepharose-Beads im Vergleich zu den anti-GST- μ MACS-Beads für eine Interaktion mit EGFP-RhoC ausreichend. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von K. Giehl, die in *in vitro*-Bindungsexperimenten erstmals eine Interaktion der Rho-GTPase RhoC mit p120ctn nachweisen konnte (Liska, 2009). Allerdings ergab sich bei diesen Interaktionsanalysen, dass auch eine Bindung von EGFP-RhoC an GST nachgewiesen wurde, die jedoch im Vergleich geringer war als die Interaktion mit p120ctn. Es konnte experimentell außerdem gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen RhoC und GST bestand. Zwischen EGFP und GST wurde keine Bindung

dokumentiert. Es wurde vermutet, dass die Interaktion zwischen der Rho-GTPase und GST durch die Pufferbindungen des Versuches begünstigt wurden, deshalb wurden in späteren Bindungsstudien zahlreiche Variationen u. a. an den Pufferbedingungen ausprobiert. Prinzipiell schien das Versuchssystem mit Glutathion-Sepharose-*Beads* für die Interaktionsstudien der Rho-GTPasen RhoA und RhoC mit p120ctn durch den bereits erfolgten Nachweis der Interaktion von RhoC mit der Mutante p120ctn(1-234) geeignet zu sein. Auch wenn eine Interaktion der Rho-GTPase mit GST vorlag, war die Bindung zwischen der Rho-GTPase und p120ctn deutlich stärker ausgeprägt und deutlich nachweisbar.

In nachfolgenden Versuchen wurde die Bindungsdomäne von p120ctn an RhoC eingegrenzt. Hierfür wurden zwei unterschiedlich lange Mutanten von p120ctn, p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234), verwendet. Für beide Mutanten konnte eine Interaktion mit RhoC nachgewiesen werden, sodass der Bereich der Bindungsdomäne für RhoC auf p120ctn erstmals auf den Aminosäuresequenzbereich von 101-234 eingegrenzt werden konnte. Diese Versuche mit der Rho-GTPase RhoC wurden in Anlehnung an die Daten von Castano und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt, die unter Verwendung unterschiedlich langer Mutanten von p120ctn die Bindungsdomäne auch für die Rho-GTPase RhoA auf p120ctn auf den Aminosäuresequenzbereich von 101-234 eingrenzen konnten (Castano *et al.*, 2007). An welche der beiden Mutanten von p120ctn RhoC stärker bindet konnte mit diesem Versuchssystem allerdings nicht eindeutig geklärt werden, da mit dem verwendeten Versuchssystem GST-p120ctn(1-234) und EGFP-RhoC auf der gleichen Höhe von 55 kDa liefen und die Auftrennung von EGFP-RhoC aufgrund der hohen Proteinmenge von GST-p120ctn(1-234) beeinträchtigt wurde und somit eine Quantifizierung nicht möglich war.

In den bisher durchgeführten Interaktionsanalysen mit Glutathion-Sepharose-*Beads* lag eine unerwünschte Interaktion zwischen RhoC und GST vor. In den publizierten Interaktionsstudien von Castano und seiner Arbeitsgruppe konnte in Bindungsexperimenten eine Interaktion von p120ctn mit RhoA ohne Nachweis ungewollter Interaktionen festgestellt werden (Castano *et al.*, 2007). Hierfür hatte Castano in *E. coli* exprimierte GST-RhoA und GST-p120ctn-Mutanten verwendet, die er mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-*Beads* immobilisierte und schließlich im Westernblotverfahren analysierte. Weitere Details zu den Versuchsbedingungen wurden von Castano und seinen Mitarbeitern leider nicht genannt (Castano *et al.*, 2007). In den

folgenden Interaktionsstudien wurde deshalb experimentell versucht durch Veränderung der Versuchs- und Inkubationsbedingungen die unerwünschte Interaktion zwischen RhoC und GST zu reduzieren.

5.1.1 Optimierung der Versuchs- und Inkubationsbedingungen mit Glutathion-Sepharose-Beads

Zur Reduktion der Interaktion von RhoC und GST wurden zahlreiche Veränderungen der Versuchs- und Inkubationsbedingungen bei Interaktionsanalysen mit Glutathion-Sepharose-Beads getestet, die in der vorliegenden Arbeit exemplarisch dargestellt worden sind. So wurden die Puffer variiert, um durch veränderte Salzkonzentrationen ionische Wechselwirkungen zu reduzieren und durch Detergenzienzusatz die Hydrophilie zu erhöhen. Außerdem wurde die Reihenfolge der Inkubationsschritte verändert, um eine Bindung von p120ctn und den Rho-GTPasen RhoA und RhoC vor der Immobilisierung an die Glutathion-Sepharose-Beads zu erreichen und dadurch unspezifische Bindungen zu reduzieren. Auch wurden Veränderungen bei der Anzahl der Waschschrte vorgenommen. Schließlich wurden verschiedene Strategien zur Optimierung der Inkubationsbedingungen angewendet, indem die Inkubationszeiten und die Inkubationstemperaturen verändert wurden. Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Versuche, dass durch Veränderungen der Versuchs- und Inkubationsbedingungen mit Glutathion-Sepharose-Beads die Interaktion von RhoA und RhoC mit GST nicht substantiell reduziert werden konnte. Das verwendete Versuchssystem ist somit für differentielle und quantitative Interaktionsanalysen von p120ctn mit Rho-GTPasen nicht geeignet. Die von Castano und seiner Arbeitsgruppe (Castano *et al.*, 2007)-beschriebenen Interaktionsanalysen von p120ctn mit RhoA mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Beads ohne Nachweis unerwünschter Interaktionen konnten in den durchgeführten Experimenten leider nicht bestätigt werden.

5.1.2 Identifikation von p120ctn als Interaktionspartner von RhoA mit Glutathion-Sepharose-Beads

Als abschließender Versuch zu den Interaktionsanalysen von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Beads konnte eine Interaktion von p120ctn mit der Rho-GTPase RhoA festgestellt werden. Außerdem

wurde zum ersten Mal das *full length* p120ctn(1A) als GST-Fusionsprotein verwendet, für das eine Bindung an RhoA und RhoC festgestellt werden konnte. Die Interaktion der Rho-Fusionsproteine mit den beiden Deletionsmutanten von p120ctn, GST-p120ctn(101-234) und GST-p120ctn(1-234), war jedoch schwächer als die Interaktion mit p120ctn(1A) und aufgrund der starken Interaktion mit GST kann keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden, ob es sich hierbei um eine Rho- oder GST-vermittelte spezifische Interaktion handelt.

5.1.3 Fazit

In den hier dargestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Glutathion-Sepharose-Beads für Interaktionsanalysen von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC besser als GST- μ MACS-Beads geeignet sind, da es möglich ist mit Hilfe der Glutathion-Sepharose-Beads eine größere Menge an GST-p120ctn zu präzipitieren. Die Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads war für den Nachweis einer Interaktion von p120ctn mit Rho-GTPasen nur eingeschränkt geeignet, da die Interaktion zwar nachgewiesen werden konnte, aber unspezifische Interaktionen trotz zahlreicher Veränderungen an den Versuchsbedingungen bestanden blieben. Die folgenden Versuche hatten deshalb das Ziel, durch den Einsatz anderer Methoden die Interaktion von Rho und GST zu eliminieren und somit eine spezifische Methode zur vergleichenden Analyse der Interaktion von p120ctn und den Rho-GTPasen, sowie zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne zu etablieren.

5.2 Nachweis der Interaktion von p120ctn und Rho-GTPasen mit Protein G-Agarose und Antikörpern

Da die bisher durchgeführten Interaktionsanalysen von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC unter Verwendung von Glutathion-Sepharose-Beads, obwohl von Castano und seinen Mitarbeitern publiziert (Castano *et al.*, 2007), keine geeignete Methodik für den Nachweis einer differentiellen Interaktion darstellten, wurde ein Versuchssystem mit Protein G-Agarose und einem anti-GFP-Antikörper angewandt. Hierbei wurde eine neue Präzipitationsreihenfolge verwendet, bei der EGFP-Rho nicht wie bisher durch die Bindung an p120ctn co-immunpräzipitiert wurde, sondern EGFP-Rho direkt durch Bindung an den anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert und p120ctn als GST-p120ctn-Fusionsprotein durch Interaktion mit Rho co-immunpräzipitiert

werden sollte. In den durchgeführten Experimenten konnte EGFP-RhoA und EGFP-RhoC jedoch nicht in ausreichender Menge mit dem anti-GFP-Antikörper, der an Protein-G Agarose gebunden vorlag, immunpräzipitiert werden. Eine Interaktion von p120ctn mit Rho konnte deshalb nicht nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass der verwendete Kaninchen anti-GFP-Antikörper für die Immunpräzipitation von EGFP-Rho nicht geeignet ist.

In einem folgenden Versuchssystem wurde deshalb ein anderer Antikörper, anti-HA (12CA5) Antikörper, verwendet. Dafür wurden die Rho-GTPasen RhoA und RhoC N-terminal mit einem HA-Tag versehen, um eine Interaktion mit dem an Protein G-Agarose gebundenen anti-HA (12CA5) Antikörper und damit eine Immunpräzipitation von Rho zu ermöglichen. In dem durchgeführten Versuchssystem fand eine Co-Immunpräzipitation beider Mutanten von p120ctn, GST-p120ctn(1-234) und GST-p120ctn(101-234), mit HA-RhoA und HA-RhoC statt, eine Interaktion zwischen p120ctn und RhoA bzw. RhoC konnte somit nachgewiesen werden. Allerdings war mit dieser Methodik auch eine Interaktion von GST mit HA-RhoA, HA-RhoC und HEK293-Zelllysatkontrolle nachweisbar. Hieraus kann gefolgert werden, dass entweder eine Interaktion von GST mit der Protein G-Agarose oder mit dem anti-HA (12CA5) Antikörper besteht. Auch dieses Versuchssystem war somit für die Interaktionsanalyse von GST-p120ctn Cateninen mit Rho-GTPasen nicht geeignet.

5.3 Nachweis der Interaktion von p120ctn und Rho-GTPasen mit dem GST- μ MACS-System mit Hilfe von Protein A μ MACS-Beads und Eingrenzung der Bindungsdomäne auf p120ctn

Nachdem die bisher verwendeten Versuchssysteme für die Interaktionsanalyse von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC aufgrund der Interaktion von Rho mit GST und Protein G-Agarose nur bedingt oder gar nicht geeignet waren, wurde erneut das μ MACS-System verwendet. In diesem Versuch wurden erstmalig aufgereinigte GST-Rho-Fusionsproteine eingesetzt und ein Rho-Antikörper für die Immunpräzipitation verwendet, der an RhoA und RhoC bindet. Außerdem wurden Protein A μ MACS-Beads verwendet. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit mit den

Protein A μ MACS-*Beads* auf 30 min begrenzt, mit dem Ziel unspezifische Protein-Bindungen zu reduzieren.

Mit diesem Versuchssystem konnte gezeigt werden, dass p120ctn mit RhoA und RhoC interagiert. Das *full length* p120ctn(1A) hat in größerer Menge an RhoC als an RhoA gebunden woraus gefolgert werden kann, dass RhoC eine höhere Bindungsaffinität an p120ctn(1A) zeigt als RhoA. Außerdem fand eine Interaktion zwischen den Mutanten p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234) mit RhoA und RhoC statt, wobei dies in vergleichbarer Menge nachgewiesen wurde. Es liegt somit kein Unterschied in der Bindungsaffinität der Mutanten p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234) gegenüber RhoA und RhoC vor. Schließlich konnte auch mit dem μ MACS-System die Bindungsdomäne der Rho-GTPasen RhoA und RhoC an p120ctn auf den Aminosäuresequenzbereich 101-234 auf p120ctn eingegrenzt werden, da p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234) mit RhoA und RhoC in vergleichbarer Menge eine Bindung eingegangen sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die höhere Affinität von RhoC zu p120ctn durch Aminosäuren außerhalb der eigentlichen Bindungsdomäne bestimmt werden und die Konformität des *full length* p120ctn Proteins eine differentielle Interaktion mit RhoA und RhoC bedingen könnte.

Da eine schwächere unspezifische Bindung von p120ctn an den Rho-Antikörper und an die Protein A μ MACS-*Beads* als an die Agarose- und Sepharose-Matrix vorlag, ist dieses Versuchssystem für die Interaktionsanalyse von p120ctn mit Rho-GTPasen bedingt geeignet.

5.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, wie schwierig es ist ein ausreichend sensitives und reproduzierbares Versuchssystem zu etablieren, mit dem *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt werden können. Zu berücksichtigen sind hierbei u. a. die Mengen der eingesetzten Proteine, die Pufferbedingungen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen und Detergenzienzusätzen, die Inkubationsreihenfolgen und Inkubationszeiten, die Temperatur, die Affinität der Interaktionspartner zueinander und zum Antikörper oder der Matrix und die Funktionalität und Konformation der Proteine. Auch sterische Effekte durch die Größe des Tags müssen berücksichtigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchssysteme waren leider nur bedingt oder gar nicht für die Interaktionsanalyse von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC geeignet. So konnte mit dem GST- μ MACS-System unter Verwendung von anti-GST- μ MACS-*Beads* keine Interaktion zwischen den Rho-GTPasen und p120ctn nachgewiesen werden. In anderen Versuchssystemen konnten RhoA und RhoC aufgrund eines ungeeigneten Antikörpers nicht in ausreichender Menge immunpräzipitiert werden. Schließlich wurden in den Bindungsexperimenten mit Glutathion-Sepharose-*Beads* unerwünschte Interaktionen festgestellt, die sich auch durch Veränderung der Versuchs- und Inkubationsbedingungen nicht signifikant reduzieren ließen.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC interagiert. Auch konnte bezeugt werden, dass sich die Bindungsdomäne für RhoA und RhoC auf p120ctn auf dem Aminosäuresequenzbereich 101-234 befindet. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, ob die Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC durch weitere Änderungen der Versuchsbedingungen oder durch Verwendung anderer Versuchssysteme detaillierter und quantitativer nachweisbar ist.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Identifizierung und biochemische Charakterisierung von p120ctn als Interaktionspartner der Rho-GTPasen RhoA und RhoC *in vitro* und in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 untersucht. p120ctn ist ein *armadillo repeat*-Protein aus der Familie der p120ctn Proteine und stabilisiert durch seine Bindung an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin den für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Cadherin-Catenin-Komplex an *adherens junctions*. Auf die Interaktion von p120ctn mit Cadherinen nehmen u. a. die Rho-GTPasen RhoA und RhoC Einfluss, die Mitglieder der Ras-Superfamilie sind und eine Aminosäuresequenzidentität von 92 % aufweisen. Castano und seine Mitarbeiter konnten bereits eine Interaktion von p120ctn mit RhoA nachweisen und die Bindungsdomäne auf p120ctn für RhoA auf den Aminosäuresequenzbereich 101-234 eingrenzen. In der Arbeitsgruppe von K. Giehl konnte erstmals eine Interaktion von RhoC mit p120ctn dokumentiert werden und eine unterschiedlich große Affinität der beiden Rho-GTPasen RhoA und RhoC gegenüber p120ctn festgestellt werden, was auf eine unterschiedliche Aminosäure auf Position 152 bei RhoC zurückzuführen ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine spezifische Methode zur vergleichenden Analyse der Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC zu entwickeln und die Bindungsdomäne auf p120ctn weiter einzugrenzen. Hierfür wurde zunächst das GST- μ MACS-System verwendet, welches aufgrund einer zu geringen Präzipitation von p120ctn für eine Co-Immunpräzipitation von Rho nicht geeignet war. Mit Hilfe des GST-Glutathion-Sepharose-Systems konnte eine Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC bestätigt werden. Außerdem konnte erstmals die Bindungsdomäne von p120ctn für RhoC auf den Aminosäuresequenzbereich 101-234 eingegrenzt werden. Bei den durchgeführten Experimenten mit dem GST-Glutathion-Sepharose-System zeigte sich jedoch ebenfalls eine unerwünschte Interaktion zwischen Rho und GST, die auch durch zahlreiche Variationen der Versuchsbedingungen nicht eliminiert werden konnte, sodass weitere Versuchssysteme analysiert wurden. Es wurden Interaktionsstudien mit Protein G-Agarose und einem anti-GFP-Antikörper durchgeführt, um die Präzipitationsreihenfolge von p120ctn und den Rho-GTPasen zu verändern, was nicht zu einem Nachweis der Interaktion führte. Aufgrund einer unspezifischen Bindung von p120ctn an den Rho-Antikörper und die

Protein A μ MACS-*Beads* war jedoch auch dieses Versuchssystem nur bedingt geeignet. Außerdem wurden Versuchssysteme mit einem anti-HA (12CA5) Antikörper und HA-markierten Rho-GTPasen angewendet, die zwar zum Nachweis einer Interaktion zwischen p120ctn und den Rho-GTPasen führten, aber ebenfalls unspezifische Protein-Interaktionen aufwiesen. Schließlich wurden erstmalig aufgereinigte GST-Rho-Fusionsproteine im GST- μ MACS-System eingesetzt und hiermit konnte die Interaktion zwischen p120ctn und RhoA bzw. RhoC bestätigt und eine höhere Bindungsaffinität von RhoC gegenüber p120ctn(1A) als RhoA nachgewiesen werden. Der Aminosäuresequenzbereich auf p120ctn konnte mit Hilfe des GST- μ MACS-Systems für RhoA und RhoC auf 101-234 eingegrenzt werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit die Komplexität, ein ausreichend sensitives und reproduzierbares Versuchssystem unter Berücksichtigung der zahlreichen auf ein Experiment einflussnehmenden Faktoren zu etablieren. Eine Interaktion von p120ctn mit den Rho-GTPasen RhoA und RhoC konnte bestätigt werden und die Bindungsdomäne auf p120ctn auf den Aminosäuresequenzbereich 101-234 eingegrenzt werden.

7 Abstract

This dissertation investigates the identification and biochemical characterization of p120ctn as an interaction partner of the Rho GTPases RhoA and RhoC *in vitro* and in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. p120ctn is an armadillo repeat protein from the family of p120ctn proteins and, through its binding to the cytoplasmic domain of E-cadherin, it stabilizes the cadherin-catenin complex on adherens junctions, which is important for cell-cell adhesion. The Rho GTPases RhoA und RhoC influence the interaction of p120ctn with cadherins. RhoA and RhoC are members of the Ras superfamily with an amino acid sequence identity of 92 %. Castano and his team were already able to detect an interaction of p120ctn with RhoA and to narrow the binding domain to p120ctn for RhoA to the amino acid sequence range 101-234. In the team of K. Giehl, an interaction of RhoC with p120ctn has been documented for the first time and a different affinity of the two Rho GTPases RhoA and RhoC against p120ctn could be determined, which is due to a different amino acid at position 152 in RhoC.

The aims of the dissertation were first, to develop a specific method for the comparative analysis of the interaction of p120ctn with the Rho GTPases RhoA and RhoC and second, to further narrow the binding domain to p120ctn. For this purpose, the GST- μ MACS system was initially used. However, this was not suitable for co-immunoprecipitation of Rho due to too low precipitation of p120ctn. Using the GST-Glutathion-Sepharose system, an interaction of p120ctn with the Rho GTPases RhoA and RhoC was confirmed. In addition, for the first time the binding domain of p120ctn for RhoC was limited to the amino acid sequence range from 101-234. However, the experiments performed with the GST-Glutathion-Sepharose system revealed an undesirable interaction between Rho and GST, which could not be eliminated despite numerous variations of the experimental conditions. As such further experimental systems were analyzed. Interaction studies were performed with protein G agarose and an anti-GFP antibody to alter the precipitation order of p120ctn and the Rho GTPases. This did not result in confirming the interaction. However, due to an unspecific binding of p120ctn to the Rho antibody and the protein A μ MACS beads this experimental system was only partially suitable. In addition, experimental systems were used with an anti-HA (12CA5) antibody and HA-tagged Rho GTPases, which, while demonstrating an interaction between p120ctn and the Rho GTPases, also exhibit non-specific protein interactions. Finally, purified GST-Rho fusion proteins were used for the first time in the GST- μ MACS system, confirming the interaction between p120ctn and RhoA or RhoC and demonstrating a higher binding affinity of RhoC than RhoA to p120ctn(1A). The amino acid sequence range on p120ctn could be narrowed to 101-234 using the GST- μ MACS system for RhoA and RhoC.

In summary, this dissertation demonstrates the complexity of establishing a sufficiently sensitive and reproducible experimental system, taking into account the numerous factors influencing an experiment. An interaction of p120ctn with the Rho GTPases RhoA and RhoC could be confirmed and the binding domain to p120ctn restricted to the amino acid sequence range 101-234.

8 Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freies PBS
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CP	Präzipitation
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DTT	1,4-Dithio-DL-threit(ol)
DMEM	<i>Dulbecco's-Modified Eagle Medium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EMT	<i>epithelial to mesenchymal transition</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	Fötales Bovines Serum

g	Erdbeschleimigung
G418	Genitacin 418-Sulfat
GAPs	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEFs	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
Gr.	Größe
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPA	Lysophosphatidsäure
M	Mol
min	Minuten
m/V	Masse pro Volumen
NBT	4-Nitroblau Tetrazolium Chlorid

NP40	Nonidet-P40 Substitute
p120ctn	p120 Catenin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
RhoGDIs	<i>Rho GDP dissociation inhibitors</i>
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sog.	sogenannte
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>Tween®20</i>	Polyoxymethylensorbitan-monolaurat
u. a.	unter anderem
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
V/V	Volumenanteil
WB	Westernblot
z. B.	zum Beispiel

9 Anhang: cDNA und Aminosäuresequenzen von p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234), sowie Aminosäuresequenz von p120ctn(1A)

Dargestellt sind die cDNA und Aminosäuresequenzen der verwendeten p120ctn Mutanten p120ctn(1-234) und p120ctn(101-234), sowie die Aminosäuresequenz von p120ctn(1A).

1) cDNA und Aminosäuresequenz von p120ctn(1-234).

1	ATG	GAC	GAC	TCA	GAG	GTG	GAG	TCA	ACC	GCC	AGC	ATC	TTG	GCC
1	M	D	D	S	E	V	E	S	T	A	S	I	L	A
43	TCT	GTG	AAG	GAA	CAA	GAG	GCC	CAG	TTT	GAG	AAG	CTG	ACC	CGG
15	S	V	K	E	Q	E	A	Q	F	E	K	L	T	R
85	GCG	CTG	GAG	GAG	GAA	CGG	CGC	CAC	GTC	TCG	GCG	CAG	CTG	GAA
29	A	L	E	E	E	R	R	H	V	S	A	Q	L	E
127	CGC	CTC	CGG	GTC	TCA	CCA	CAA	GAT	GCC	AAC	CCA	CTC	ATG	GCC
43	R	V	R	V	S	P	Q	D	A	N	P	L	M	A
169	AAC	GGC	ACA	CTC	ACC	CGC	CGG	CAT	CAG	AAC	GGC	CGG	TTT	GTG
57	N	G	T	L	T	R	R	H	Q	N	G	R	F	V
211	GGC	GAT	GCT	GAC	CCT	GAA	AGA	CAG	AAA	TTT	TCA	GAT	TTG	AAA
71	G	D	A	D	P	E	R	Q	K	F	S	D	L	K
253	CTC	AAC	GGA	CCC	CAG	GAT	CAC	AGT	CAC	CTT	CTA	TAT	AGC	ACC
85	L	N	G	P	Q	D	H	S	H	L	L	Y	S	T
295	ATC	CCC	AGG	ATG	CAG	GAG	CCG	GGG	CAG	ATT	GTG	GAG	ACC	TAC
99	I	P	R	M	Q	E	P	G	Q	I	V	E	T	Y
337	ACG	GAG	GAG	GAT	CCT	GAG	GGA	GCC	ATG	TCT	GTA	GTC	TCT	GTG
113	T	E	E	D	P	E	G	A	M	S	V	V	S	V
379	GAG	ACC	TCA	GAT	GAT	GGG	ACC	ACT	CGG	CGC	ACA	GAG	ACC	ACG
127	E	T	S	D	D	G	T	T	R	R	T	E	T	T
421	GTC	AAG	AAA	GTA	GTG	AAG	ACT	GTG	ACA	ACA	CGG	ACA	GTA	CAG
141	V	K	K	V	V	K	T	V	T	T	R	T	V	Q
463	CCA	GTC	GCT	ATG	GGA	CCA	GAC	GGG	TTG	CCT	GTG	GAT	GCT	TCA
155	P	V	A	M	G	P	D	G	L	P	V	D	A	S

505 TCA GTT TCT AAC AAC TAT ATC CAG ACT TTG GGT CGT GAT TTC
 169 S V S N N Y I Q T L G R D F

 547 GCG AAG AAT GGC AAT GGG GGA CCT GGT CCC TAT GTG GGG CAA
 183 R K N G N G G P G P Y V G Q

 589 GCT GGC ACT GCT ACC CTT CCT AGG AAC TTC CAC TAC CCT CCT
 197 A G T A T L P R N F H Y P P

 631 GAT GGT TAT AGT CGC CAC TAT GAA GAT GGT TAT CCA GGT GGC
 211 D G Y S R H Y E D G Y P G G

 673 AGT GAT AAC TAT GGC AGT CTG TCC CGG GTG TGA
 225 S D N Y G S L S R V *

2) cDNA und Aminosäuresequenz von p120ctn(101-234).

303 ATG CAG GAG CCG GGG CAG ATT GTG GAG ACC TAC ACG GAG GAG
 101 M Q E P G Q I V E T Y T E E

 345 GAT CCT GAG GGA GCC ATG TCT GTA GTC TCT GTC GAG ACC TCA
 115 D P E G A M S V V S V E T S

 387 GAT GAT GGG ACC ACT CGG CGC ACA GAG ACC ACG GTC AAG AAA
 129 D D G T T R R T E T T V K K

 429 GTA GTG AAG ACT GTG ACA ACA CGG ACA GTA CAG CCA GTC GCT
 143 V V K T V T T R T V Q P V A

 471 ATG GGA CCA GAC GGG TTG CCT GTG GAT GCT TCA TCA GTT TCT
 157 M G P D G L P V D A S S V S

 513 AAC AAC TAT ATC CAG ACT TTG GGT CGT GAT TTC CGC AAG AAT
 171 N N Y I Q T L G R D F R K N

 555 GGC AAT GGG GGA CCT GGT CCC TAT GTG GGG CAA GCT GGC ACT
 185 G N G G P G P Y V G Q A G T

 597 GCT ACC CTT CCT AGG AAC TCC CAC TAC CCT CCT GAT GGT TAT
 199 A T L P R N F H Y P P D G Y

 639 AGT CGC CAC TAT GAA GAT GGT TAT CCA GGT GGC AGT GAT AAC
 213 S R H Y E D G Y P G G S D N

 681 TAT GGC AGT CTG TCC CGG GTG TGA
 227 Y G S L S R V *

3) Aminosäuresequenz von p120ctn(1A).

10	20	30	40	50
MDDSEVESTA	SILASVKEQE	AQFEKLTRAL	EEERRHVSAQ	LERVRVSPQD
60	70	80	90	100
ANPLMANGTL	TRRHQNGRFV	GDADLERQKF	SDLKLNGPQD	HSHLLYSTIP
110	120	130	140	150
RMQEPGQIVE	TYTEEDPEGA	MSVVSVETSD	DGTTRRTETT	VKKVVKTVTT
160	170	180	190	200
RTVQPVAMGP	DGLPVDASSV	SNNYIQTLGR	DFRKNNGNGGP	GPYVGQAGTA
210	220	230	240	250
TLPRNFHYPP	DGYSRHYEDG	YPGGSNDYGS	LSRVTRIEER	YRPSMEGYRA
260	270	280	290	300
PSRQDVYGPQ	PQVRVGGSSV	DLHRFHPEPY	GLEDDQRSMG	YDDL DYGMMS
310	320	330	340	350
DYGTARRTGT	PSDPRRLRS	YEDMIGEEVP	SDQYYWAPLA	QHERGSLASL
360	370	380	390	400
DSLKKGPPPP	PNWRQPELPE	VIAMLGFRLD	AVKSNAAYL	QHLCYRNDKV
410	420	430	440	450
KTDVRKLKGI	PVLVGLLDHP	KKEVHLGACG	ALKNISFGRD	QDNKIAIKNC
460	470	480	490	500
DGVPALVRL	RKARDMDLTE	VITGTLWNLS	SHDSIKMEIV	DHALHALTDE
510	520	530	540	550
VIIPHSGWER	EPNEDCKPRH	IEWESVLTNT	AGCLRNVSS	RSEARRKLRE
560	570	580	590	600
CDGLVDALIF	IVQAEIGQKD	SDSKLVENCV	CLLRNLSYQV	HREIPQAERY
610	620	630	640	650
QEAAPNVANN	TGPHAASCFG	AKKGKGKKPI	EDPANDTVDF	PKRTSPARGY
660	670	680	690	700
ELLFQPEVVR	IYISLLKESK	TPAILEASAG	AIQNL CAGR	TYGRYIRSAL
710	720	730	740	750
RQEKALSAIA	DLTNEHERV	VKAASGALRN	LAVDARNKEL	IGKHAI PNLV
760	770	780	790	800
KNLPGGQONS	SWNFSEDTVI	SILNTINEVI	AENLEAAKKL	RETQGIEKLV
810	820	830	840	850
LINKSGNRSE	KEVRAAALVL	QTIWGYKELR	KPLEKEGWKK	SDFQVNLNNA
860	870	880	890	900
SRSQSSHSYD	DSTLPLIDRN	QKSDKKPDRE	EIQMSNMGSN	TKSLDNNYST
910	920	930		
PNERGDHNRT	LDRSGDLGDM	EPLKGTTPLM	QKI	

10 Literaturverzeichnis

- Abe K. und Takeichi M. (2008): EPLIN mediates linkage of the cadherin-catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *PNAS* **105**(1): 13-19
- Aberle H., Schwartz H., Kemler R. (1996): Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell. Biochem.* **61**: 514-523
- Abraham M.T., Kuriakose M.A., Sacks P.G., Yee H., Chiriboga L., Bearer E.L., Delacure M.D. (2001): Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* **111**: 1285-1289
- Alema S, Salvatore A.M. (2007): p120 catenin and phosphorylation: mechanisms and traits of an unresolved issue. *Biochim Biophys. Acta.* **1773**: 47–58
- Anastasiadis P.Z., Moon S.Y., Thoreson M.A., Mariner D.J., Crawford H.C., Zheng Y., Reynolds A.B. (2000): Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat. Cell. Biol.* **2**: 637-644
- Anastasiadis P.Z. und Reynolds A.B. (2000): The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J. Cell Sci.* **113**: 1319-1334
- Anastasiadis P.Z. (2007): p120-ctn: A nexus for contextual signaling via RhoGTPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**(1): 34-46
- Arthur W.T., Ellerbroek S.M., Der C.J., Burrridge K., Wennerberg K. (2002): XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J. Biol. Chem.* **277**(45): 42964-42972
- Aslan J.E. und McCarty O.J. (2013): Rho GTPases in platelet function. *J Thromb Haemost.* **11**(1): 35–46
- Bellovin D.I., Bates R.C., Muzikansky A., Rimm D.L., Mercurio A.M. (2005): Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res.* **65**: 10938-10945
- Bishop A.L. und Hall A. (2000): Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**: 241-255
- Bonné S., van Hengel J., van Roy F. (1998): Chromosomal mapping of human armadillo genes belonging to the p120(ctn)/plakophilin subfamily. *Genomics* **51**(3): 452-454
- Boone B., Van Gele M., Lambert J., Haspeslagh M., Brochez L. (2009): The role of RhoC in growth and metastatic capacity of melanoma. *J Cutan Pathol* **36**: 629-636
- Bos J.L., Rehmann H., Wittinghofer A. (2007): GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**: 865-877
- Braga V. (2000): Epithelial Cell Shape: Cadherins and Small GTPases. *Exp. Cell Res.* **261**: 83-90

- Butz, S. und R. Kemler (1994): Distinct cadherin-catenin complexes in Ca^{2+} -dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett.* **355**: 195–200
- Castano J., Solanas G., Casagolda D., Raurell I., Villagrasa P., Bustelo X. R., Garcia de Herreros A., Dunach M. (2007): Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. *Mol. Cell. Biol.* **27**: 1745-1757
- Cerutti C. und Ridley A.J. (2017): Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Experimental Cell Research* **358**: 31-38
- Chen T., Wang C., Wu F., Zhang X., Yang H., Deng X., He Q., Li Wi., Li G. (2015): Altered localization of p120 catenin in the cytoplasm rather than the membrane correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* **10**(3): e0118645
- Cheng Z., Assfag V., Shi X., Lin S., Xia J., Yang P., Hüser N., Shen F. (2012): Effect of p120 catenin silencing on biological behaviors of PANC-1 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* **32**(5): 707-712
- Croisé P., Estay-Ahumada C., Gasman S., Ory S. (2014): Rho GTPases, phosphoinositides, and actin. *Landes Bioscience, Small GTPases* **5**, e29469
- Daniel J.M. (2007): Dancing in and out of the nucleus: p120ctn and the transcription factor Kaiso. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**: 59-68
- Daniel J.M. und Reynolds A.B. (1997): Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *BioEssays.* **19**: 883-891
- Daniel J.M. und Reynolds A.B. (1999): The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3614-3623
- Daniel J.M., Spring C.M., Crawford H. C., Reynolds A. B., Baig, A. (2002): The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res.* **30**: 2911-2919
- Davis M.A., Ireton R.C., Reynolds A.B. (2003): A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J. Cell Biol.* **163**(3): 525-534
- De Pascalis C. und Etienne-Manneville S. (2017): Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol Biol Cell.* **28**(14): 1833-1846
- Deplazes J., Fuchs M., Rauser S., Genth H., Lengyel E., Busch R., Lubert B. (2009): Rac1 and Rho contribute to the migratory and invasive phenotype associated with somatic E-cadherin mutation. *Human Molecular Genetics* **18**(19): 3632-3644
- Dias S.M.G. und Cerione R.A. (2007): X-ray crystal structures reveal two activated states for RhoC. *Biochem.* **46**: 6547-6558

- Dietrich K-A., Schwarz R., Liska M., Grass S., Menke A., Meister M., Kierschke G., Längle C., Genze F., Giehl K. (2009): Specific induction of migration and invasion of pancreatic carcinoma cells by RhoC, which differs from RhoA in its localisation and activity. *Biol Chem.* **390**(10): 1063-1077
- Etienne-Manneville S. und Hall A. (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635
- Ferber E.C., Kajita M., Wadlow A., Tobianksy L., Niessen C., Ariga H., Daniel J., Fujita Y. (2008): A role for the cleaved cytoplasmic domain of E-cadherin in the nucleus. *J Biol Chem.* **283**(19): 12691-12700
- Fiegen D., Blumenstein L., Stege P., Vetter I.R., Ahmadian M. R. (2002): Crystal structure of Rnd3/RhoE: functional implications. *FEBS Letters* **525**: 100-104
- Fritz G., Just I., Kaina B. (1999): Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* **81**: 682-687
- Garcia-Mata R., Boulter E., Burrridge K. (2012): The ‘invisible hand’: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**(8): 493-504
- Gómez del Pulgar T., Benitah S.A., Valerón P.F., Espina C., Lacal J.C. (2005): Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays* **27**: 602-13
- Googs R., Williams C.M., Mellor H., Poole A.W. (2015): Platelet Rho GTPases – a focus on novel players, roles and relationships. *Biochem. J.* **466**: 431-442
- Gouchang Hu (2012): p120-Catenin: A novel regulator of innate immunity and inflammation. *Crit Rev Immunol.* **32**(2): 127–138
- Graham F.L., Smiley J., Russel W.C., Nairn R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74
- Grosheva I., Shtutman M., Elbaum M., Bershadsky A.D. (2001): p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J. Cell Sci.* **114**: 695-707
- Groves E., Dart A.E., Covarelli V., Caron E. (2008): Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* **65**(13): 1957-1976
- Gumbiner M. B. (2005): Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **6**(8): 622-634
- Hakem A., Sanchez-Sweetman O., You-Ten A., Duncan G., Wakeham A., Khokha R., Mak T. W. (2005): RhoC is dispensable for embryogenesis und tumour initiation but essential for metastasis. *Genes Dev.* **19**: 1974-1979
- Hall A. (2012): Rho family GTPases. *Biochemical Society Transactions* **40**(6): 1378-1382

- Hart M.J., Maru Y., Leonard D., Witte O.N., Evans T., Cerione R.A. (1992): A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science* **258**(5083): 812-815
- Hatzfeld M. (2005): The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur. J. Cell Biol.* **84**: 205-214
- Hatzfeld M., Wolf A., Keil R. (2014): Plakophilins in Desmosomal Adhesion and Signaling. *Cell Communication & Adhesion* **21**: 25–42
- Heasman S. J., Ridley A. J. (2008): Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 690–701
- Hinck L., Näthke I.S., Papkoff J., Nelson W.J. (1994): Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* **125**(6): 1327-1340
- Ihara K., Muraguchi S., Kato M., Shimizu T., Shirakawa M., Kuroda S., Kaibuchi K., Hakoshima T. (1998): Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* **273**(16): 9656-9666
- Ireton R.C., Davis M.A., van Hengel J., Mariner D.J., Barnes K., Thoreson M.A., Anastasiadis P.Z., Matrisian L., Bundy L.M., Sealy L., Gilbert B., van Roy F., Reynolds A.B. (2002): A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J. Cell Biol.* **159**(3): 465-476
- Jaffe A.B. und Hall A. (2002): Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv. Cancer Res.* **65**: 57-80
- Jaffe A.B. und Hall A. (2005): Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **21**: 247-269
- Jiang Y., Liao L., Shrestha C., Ji S., Chen Y., Penj J., Wang L., Liao E., Xie Z. (2015): Reduced expression of E-cadherin and p120-catenin and elevated expression of PLC- γ 1 and PIKE are associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* **8**(8): 9042-51
- Jobichen C., Pal L., Swaminathan K. (2012): Crystal structure of mouse RhoA: GTP γ S complex in a centered lattice. *J Struct Funct Genomics.* **13**(4): 241-245
- Kamai T., Yamanishi T., Shirataki H., Takagi K., Asami H., Ito Y., Yoshida K. (2004): Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res.* **10**(14): 4799-4805
- Keirsebilck A., Bonn   S., Staes K., van Hengel J., Nollet F., Reynolds A., van Roy F. (1998): Molecular cloning of the human p120ctn Catenin Gene (CTNND1): Expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics* **50**: 129-146

- Kelly K.F., Spring C.M., Otchere A.A., Daniel J.M. (2004): NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *J. Cell Sci.* **117**: 2675-2686
- Kozma R., Ahmed S., Best A., Lim L. (1995): The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell. Biol.* **15**(4): 1942–1952
- Lamaze C., Chuang T.H., Terlecky L.J., Bokoch G.M., Schmid S.L. (1996): Regulation of receptor mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* **382**(6587): 177-179
- Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C.G., Benmerah A., Dautry-Varsat A. (2001): Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell.* **7**(3): 661-671
- Lawson C. und Ridley A. (2018): Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol.* **217**(2): 447-457
- Lieber M., Mazzetta J., Nelson-Rees W., Kaplan M., Todaro G. (1975): Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* **15**: 741-747
- Liska, Martina: Identifizierung und biochemische Charakterisierung von p120ctn als Interaktionspartner der GTPase RhoC in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1, Dissertation, Universität Ulm, 2009
- Madaule P. und Axel R. (1985): A novel ras-related gene family. *Cell* **41**: 31-40
- Magie C.R., Meyer M., Gorsuch M., Parkhurst S.M. (1999): Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early *Drosophila* development. *Development* **126**: 5353-5364
- Magie C.R., Pinto-Santini D., Parkhurst S.M. (2002): Rho1 interacts with p120ctn and α -catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development* **129**: 3771-3782
- Mayerle J., Friess H., Büchler M.W., Schneckeburger J., Weiss F.U., Zimmer K.-P., Domschke W., Lerch M.M. (2003): Up-regulation, nuclear import, and tumor growth stimulation of the adhesion protein p120ctn in pancreatic cancer. *Gastroenterology* **124**: 949-960
- Menke A. und K. Giehl (2012): Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **524**: 48-55
- Nobes C.D. und Hall A. (1995): Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62
- Noren N.K., Liu B.P., Burridge K., Kreft B. (2000): p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J. Cell Biol.* **150**: 567-579

- Orgaz J.L., Herraiz C., Sanz-Moreno V. (2014): Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Landes Bioscience*, Small GTPases, e29019
- Paduch M., Jelen F., Otlewski J. (2001): Structure of small G proteins and their regulators. *Acta. Biochim. Pol.* **48**(4): 829-850
- Peifer M., Berg S., Reynolds A.B. (1994): A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**: 789-791
- Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U., Semb H., Christofori G. (1998): A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**(6672): 190-193
- Reynolds A.B. und Carnahan R.H (2004): Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Sem. Cell Dev. Biol.* **15**: 657-663
- Reynolds A.B., Daniel J.M., McCrea P.D., Wheelock M.J., Wu J., Zhang Z. (1994): Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with Ecadherin complexes. *Mol. Cell Biol.* **14**(12): 8333-8342
- Reynolds, A.B., J. Daniel, 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**: 328–337
- Reynolds A.B., Herbert L., Cleveland J.L., Berg S.T., Gaut J.R. (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**(12): 2439-2345
- Reynolds, A.B., Roesel D.J., Kanner S.B., Parsons J.T. (1989): Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 629–638
- Ridley A.J. (2000): Rho. In *Frontiers in Molecular Biology: GTPases*, edited by Alan Hall. *Oxford University Press* **24**: 89-136
- Ridley A.J. (2001): Rho-GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* **114**: 2713-2722
- Ridley A.J. (2013): RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *Journal of Microscopy* **251**: 242-249
- Ridley A.J. und Hall A. (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**(3): 389-399
- Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D., Hall A. (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**: 401–410
- Riggleman B., Wieschaus E., Schedl P. (1989): Molecular analysis of the *armadillo* locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev.* **3**: 96-113

- Roczniak-Ferguson A. und Reynolds A.B. (2003): Regulation of p120-catenin nucleocytoplasmic shuttling activity. *J. Cell Sci.* **116**: 4201-4212
- Roura S., Miravet S., Piedra J., de Herreros A.G., Dunach M. (1999): Regulation of Ecadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**(51): 36734-36740
- Sabharanjak S., Sharma P., Parton R.G., Mayor S. (2002): GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell.* **2**(4): 411-423
- Sadok A. und Marshall C. J. (2014): Rho GTPases, Masters of cell migration. *Landes Bioscience*, Small GTPases 5, e29710: 1-7
- Sahai E., Marshall C. J. (2002): ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Bio.* **4**: 408-415
- Samarin S. und Nusrat A. (2009): Regulation of epithelial apical junctional complex by Rho family GTPases. *Front Biosci.* **14**: 1129-1142
- Stähle M., Veit C., Bachfischer U., Schierling K., Skripczynski B., Hall A., Gierschik P., Giehl K. (2003): Mechanisms in LPA-induced tumor cell migration: critical role of phosphorylated ERK. *J. Cell Sci.* **116**: 3835-3384
- Schackmann R.C.J., Tenhagen M., van de Ven R.A.H., Derksen P.W.B. (2013): p120-catenin in cancer – mechanisms, models and opportunities for intervention. *Journal of Cell Science* **126**: 3515–3525
- Seidel B., Braeg S., Adler G., Wedlich D., Menke A. (2004): E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **23**: 5532-5542
- Shibata T., Kokubu A., Sekine S., Kanai Y., Hirohashi S. (2004): Cytoplasmic p120ctn regulates the invasive phenotypes of E-Cadherin-deficient breast cancer. *Am. J. Path.* **164**: 2269-2278
- Shimizu T., Ihara K., Maesaki R., Kuroda S., Kaibuchi K., Hakoshima T. (2000): An open conformation of switch I revealed by the crystal structure of a Mg²⁺-free form of RhoA complexed with GDP. *J. Biol. Chem.* **275**(24): 18311-18317
- Sprang S.R. und Coleman D.E. (1998): Invasion of the nucleotide snatchers: structural insights into the mechanism of G protein GEFs. *Cell* **95**: 155-158
- Sorokina E.M. und Chernoff J. (2005): Rho-GTPases: new members, new pathways. *J. Cell. Biochem.* **94**: 225-231
- Suwa H., Ohshio G., Imamura T., Watanabe G., Arii S., Imamura M., Narumiya S., Hiai H., Fukumoto M. (1998): Overexpression of the RhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* **77**: 147-52

- Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001): Small GTP-Binding Proteins. *Physiol. Rev.* **81**(1): 153-208
- Takaishi K., Sasaki T., Kameyama T., Tsukita Sa., Tsukita Sh., Takai Y. (1995): Translocation of activated *Rho* from the cytoplasm to mambrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* **11**: 39-48
- Takaishi K., Sasaki T., Kotani H., Nishioka H., Takai Y. (1997): Regulation of cell-cell adhesion by Rac and Rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **139**(4): 1047-1059
- Tao Y., Chen Y.-C., Li Y.-Y., Yang S.-Q., Xu W. (2008): Localization and translocation of RhoA protein in the human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenter.* **14**(8): 1175-1181
- Thiery J.P. (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**: 442-454
- Thoreson M.A., Anastasiadis P.Z., Daniel J.M., Ireton R.C., Wheelock M.J., Johnson K.R., Hummingbird D.K., Reynolds A.B. (2000): Selective uncoupling of p120ctn from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol.* **148**(1): 189-201
- Tran N.L., Nagle R.B., Cress A.E., Heimark R.L. (1999): N-Cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. *Am. J. Path.* **155**(3): 787-798
- Tsukita S., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. (1993): Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. *J. Cell Biol.* **123**(5): 1049-1053
- Ueda T., Kikuchi A., Ohga N., Yamamoto J., Takai Y. (1990): Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem.* **265**: 9373–9380
- van Golen K.L., Wu Z.F., Qiao X.T., Bao L.W., Merajver S.D. (2000): Rho C. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* **60**: 5832-5838
- Wang H.B., Liu X.P., Liang J., Yang K., Sui A.H., Liu Y.J. (2009): Expression of RhoA and RhoC in colorectal carcinoma and its relations with clinicopathological parameters. *Clin Chem Lab Med* **47**: 811-817
- Wang W., Wu F., Fang F., Tao Y., Yang L. (2008): RhoC is essential for angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma cells via regulation of endothelial cell organization. *Cancer Sci.* **99**: 2012-2018
- Wei Y., Zhang Y., Derewenda U., Liu X., Minor W., Nakamoto R.K., Somlyo A.V., Somlyo A.Pl, Derewenda Z.S. (1997): Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat. Struct. Biol.* **4**(9): 699-703

- Wennerberg K. und Der C.J. (2004): Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science* **117**: 1301-1312
- Wheeler A.P., Ridley A.J. (2004): Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC and cell motility. *Exp. Cell Res.* **301**: 43-49
- Worthylake D.K, Rossman K.L., Sondek J. (2000): Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**: 682-688
- Yamada S. und Nelson W. J. (2007): Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* **178**(3): 517-527
- Yanagisawa M und Anastasiadis P.Z. (2006): p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness. *J Cell Biol.* **174**(7): 1087-1096
- Yap A.S., Niessen C.M., Gumbiner B.M. (1998): The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening an interaction with p120ctn. *J. Cell Biol.* **141**(3): 779-789
- Yoo H.Y., Sung M.K., Lee S.H., Kim S., Lee H., Park S., Kim S.C., Lee B., Rho K., Lee J.E. (2014): A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* **46**: 371-375
- Zhang B., Zhang Y., Wang Z.-X., Zheng Y. (2000): The role of Mg²⁺ Cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **275**(33): 25299-25307

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei

Prof. Dr. Klaudia Giehl für die nette Betreuung, ihr Engagement, die gedanklichen Anregungen und die Unterstützung bei der praktischen Arbeit sowie bei der Verfassung dieser Arbeit

Prof. Dr. Andre Menke für die freundliche Aufnahme in die Abteilung, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit

sowie dem gesamten Laborteam für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf dem Weg durch das Studium begleitet und stets motiviert hat.