

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von
Armaddillo-Proteinen in *Adherens junctions***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.) für das Fachgebiet
Pathobiochemie

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

von Babett Frommann (geb. Fischer)
geboren am 01. Januar 1984 in Neu Kaliß

Betreuerin: Prof. Mechthild Hatzfeld

Gutachter: 1. Prof. Stephan Michael Feller
2. Prof. Manfred Kunz, Leipzig

03.09.2019

24.04.2020

Referat

Adherens junctions sind Zellkontakte, welche den Zellzusammenhalt ermöglichen. Der Aufbau besteht aus transmembranären Proteinen der Cadherin-Familie und intrazellulären Proteinen der p120-Catenine. Die Proteine der p120-Catenine sind multifunktional mit vielfältigen Aufgaben an Zellkontakten, im Zytoplasma und im Zellkern. Ziel der Arbeit war es, mehr über die Funktionen der p120-Catenine (p0071, p120 und NPRAP) und deren Interaktionen mit E-Cadherin in *Adherens junctions* zu erfahren. Hierfür wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen an MCF-7-Zellen (mit und ohne *knockdown* einzelner Proteine) zur Untersuchung der Lokalisation in *Adherens junctions* durchgeführt. Weiterhin erfolgte die Identifikation von Proteinkomplexen mittels Immunpräzipitation. Um mehr über die Funktionen von p0071 zu erfahren, erfolgten Immunfluoreszenzuntersuchungen und funktionelle Tests an einer Zellreihe mit Überexpression von p0071.

Es konnte gezeigt werden, dass die p120-Catenine p0071, p120 und NPRAP mit E-Cadherin unterschiedliche Proteinkomplexe bilden. Diese verschiedenen Proteinkomplexe sind Bestandteile von *Adherens junctions* und an der Zellmembran – wahrscheinlich – nicht räumlich voneinander getrennt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass p0071, p120 und NPRAP E-Cadherin an der Zellmembran stabilisieren. Die p120-Catenine haben in *Adherens junctions* unterschiedliche Funktionen, die sich nicht gegenseitig ersetzen können.

Durch die Überexpression von p0071 konnte gezeigt werden, dass p0071 einerseits E-Cadherin an der Zellmembran stabilisiert und andererseits die Zellproliferation bzw. Zellmigration fördert.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Tumorerkrankungen	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Dignität	1
1.1.4	Grundlagen der Kanzerogenese	2
1.1.5	Grundlagen des Tumorwachstums	3
1.1.6	Auflösung von Zellkontakten als Voraussetzung für Metastasierung	3
1.2	Aufbau und Funktion von Zellkontakten	5
1.2.1	Zellkontakte	5
1.2.2	Die Proteine der Cadherin-Familie	6
1.2.3	Die Familie der Armadillo-Proteine	9
1.2.4	Die Familie der p120-Catenine	11
2	Zielsetzung der Arbeit	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Material	15
3.1.1	Verwendete Puffer	15
3.1.2	Verwendete Antikörper	15
3.1.3	Verwendete si-RNA	16
3.1.4	Verwendete Geräte	16
3.1.5	Verwendete Zelllinien	16
3.2	Methoden	17
3.2.1	Zelllinien	17
3.2.2	Kultivierung von MCF-7-Zellen	17
3.2.3	Einfrieren und Auftauen von MCF-7-Zellen	17
3.2.4	Zellzählung	17
3.2.5	Transfektion von si-RNA mittels Lipofection	18
3.2.6	Immunfluoreszenz	18
3.2.7	„Wundheilungs-Assay“ und <i>Live-Cell-Imaging</i>	19
3.2.8	Proteinisolation für Immunpräzipitation	20
3.2.9	Immunpräzipitation	20
3.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	21
3.3	Statistische Auswertung	21
4	Ergebnisse	22

4.1	P120-Catenine interagieren mit E-Cadherin und bilden Proteinkomplexe....	22
4.1.1	P120-Catenine interagieren mit E-Cadherin.....	22
4.1.2	P120-Catenine bilden Proteinkomplexe mit E-Cadherin.....	26
4.2	P120-Catenine beeinflussen sich sowohl gegenseitig als auch E-Cadherin	29
4.2.1	Der Verlust von p120-Cateninen beeinflusst die <i>Adherens junctions</i>	29
4.2.2	Der Verlust von p120-Cateninen beeinflusst die Proteinmengen der jeweils anderen Catenine	39
4.3	P0071 beeinflusst die Zellproliferation/-migration	43
4.3.1	P0071 beeinflusst E-Cadherin und NPRAP	43
4.3.2	P0071 beeinflusst die Expression von NPRAP	45
4.3.3	P0071 beeinflusst die Zellproliferation/-migration.....	47
5	Diskussion	49
5.1	P120-Catenine interagieren mit E-Cadherin und bilden Proteinkomplexe....	49
5.2	P120-Catenine beeinflussen sich gegenseitig und E-Cadherin	52
5.3	P0071 beeinflusst E-Cadherin und NPRAP	55
5.4	P0071 beeinflusst die Zellproliferation/-migration	57
5.5	Klinische Bedeutung und Perspektiven	58
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis.....	62
8	Thesen.....	71
9	Anlagen	72
9.1	Ergänzende Darstellungen.....	72
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	73
9.3	Tabellenverzeichnis.....	75
10	Anhang	V
11	Selbstständigkeitserklärung.....	VI

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

Abb.	Abbildung
Arm	Armadillo-Domäne
CBD	Catenin bindende Domäne
cm ²	Quadratcentimeter
DABCO	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTD	Desmoglein-End-Domäne
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EMT-TFs	EMT-Transkriptionsfaktoren
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IA	intrazellulärer Anker
ICS	Cadherin-ähnliche Sequenz
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPL	prolinreiche Verbindung
JMD	juxtamembranäre Domäne
kDa	Kilo Dalton
mAk	monoklonaler Antikörper
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NPRAP	<i>Neural Plakophilin Related Arm-Repeat Protein</i>
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RISC	Ribonukleinsäure <i>induced silencing complex</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RUD	einheitliche <i>Repeat</i> -Domäne
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamidegel electrophoresis</i>
si-RNA	small interfering Ribonukleinsäure
STABW	Standardabweichung

Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
Tris	Tris-aminomethan
WB	Western Blot

1 EINLEITUNG

1.1 Tumorerkrankungen

1.1.1 Definition

„Als Tumor (*Syn.: Geschwulst, Neoplasma [= Neubildung], Neoplasie*) (Herv. i. O.) bezeichnet man eine abnorme Gewebemasse, die durch eine progressive Vermehrung von körpereigenen entarteten Zellen (transformierte Zellen, Tumorzellen) entsteht“ (Böcker et al., 2008, S. 167). Die Entstehungsmechanismen liegen in Regulationsstörungen von Genen, welche die Zellproliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung kontrollieren (Böcker et al. 2008).

1.1.2 Epidemiologie

Tumorerkrankungen sind sehr häufige Erkrankungen und bedeuten immer ein einschneidendes Ereignis im Leben eines Menschen. Nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stellen Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, 2017). Im Jahr 2013 erkrankten in Deutschland rund 485.095 Menschen (davon 253.000 Männer, 230.000 Frauen und 2.095 Kinder) neu an einem malignen Tumor, die Sterberate betrug 223.307. Ende 2013 lebten in Deutschland rund 2,7 Millionen Menschen, die innerhalb der letzten zehn Jahre die Diagnose ‚Krebs‘ erhalten hatten (Robert-Koch-Institut 2016, S. 23f.).

1.1.3 Dignität

Im klinischen Alltag hat sich die Unterscheidung in benigne und maligne Tumoren bewährt. Das Tumorverhalten ist häufig aus der Morphologie ableitbar, daher kommt der morphologischen Betrachtung eine besondere Bedeutung zu. Benigne Tumoren sind durch ein langsames, verdrängendes Wachstum gekennzeichnet. Die Tumormasse weist einen hohen Differenzierungsgrad auf, d. h., sie ähnelt sehr dem Ursprungsgewebe. Die Zellen sind überwiegend monomorph. Diese Tumoren können von einer fibrösen Kapsel umgeben sein, eine Metastasierung erfolgt nicht. Maligne Tumoren zeichnen sich durch ein schnelles und invasives Wachstum aus. Die Tumormasse zeigt Zellatypien und einen Verlust an Differenzierung. Durch das Tumorwachstum wird das umliegende Gewebe zerstört. Maligne Tumoren haben die Fähigkeit zur Metastasierung (Tab. 1). Als Sonderform werden zusätzlich die semimaligen Tumoren unterschieden. Sie wachsen lokal invasiv und destruiierend, bilden jedoch keine Metastasen. Als Beispiel ist das Basaliom der Haut zu nennen. Auch diese Tumoren können bei ungünstiger Lokalisation oder unvollständiger Entfernung zum Tod des Patienten führen (Böcker et al. 2008).

	Benigner Tumor	Maligner Tumor
Wachstum	langsam, selten Mitosefiguren	langsam bis schnell, zahlreiche Mitosefiguren möglich, atypische Mitosen
Lokale Ausbreitung	gut begrenzt, verdrängendes Wachstum, oft fibröse Kapsel	schlecht begrenzt, invasives, destruierendes Wachstum
Histologie	hoher Differenzierungsgrad, monomorphe Zellen	Differenzierungsverlust, Zellatypien
Umgebendes Gewebe	Kompression, Druckatrophie	Invasion, Destruktion
Metastasierung	nein	ja

1.1.4 Grundlagen der Kanzerogenese

Die Kanzerogenese erfolgt in mehreren Schritten. Hierbei kommt es durch eine Reihe von Defekten in verschiedenen Genen zur Tumorentstehung. Am besten verstanden ist die Entwicklung eines epithelialen Tumors. Es wird angenommen, dass die Entwicklung durch Transformation einer einzelnen Zelle zur Tumorstammzelle beginnt. Durch Proliferation dieser Tumorstammzelle kommt es zur Verdrängung der gesunden Zellen durch die Tumorzellen. Die Entwicklung vollzieht sich in mehreren Schritten und oftmals über viele Jahre. Hierbei treten Veränderungen in einer Reihe von Genen und deren Genprodukten auf. Beim Wachstum eines Tumors spielen Onkogene, Tumorsuppressorgene, Apoptosegene, Telomerasegene sowie DNA-Reparaturgene und deren jeweilige Genprodukte eine entscheidende Rolle (Böcker et al., 2008). Onkogene sind normale zelluläre Gene, deren Expressionsprodukte die Proliferation, Mobilität und Differenzierung von Zellen regulieren. Sie spielen bei der Tumorentstehung eine zentrale Rolle. Onkogenprodukte sind Komponenten einer Reihe von intrazellulären Signalwegen, an deren Ende die mitotische Teilung steht. In gesunden Zellen erfolgt die Aktivierung der Onkogene nur durch ein Wachstumssignal. Kommt es zur Mutation, entstehen entweder Produkte mit einer eigenständigen biologischen Aktivität (unabhängig von Wachstumssignalen) oder es kommt zu einer übermäßigen Anzahl dieser Produkte (Überexpression), was zu einer gesteigerten Aktivierung der Signalwege führt. Am Ende steht eine gesteigerte Genfunktion bzw. eine Erhöhung der Expressionsprodukte (*gain of function*) (Böcker et al., 2008). Beispiele für Onkogene und deren Funktionen sind in Tab. 2 dargestellt.

Onkogene	Funktion
SIS, HST1, INT2	Wachstumsfaktor
ERB-B1, ERB-B2 (HER-2/NEU)	Wachstumsfaktorrezeptoren
RAS-Familie, SRC, ABL	intrazelluläre Signalvermittlungen
MYC-Familie, FOS, MYB	nukleäre Transkriptionsfaktoren

Tumorsuppressorgene sind normale zelluläre Gene, deren Expressionsprodukte negative Regulatoren von Zellwachstum sind. Der Funktionsverlust (*loss of function*)

führt zum Tumorwachstum. Wichtige Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastomgen und p53. Das Retinoblastomgen codiert für ein Protein, welches den Zellzyklus, als ‚Zellzyklusbremse‘ kontrolliert. Verlust oder Inaktivierung führt zu einem Verlust der ‚Zellzyklusbremse‘. P53 wird auch als ‚Hüter des Genoms‘ bezeichnet. Dieses Protein ist verantwortlich für die Entscheidung, ob eine Zelle mit einem DNA-Schaden repariert oder der Apoptose zugeführt wird. Defekte im p53-Gen führen zu Zellen, die ihre DNA-Reparaturmechanismen nicht aktivieren können, aber auch nicht in die Apoptose gehen (Böcker et al., 2008).

1.1.5 Grundlagen des Tumorwachstums

Tumoren entwickeln sich aus teilungsfähigen Zellen normaler Gewebe. Nach der Entstehung einer Tumorstammzelle kommt es durch Proliferation und Differenzierung zur Ausbildung eines Tumors. Tumorstammzellen weisen nur eine geringe Proliferationsrate auf, sind für den Erhalt des Tumors aber essenziell.

Bis zu einem Durchmesser von rund 2 mm kann die Tumorzellmasse durch Diffusion aus der Umgebung mit Nährstoffen versorgt werden. Für das weitere Wachstum des Tumors ist die Bildung eigener Blutgefäße sehr wichtig. Dieser Prozess wird Angiogenese genannt. Die Induktion der Angiogenese wird über Angiogenesestimulatoren oder -inhibitoren, die von der Tumor- oder Wirtszelle sezerniert werden können, gesteuert. Sobald der Tumor durch Perfusion mit Nährstoffen versorgt wird, ist ein exponentielles Wachstum möglich. Bei insuffizienter Angiogenese kann es zur Tumorregression kommen (Böcker et al., 2008).

Die Tumorzellmasse ist in der Regel sehr heterogen. Tumorzellen sind genetisch instabil, sodass es zu wiederholten Mutationen kommt. Hierbei können sich Subpopulationen entwickeln, die für den Tumor vorteilhafte Eigenschaften erworben haben. Der Tumor passt sich damit dem Selektionsdruck der körpereigenen Abwehr oder der Zytostatika an. Dies ist die Grundlage für Resistenzentwicklung und damit für das Überleben einzelner Tumorzellen und der Ausbildung einer vermehrten Pathogenität (Böcker et al., 2008).

1.1.6 Auflösung von Zellkontakten als Voraussetzung für Metastasierung

Invasion und Metastasierung sind wichtige Merkmale maligner Tumoren. Invasion beschreibt ein aktives Einwachsen von Tumorzellen in normales Gewebe und dessen Zerstörung. Die Metastasierung ist die Folge von invasivem Wachstum mit Verschleppung von Tumorzellen an eine andere Stelle des Körpers und Ausbildung einer neuen Tumorzellmasse (Metastase). Dieser Vorgang wird Metastasierungskaskade genannt und erfolgt in mehreren Schritten:

1. Intravasation: Eindringen in die Metastasierungswege (Lymphweg, Blut, Körperhöhlen)
2. Verschleppung von Tumorzellen
3. Extravasation: Austritt aus den Metastasierungswegen

Wichtigste Voraussetzung für Invasion und Metastasierung ist die Herauslösung einzelner Tumorzellen aus dem Zellverband. Die Auflösung von Zellkontakten spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Böcker et al., 2008). Diese wird durch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) möglich. EMT ist ein biologischer Prozess, bei dem eine epitheliale Zelle durch verschiedene biochemische Veränderungen einen mesenchymalen Phänotyp erlangt (Abb. 1). Epitheliale Zellen zeichnen sich u. a. durch Zellpolarität aus. Sie besitzen eine apikale und eine basolaterale Seite. Die apikale Seite ist dem Äußeren oder dem Lumen (z. B. Darm) zugewandt, die basolaterale Seite ist über die Basalmembran mit dem darunter liegenden Bindegewebe verbunden. Mesenchymale Zellen besitzen diese Zellpolarität nicht. Mesenchymzellen sind sternförmig und können in Gewebeverbände migrieren. Mesenchymale Stammzellen haben eine hohe Teilungsrate und können sich in viele verschiedene Gewebe differenzieren (Kalluri und Weinberg 2009).

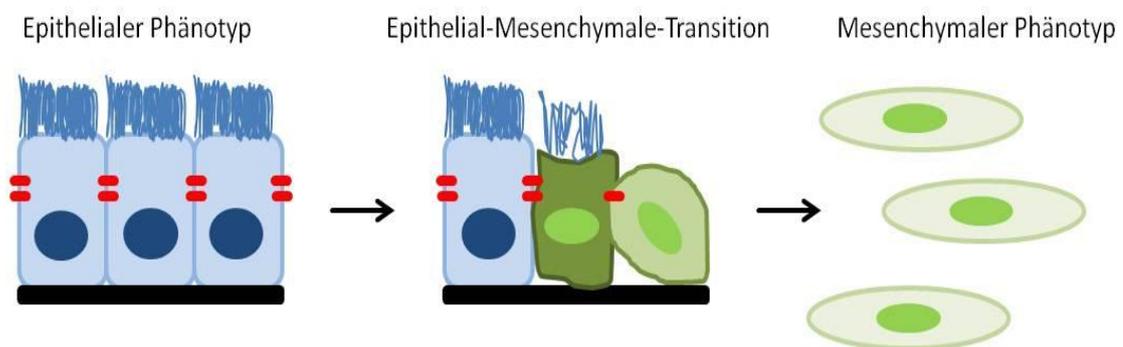


Abbildung 1: Epithelial-mesenchymale Transition (schematisch, modifiziert nach Kalluri und Weinberg, 2009, S. 1421)

Aus Zellen vom epithelialen Phänotyp (blau) mit festgelegter Polarisation, Zell-Zell-Kontakten (rot) und Kontakt zur Basalmembran (schwarz) werden durch verschiedenste biochemische Prozesse Zellen vom mesenchymalen Phänotyp (hellgrün) ohne festgelegte Polarisation, Zell-Zell-Kontakten oder Kontakt zu einer Basalmembran.

Um diesen Prozess zu steuern, kommt es zur Aktivierung oder Deaktivierung spezifischer Signalwege und zur Bildung von EMT-Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs). Diese EMT-TFs (z. B. Slug, Snail, Twist, Zeb1) können zu einer direkten Unterdrückung von Proteinen (z. B. E-Cadherin) an Zellkontakten führen (Scheel und Weinberg, 2012).

Insgesamt ist der Prozess der Metastasierung aber sehr ineffizient. Von den aus dem Zellverband gelösten und verschleppten Zellen überleben nur wenige und bilden an einer anderen Körperstelle eine Metastase. Dennoch können einzelne metastasierte Tumorzellen jahrelang überleben, ohne zu wachsen (*tumor dormancy*), um dann, nach

erfolgreicher Therapie des Primärtumors, als Spätrezidiv klinisch manifest zu werden (Böcker et al. 2008).

1.2 Aufbau und Funktion von Zellkontakten

1.2.1 Zellkontakte

Zellkontakte sind wichtige Strukturen im Aufbau mehrzelliger Lebewesen. Sie ermöglichen die Kommunikation und den Stoffaustausch zwischen den Zellen sowie den Zusammenhalt von Zellen untereinander oder von Zellen an anderen Strukturen, z. B. der Basalmembran. Durch den Zusammenhalt mehrerer Zellen ist es möglich, Spezialisierungen z. B. in Form von Organen auszubilden. Weiterhin besitzen Zellkontaktproteine wichtige Funktionen in der Signaltransduktion und können eine Vielzahl von Zellfunktionen beeinflussen (Zatloukal et al., 2008).

Allgemein werden drei große Gruppen von Zellkontakten unterschieden: verschließende Kontakte, haftende Kontakte und kommunizierende Kontakte (Abb. 2).

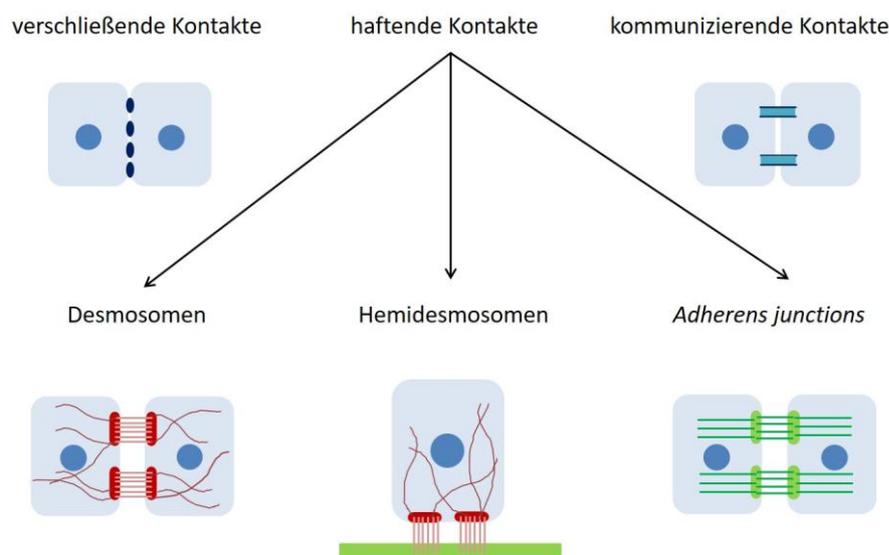


Abbildung 2: Übersicht über verschiedene Zellkontakte (schematisch)

Oben links: verschließende Zellkontakte – sehr enge Zellverbindung mit Barrierefunktion

Oben rechts: kommunizierende Zellkontakte – Signalübertragung zwischen Zellen oder Geweben möglich

Unten: verschiedene Untergruppen von haftenden Kontakten – dienen der mechanischen Stabilisierung

Die verschließenden Kontakte bilden sehr enge Zellverbindungen und können damit eine Barrierefunktion ausüben. Sie kommen dort vor, wo Kompartimente voneinander getrennt werden sollen, eine Diffusionsbarriere entstehen soll oder ein kontrollierter Durchtritt von Ionen notwendig ist. Weiterhin sind verschließende Kontakte für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität epithelialer Zellen verantwortlich. Die kommunizierenden Kontakte ermöglichen den Durchfluss von elektrischen oder chemischen Signalen und dienen damit der Kommunikation der Zellen untereinander und mit dem umliegenden Gewebe. Haftende Kontakte dienen der mechanischen

Stabilisierung der Zellen. Hierbei werden die Hemidesmosomen, die Desmosomen und die *Adherens junctions* unterschieden. Die Hemidesmosomen verbinden eine Zelle mit dem Extrazellulärraum, z. B. der Basalmembran. *Adherens junctions* und Desmosomen verbinden zwei (oder mehr) Zellen miteinander und sind grundsätzlich sehr ähnlich aufgebaut. Transmembranäre Glykoproteine der Cadherin-Familie vermitteln die interzelluläre Adhäsion. Die zyttoplasmatisch gebundenen Plaque-Proteine verknüpfen die Cadherine mit den Filamenten des Zytoskeletts (Böcker et al., 2008).

Nachfolgend werden sowohl die Cadherine als auch die zum Verständnis der Arbeit notwendigen, wichtigsten Plaque-Proteine detailliert vorgestellt. Tab. 3 gibt einen Überblick über die wichtigsten Zellkontakte, deren Vorkommen und assoziierten Proteine.

Tabelle 3: Übersicht über die wichtigsten Zellkontakte und deren assoziierte Proteine (modifiziert nach Franke, 2009, S. 2)				
	Vorkommen	Assoziierte Proteine	Transmembranäre Proteine und Glykoproteine	Spezifische Plaqueproteine
Desmosomen	Epithel, Kardiomyozyten, Meningen, dendritische Zellen im Thymus und Lymphfollikel	Intermediärfilamente (Keratin, Vimentin, Desmin)	Desmogleine, Desmocolline	Plakoglobin, Desmoplakin, Plakophilin
<i>Adherens junctions</i>	Epithel, Endothel, Mesenchym, Kardiomyozyten	Mikrofilamente (Actin)	klassische Cadherine (E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, VE-Cadherin, Cadherin-11)	α -Catenin, β -Catenin, p120, p0071, NPRAP, ARVCF
Verschließende Kontakte	Epithel, Endothel		Occludin, Claudin	ZO-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin
Kommunizierende Kontakte	ubiquitär		Connexine	Vielzahl von Proteinen

1.2.2 Die Proteine der Cadherin-Familie

Zur Cadherin-Familie gehören transmembranäre Glykoproteine, die kalziumabhängig Zellkontakte eingehen (*Calcium adhering*, Ca-adherine). Es existieren viele Mitglieder mit unterschiedlichen Funktionen z. B. in Zelladhäsion, Signaltransduktion und Morphogenese. Die Cadherin-Familie wird in mehrere Unterfamilien eingeteilt. Die in *Adherens junctions* vorkommenden Cadherine gehören zu den klassischen Cadherinen vom Typ I (Bsp.: epitheliales [E-], plazentales [P-] und neuronales [N-] Cadherin) und vom Typ II (Bsp.: vaskulär-endotheliales [VE-] Cadherin). Die in Desmosomen vorkommenden Cadherine gehören zu den desmosomalen Cadherinen (Nose et al., 1987; Ringwald et al., 1987; Hatta et al. 1988).

Aufgrund der Übersichtlichkeit und der Relevanz für diese Arbeit, wird im weiteren Verlauf ausschließlich auf die klassischen Cadherine, hier stellvertretend E-Cadherin, und die desmosomalen Cadherine (Desmocolline, Desmogleine) eingegangen.

E-Cadherin gehört zu den klassischen Cadherinen und ist der Prototyp aller Proteine der Cadherin-Familie. Es ist am Aufbau der *Adherens junctions* beteiligt und in allen Epithelien anzutreffen. Der allgemeine Aufbau besteht aus fünf extrazellulären *repeats* (*extracellular cadherin*, EC-Domäne), die jeweils ca. 100 Aminosäuren lang sind, einer transmembranären und einer cytoplasmatischen Domäne. Mit seiner extrazellulären Domäne bildet E-Cadherin kalziumabhängig homophile Zellverbindungen mit der Nachbarzelle aus. Die cytoplasmatische Domäne unterteilt sich weiterhin in zwei Abschnitte: die juxtamembranäre Domäne (JMD) und die Catenin-bindende Domäne (CBD). An die JMD binden die p120-Catenine (p120, NPRAP, p0071 und ARVCF). An die CBD binden die klassischen Catenine (β -Catenin und Plakoglobin). Über die Bindung an α -Catenin kommt es zur Verbindung des Zytoskeletts mit E-Cadherin (Abb. 3) (Nagafuchi und Takeichi, 1988; van Roy und Berx, 2008; Sotomayor et al., 2014).

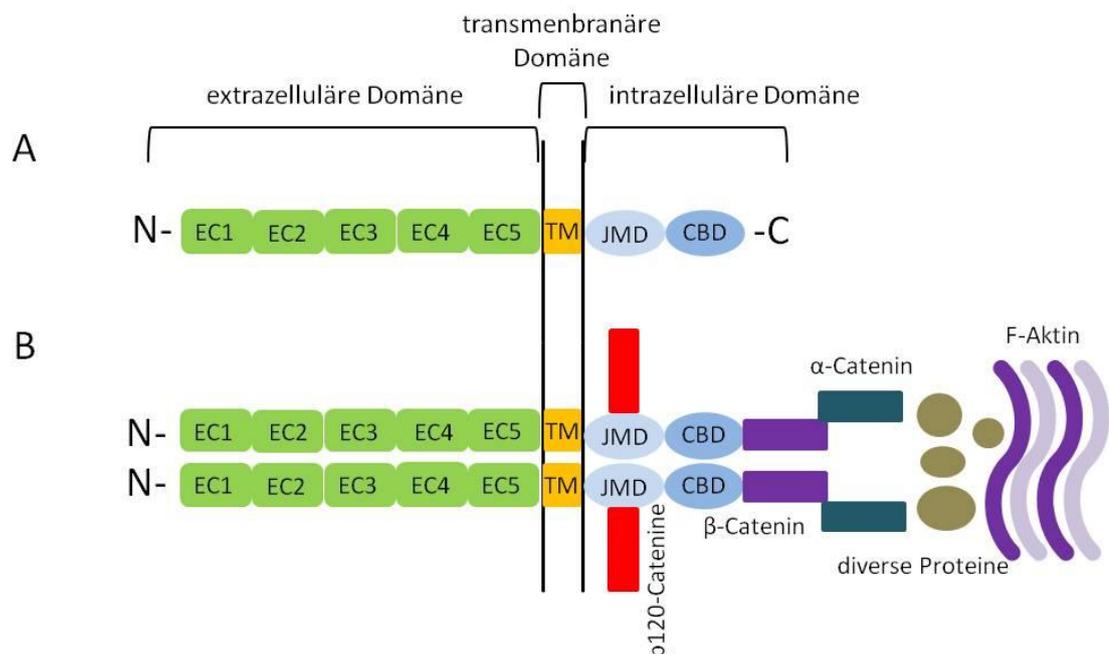


Abbildung 3: Aufbau von E-Cadherin und Interaktion mit assoziierten Proteinen (schematisch, modifiziert nach van Roy und Berx, 2008, S. 3759 - 3760)

(A) Der allgemeine Aufbau von E-Cadherin besteht aus einer extrazellulären Domäne aus fünf extrazellulären *repeats* (EC 1–5), einer transmembranären Domäne (TM) und einer intrazellulären Domäne, die ihrerseits aus der juxtamembranären Domäne (JMD) und der Catenin-bindenden Domäne (CBD) gebildet wird.

(B) Im Bereich der intrazellulären Domäne kommt es zur Interaktion mit assoziierten Proteinen. Im Bereich der JMD interagieren die p120-Catenine (rot). Im Bereich der CBD interagieren die klassischen Catenine, z. B. β -Catenin (lila). An β -Catenin bindet weiterhin α -Catenin (dunkelgrün). Dieses bindet wiederum an diverse andere Proteine (braun). Hierüber entsteht die Verbindung zum Zytoskelett (hell- und dunkellila).

Bereits in der Embryonalentwicklung ist E-Cadherin wesentlich an der Ausbildung von Organen beteiligt (Takeichi, 1988). Bei der Entstehung von malignen Tumoren spielt E-

Cadherin eine herausragende Rolle. Ein Verlust von E-Cadherin in Tumoren sorgt dafür, dass sich Tumorzellen aus dem Zellverband lösen können. Damit ist die Grundlage zur Metastasenbildung geschaffen (Behrens, 1989; Mareel et al., 1991, Navarro, 1991; Birchmeier, 1994; Chalmers et al., 1999).

Desmocolline (Desmocollin 1–3) und Desmogleine (Desmoglein 1–4) gehören zu den desmosomalen Cadherinen. Sie sind am Aufbau von Desmosomen beteiligt und in Zellen anzutreffen, die einem hohen mechanischen Stress ausgesetzt sind (z. B. Herzmuskelzellen, Hautzellen). Der allgemeine Aufbau ist dem E-Cadherin sehr ähnlich. Die desmosomalen Cadherine bestehen ebenfalls aus einer extrazellulären Domäne mit fünf extrazellulären *repeats*, einer cytoplasmatischen und einer intrazellulären Domäne. Die extrazellulären Domänen sind, im Gegensatz zu den klassischen Cadherinen, in der Lage, homo- und heterophile Verbindungen einzugehen (Hatzfeld et al., 2017). Die intrazelluläre Domäne der Desmogleine unterteilt sich weiter in einen intrazellulären Anker (IA), eine Cadherin-ähnliche Sequenz (ICS), eine prolinreiche Verbindung (IPL), eine einheitliche *Repeat*-Domäne (RUD) und eine Desmoglein-End-Domäne (DTD). Die intrazelluläre Domäne der Desmocolline unterteilt sich in einen intrazellulären Anker und eine Cadherin-ähnliche Sequenz (Abb. 4). Auf der intrazellulären Seite der Desmosomen wird die desmosomale Plaque gebildet. Die desmosomalen Cadherine interagieren dazu mit den Plakophilinen und Plakoglobin, Mitgliedern der Armadillo-Proteinfamilie (Kowalczyk und Green, 2013). Diese wiederum binden Desmoplakin, welches die Desmosomen mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts verknüpft (Hatzfeld et al., 2003; Hatzfeld, 2007).

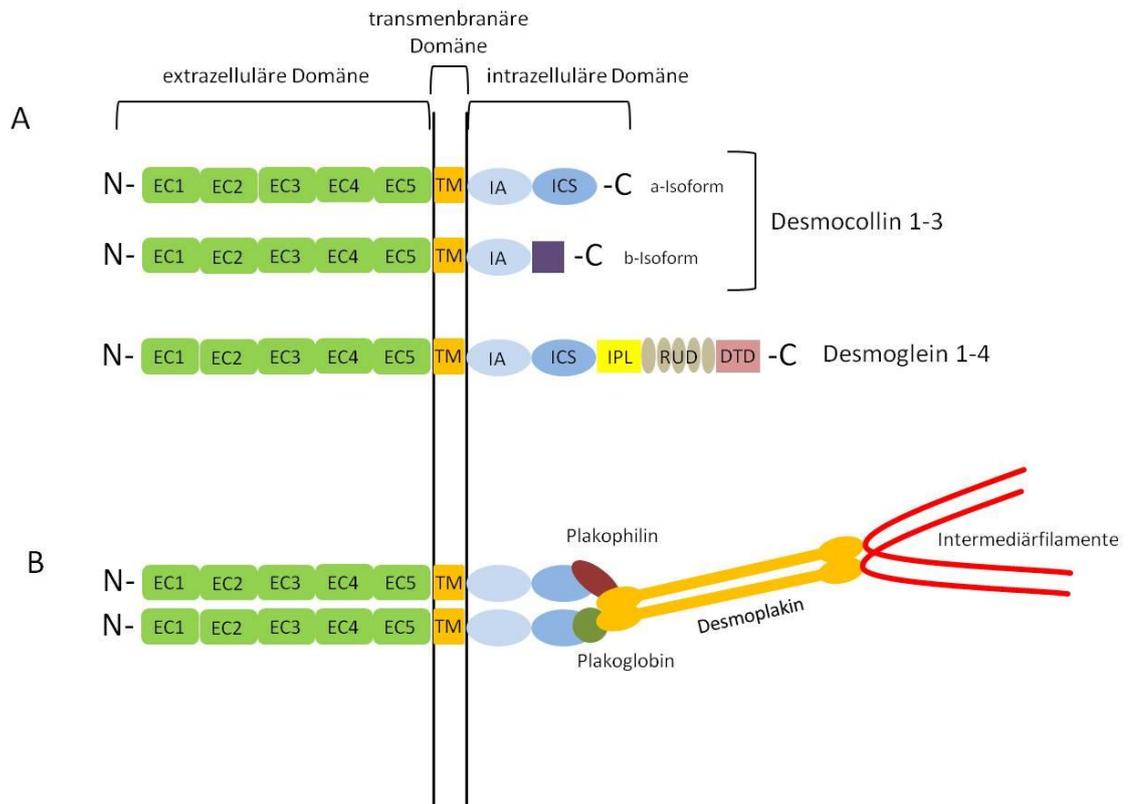


Abbildung 4: Aufbau desmosomaler Cadherine und Interaktion mit assoziierten Proteinen (schematisch, modifiziert nach Kowalczyk und Green, 2013, S. 18 - 19)

(A) Der allgemeine Aufbau der desmosomalen Cadherine besteht aus einer extrazellulären Domäne aus fünf extrazellulären *repeats* (EC1-5), einer transmembranären Domäne (TM) und einer intrazellulären Domäne.

Die intrazelluläre Domäne der Desmocolline besteht aus einem intrazellulären Anker (IA) und aus einer intrazellulären Cadherin-ähnlichen Sequenz (ICS). Die intrazelluläre Domäne der Desmogleine besteht weiterhin aus einer intrazellulären prolinreichen Verbindung (IPL), einer einheitlichen *Repeat*-Domäne (RUD) und einer Desmoglein-End-Domäne (DTD).

(B) Interaktion mit assoziierten Proteinen am Beispiel der Desmocolline. Im Bereich der intrazellulären Domäne kommt es zur Proteininteraktion. Im Bereich der ICS interagiert Plakoglobin (dunkelgrün) und/oder Plakophilin (braun). Weiterhin kommt es dann zur Interaktion mit Desmoplakin (orange). Desmoplakin verbindet die desmosomalen Cadherine mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts.

Für die desmosomalen Cadherine ist ebenfalls bekannt, dass sie entscheidenden Einfluss auf die Aggressivität eines Tumors haben. Auch hier führt ein Verlust zu einer vermehrten Invasivität des Tumors und zur Metastasenbildung durch Herauslösen von Zellen aus dem Zellverband (Moll et al., 1994; Davies et al., 1997; Tselepis et al., 1998; Bruin et al., 1999).

1.2.3 Die Familie der Armadillo-Proteine

Zur Armadillo-Proteinfamilie gehört eine Vielzahl von Proteinen, die sich in Größe und Funktion unterscheiden. Diese Proteine werden durch eine Armadillo-Domäne (Arm) charakterisiert. Die Arm-Domäne besteht aus einem Motiv, das ca. 42 Aminosäuren lang ist. Dieses Motiv wiederholt sich in variabler Anzahl und wurde erstmals in *Drosophila melanogaster* entdeckt (Riggleman et al., 1989). Ein *Arm-repeat* besteht aus drei α -Helices, die sich zu einer Superhelix zusammenlagern (Huber et al., 1997). Die Einteilung in Unterfamilien erfolgt anhand der Arm-Domänen. Zur Gruppe der

klassischen Catenine gehören β -Catenin und Plakoglobin (γ -Catenin). Zu den p120-Cateninen zählen p120, ARVCF (*Armadillo-repeat gene deleted in velo-cardio-facial syndrome*), NPRAP (δ -Catenin) und p0071 (Plakophilin 4). Zu den Plakophilinen gehören Plakophilin 1–3 (Abb. 5).

β -Catenin, p120, NPRAP und ARVCF sind überwiegend in *Adherens junctions* zu finden und interagieren bevorzugt mit klassischen Cadherinen. Plakoglobin, p0071 (Plakophilin 4) und Plakophilin 3 interagieren sowohl mit E-Cadherin als auch mit den desmosomalen Cadherinen Desmoglein und Desmocollin (Hatzfeld und Nachtsheim, 1996; Kaufmann et al., 2000; Hatzfeld et al., 2003). Die Plakophiline 1 und 2 interagieren mit den desmosomalen Cadherinen in Desmosomen (Hatzfeld et al., 2000).

Zielsetzung dieser Arbeit ist es u. a. zu untersuchen, ob die p120-Catenine mit E-Cadherin unterschiedliche Proteinkomplexe bilden und ob diese Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben. Daher wird zum besseren Verständnis dieser Arbeit im weiteren Abschnitt über die Proteine p0071, p120 und NPRAP näher berichtet. ARVCF wird in dieser Arbeit nicht untersucht, da es in der untersuchten Zellreihe nicht exprimiert wird.

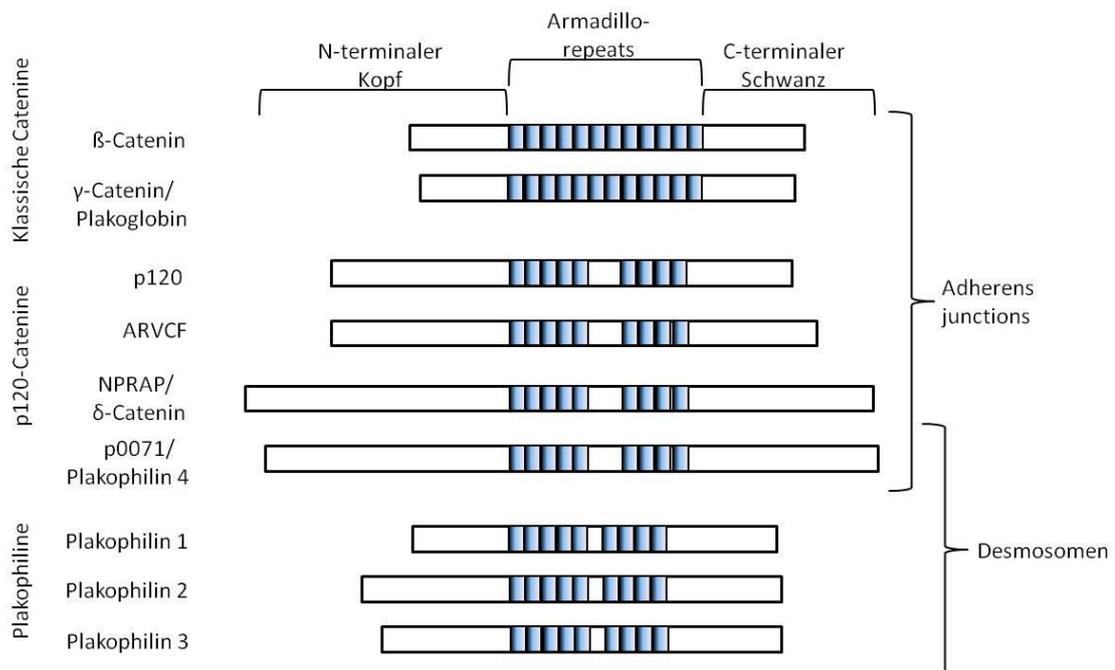


Abbildung 5: Armadillo-Proteine (schematisch, modifiziert nach Bass-Zubek et al. 2009, S. 11)

Die Armadillo-Proteine werden unterteilt in klassische Catenine mit β -Catenin und Plakoglobin (γ -Catenin), p120-Catenine mit p120, ARVCF, NPRAP (δ -Catenin) und p0071 (Plakophilin 4) und die Plakophilin 1–3. Die Proteine besitzen jeweils eine N-terminale Kopfdomäne, die Armadillo-*repeats* (blau) und eine C-terminale Schwanzdomäne.

1.2.4 Die Familie der p120-Catenine

Die Mitglieder der Familie der p120-Catenine sind multifunktionale Proteine und haben vielfältige Aufgaben, u. a. bei der Stabilisierung der klassischen Cadherine an der Zellmembran, bei der Beeinflussung der Zellmotilität und bei den Funktionen im Zellkern.

P120 ist der Prototyp der p120-Catenine und wurde 1989 erstmals als Substrat der onkogenen src-Kinase beschrieben. Kurze Zeit später entdeckten Reynolds et al. (1989) die Assoziation zu E-Cadherin. P120 bindet mit seiner Armadillo-repeat-Domäne an die JMD von E-Cadherin (Reynolds et al., 1989; Reynolds et al., 1992; Reynolds et al., 1994). Es hat einen stabilisierenden Effekt auf E-Cadherin an Zellkontakten und wirkt damit als Tumorsuppressor, da es das Herauslösen einer Zelle aus dem Zellverband verhindert (Ireton et al., 2002; Davis et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von p120 gleichzeitig zu einer Reduktion der klassischen Cadherine, sowie von β -Catenin und α -Catenin führt (Davis et al., 2003). Aufgrund der stabilisierenden Funktion von p120 auf E-Cadherin an Zellkontakten ist es nicht verwunderlich, dass Zusammenhänge zu malignen Tumoren gefunden wurden. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Reduktion von p120 in Tumorzellen zu einer schlechteren Zelldifferenzierung und einem schlechteren *Outcome* für den Patienten führt (Schackmann et al., 2013). Gezeigt wurde dies u. a. für Blasenkarzinome, Adenokarzinome des gastroösophagealen Übergangs und Pankreaskarzinome (Wijnhoven et al., 2005; Silva Neto et al., 2008; Fei et al., 2009).

Weiterhin besitzt p120 über Transkriptionsfaktoren wie z. B. Kaiso Funktionen im Zellkern (Daniel und Reynolds, 1999; Prokhortchouk et al., 2001).

Über die Modulation von Rho-GTPasen beeinflusst p120 zusätzlich vielfältige Zellfunktionen (Noren et al., 2000; Grosheva et al., 2001; Anastasiadis und Reynolds, 2001). Rho-GTPasen sind hoch konservierte Proteine. Sie agieren als molekulare Schalter zwischen einer aktiven und einer inaktiven Form (Malliri und Collard, 2003). Darüber regulieren sie Zytoskelettproteine und spielen bei der Metastasenbildung eine entscheidende Rolle (Citalán-Madrid et al., 2013). Rho-GTPasen organisieren u. a. Mitose, Zellmorphogenese und Zellmigration. Die Proteine der p120-Catenine regulieren direkt oder indirekt Rho-GTPasen und sind damit in Prozesse wie Zelladhäsion, Migration, epithelial-mesenchymale Transition, Zellteilung und Neuritenwachstum eingebunden (Anastasiadis und Reynolds, 2001; Grosheva et al., 2001; Elia et al., 2006; Perez-Moreno et al., 2006; Wildenberg et al., 2006).

P0071 (Plakophilin 4) wurde 1996 durch Hatzfeld und Nachtsheim (1996) als Mitglied der Armadillo-Proteinfamilie identifiziert. Es ist bekannt, dass p0071 sowohl mit den

Cadherinen der *Adherens junctions* als auch mit den desmosomalen Cadherinen interagiert und möglicherweise eine regulierende Funktion zwischen *Adherens junctions* und Desmosomen (über Regulierung von Desmosomenbildung, Beeinflussung der Anordnung von *Adherens junctions* und Desmosomen zueinander) ausübt (Calkins et al., 2003; Hatzfeld, 2003; Setzer et al., 2004). Mit seiner Kopfdomäne bindet p0071 an desmosomale Cadherine und mit der Armadillo-*repeat*-Domäne an die Cadherine der *Adherens junctions*. Die Überexpression von p0071 rekrutiert und stabilisiert E-Cadherin an der Zellmembran (Hatzfeld, 2003). Neben dem membranären Pool von p0071 übt dieses Protein weitere Funktionen im Zytoplasma und im Zellkern aus. In Zellen des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms konnte gezeigt werden, dass es nach Überexpression von p0071 und E-Cadherin (jeweils zytoplasmatischer Anteil) zu einem schlechteren *Outcome* für die Patienten kommt (Zhao et al., 2018).

Weiterhin ist p0071 wesentlich an der Koordination der Zellteilung beteiligt. Über direkte Interaktion mit RhoA ist es für die Ausbildung eines kontraktiven Ringes verantwortlich. Sowohl Überexpression von p0071 als auch *knockdown* beeinträchtigen die Zellteilung maßgeblich. Es kommt zur Ausbildung von mehrkernigen Zellen oder zur Einleitung der Apoptose (Wolf et al., 2006; Keil et al., 2007). Des Weiteren reguliert p0071 über Rho-GTPasen die Modulation des Aktinzytoskeletts und damit die Ausbildung von Dendritenverzweigungen (Elia et al., 2006; Wolf et al., 2006). In Hefe-2-Hybrid-Screenings konnten 22 Bindungspartner für p0071 identifiziert werden, die an der Zytoskelettorganisation beteiligt sind (Keil et al., 2013).

NPRAP ([*Neural Plakophilin Related Arm-repeat Protein*]/ δ -Catenin/Neurojungin) ist der nächste Verwandte von p0071 und kommt physiologisch vor allem in neuronalem und neuroendokrinem Gewebe vor. Es besteht eine große strukturelle Ähnlichkeit zu p120, p0071 und ARVCF (Paffenholz und Franke, 1997; Zhou et al., 1997). NPRAP bindet, wie alle p120-Catenine, an die JMD von E-Cadherin (Lu et al., 1999) und besitzt vielfältige Interaktionspartner, z. B. Rho-GTPasen, Presenilin-1, AMPA und Glutamatrezeptoren (Zhou et al., 1997; Silverman et al., 2007; Kim et al., 2008). Weiterhin ist NPRAP mit kognitiven und synaptischen Dysfunktionen, dem Morbus Alzheimer und dem Cri-du-Chat-Syndrom assoziiert. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung bei Autismus (Medina et al., 2000; Liauw et al., 2002; Israely et al., 2004; Kim et al., 2006; Turner et al., 2015). Neben diesen primär neuronalen Erkrankungen spielt NPRAP eine große Rolle in malignen Tumoren. Es konnte gezeigt werden, dass NPRAP in Karzinomen der Prostata, der Brustdrüse, der Ovarien und der Lunge (nicht kleinzelliges Lungenkarzinom) überexprimiert wird (Fang et al., 2012; Di Zhang et al., 2015). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Überexpression mit einem

geringeren Differenzierungsgrad der Zellen und schlechterem *Outcome* für die Patienten einhergeht (Zhang et al., 2013; Dai et al., 2011).

Über das genaue Zusammenspiel der einzelnen p120-Catenine untereinander ist aktuell wenig bekannt. Kontrovers diskutiert wird die gegenseitige Einflussnahme von p120 und NPRAP. Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von NPRAP mit einem schlechteren Tumorstadium und *Outcome* assoziiert ist (Fang et al., 2012; Zhang et al., 2013). Yang et al. (2010) zeigten, dass die Überexpression von NPRAP zu einem reduzierten Level von p120 führt. Es wird eine kompetitive Bindung an E-Cadherin vermutet, die dazu führt, dass die erfolgreiche Bindung von p120 oder NPRAP an E-Cadherin zu einer Destabilisierung des jeweils anderen Proteins führt. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe um Zhang et al. (2010) in zwei Lungenkrebszelllinien eine nicht kompetitive Bindung zwischen NPRAP und p120 an E-Cadherin im Zytoplasma zeigen. Auch hier war die Überexpression von NPRAP mit einem geringeren Differenzierungsgrad des Tumors und einem schlechteren *Outcome* für den Patienten vergesellschaftet. Davis et al. (2003) gelang es nachzuweisen, dass NPRAP und ARVCF in Zellen mit p120-*knockdown* in der Lage sind, die Cadherin-basierten Zellverbindungen wiederherzustellen. Das heißt, es ist Gegenstand aktueller Forschung zu verstehen, wie sich die p120-Catenine gegenseitig beeinflussen und welche Rolle diese Beeinflussung bei Tumorwachstum und Metastasierung spielt.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In vielen Zellen und Geweben existieren unterschiedliche Cadherine und Proteine der p120-Catenine gleichzeitig. Ziel der Arbeit ist es zu untersuchen, ob die Proteinkomplexe in *Adherens junctions* einen identischen Aufbau aus E-Cadherin und den p120-Cateninen aufweisen oder ob unterschiedliche Proteinkomplexe, mit möglicherweise unterschiedlichen Eigenschaften, nebeneinander existieren. Hierfür wurde die Lokalisation der Armadillo-Proteine p0071, p120 und NPRAP in *Adherens junctions* untersucht und die jeweilige Proteinkomplexbildung mit E-Cadherin betrachtet.

Um weiterhin herauszufinden, ob die Proteinkomplexe verschiedene oder redundante Funktionen aufweisen, erfolgten Untersuchungen nach *knockdown* oder Überexpression einzelner p120-Catenine.

Diese Experimente sollen zum Verständnis der Funktionen von Cadherin-Catenin-Komplexen beitragen, um in Zukunft besser verstehen zu können, wie es zur Metastasierung von Tumorzellen kommt und wie dieser Vorgang beeinflusst werden kann.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Puffer

Puffer	Inhaltsstoffe
10x Ponceau-Rot	2 % (v/v) Ponceau S; 30 % (v/v) TCA; 30 % (v/v) Sulfosalicylsäure
4x SDS-Ladepuffer	250 mM Tris/HCL (pH 6,8); 8 % (v/v) SDS; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (v/v) Bromphenolblau
Blotpuffer I	0,3 M Tris/HCL (pH: 10,4); 20 % (v/v) Methanol
Blotpuffer II	25 mM Tris/HCL (pH 10,4); 20 % (v/v) Methanol
Blotpuffer III	25 mM Tris/HCL (pH 9,4); 40mM α -Aminocapronsäure, 20 % (v/v) Methanol
ECL-Lösung 1	100 mM Tris/HCL (pH 8,5); 25 mM Luminol; 0,4 mM Cumarin
ECL-Lösung 2	100 mM Tris/HCL (pH 8,5); 0,02 % (v/v) H ₂ O ₂
Einfriermedium	500 ml DMEM; 10 % (v/v) DMSO; 20 % (v/v) FBS
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris; 19,2 mM Glycin; 0,1 % (v/v) SDS
Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer)	20 mM Tris/HCL (pH 8); 137 mM NaCl; 1 % (v/v) Igepal CA-630; 10 % (v/v) Glycerin; 2 mM EDTA
Kristallviolett	0,05 % (v/v) Kristallviolett; PBS
Kulturmiedium	500 ml DMEM; 10 % (v/v) FBS; 1 mM Natriumpyruvat
Mowiol	5 % (v/v) Mowiol; 30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (v/v) DABCO
MT-Puffer	100 mM Pipes (pH 6,9); 4 M Glycerin; 2 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0,5 % (v/v) Triton X-100
PBSE-Puffer	135 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5 mM EDTA; pH 7,4
PBS-Puffer	135 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TBE-Puffer	44,5 mM Tris/HCL; 44,5 mM Borsäure; 1 mM EDTA
TBS-Puffer	10 mM Tris/HCL (pH 7,6); 100 mM NaCl
TBST-Puffer	10 mM Tris/HCL (pH 7,6); 100 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween20
Trypsin	0,025 % (v/v) Trypsin; 0,02 % (v/v) EDTA

3.1.2 Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Kategorie	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-p0071-tail#10	pAk; Meerschweinchen	1:150 [WB]; 1:50 [IF, IP]	M. Hatzfeld
Anti-p0071 (406)	mAk; Maus	1:25 [WB]	Progen
Anti-E-Cadherin	mAk; Maus	1: 2000 [WB]	Transduction
Anti-E-Cadherin	mAk; Kaninchen	1:250 [IF]; 1:50 [IP]	Abcam
Anti-p120	mAk; Maus	1:1000 [WB]; 1:100[IF]; 1:50 [IP]	Transduction
Anti-p120	pAk; Kaninchen	1:100 [IF]	Santa Cruz
Anti-NPRAP	mAk; Maus	1:200 [WB]; 1:50 [IF]	Transduction
Anti- β -Catenin	mAk; Maus	1:2000 [WB]	Transduction
Anti- α -Tubulin	mAk; Maus	1:3000 [WB]	Sigma-Aldrich
Anti-Desmoplakin	mAk; Kaninchen	1: 500 [IF]	K. Green

Sekundärantikörper	Kategorie	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Meerschweinchen-DL488	pAk; Esel	1:250	Dianova
Anti-Meerschweinchen-Cy3	pAk; Esel	1:250	Dianova
Anti-Maus-DL488	pAk; Esel	1:250	Dianova
Anti-Maus-Cy3	pAk; Esel	1:250	Dianova
Anti-Kaninchen-DL488	pAk; Esel	1:250	Dianova
Anti-Kaninchen-Cy3	pAk; Esel	1:100	Dianova

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot			
Die verwendeten Sekundärantikörper sind mit <i>horseradish peroxidase</i> (HRP) markiert und setzen einen Lumineszenzfarbstoff um.			
Sekundärantikörper	Kategorie	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen-HRP	pAk; Esel	1:40.000	Dianova
Anti-Maus-HRP	pAk; Esel	1:20.000	Dianova
Anti-Meerscheinchchen-HRP	pAk; Esel	1:20.000	Dianova

3.1.3 Verwendete si-RNA

Tabelle 8: Verwendete si-RNA		
Wenn mehr als eine si-RNA für ein Protein angegeben ist, so wurde ein Mix aus den verschiedenen si-RNAs verwendet.		
si-RNA	Zielsequenz	Bezugsquelle
Kontroll-si-RNA	TGCGCTAGGCCTCGGTTGCTT	MWG
p0071-si-RNA #4	GCACATTACTCCTATATATGA	MWG
p0071-si-RNA #5	CATTCTGGATGGAATAACTCT	MWG
p0071-si-RNA #6	GATAACGATAGAGTTGTTTCT	MWG
NPRAP-si-RNA #1	CTACAGGAATCAGGAATAC	MWG
NPRAP-si-RNA #2	GGATGGATGGTCACAATAC	MWG
p120-si-RNA #1	GGTGAAGACTGACGTGCCG	MWG
p120-si-RNA #2	GTTTAGCAAGCTTGGATAG	MWG

3.1.4 Verwendete Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte	
Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubatoren	Heraeus Instruments; Bad Grund
Mikroskop-System ‚Cell Observer‘	Carl Zeiss
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	Peqlab; Erlangen
Schüttel-Inkubatoren	GFL; Burgwedel
SDS-PAGE-System Mini-Protean	Biorad; München
Sterilbank	Kendro; Langenselbold
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments
Kühlzentrifuge Sigma 2-16PK	Fisher Bioblock Scientific; Illkirch Graffenstaden, Frankreich

3.1.5 Verwendete Zelllinien

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien		
Zelllinie	Beschreibung	Referenz
MCF-7	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie	Soule et al., 1973
MCF-7-OE- p0071	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie, Zelllinie mit stabiler Expression von p0071-WT; transduziert mit p0071-WT-pLVX-puro	
MCF-7-OE-Kontrolle	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie, Kontrollzelllinie (Vektorkontrolle); transduziert mit pLVX-puro	

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden die in Tab. 10 aufgeführten Zelllinien verwendet. Alle Zelllinien wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgemeinschaft Hatzfeld zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien MCF-7-OE-p0071 und MCF-7-OE-Kontrolle wurden durch Dr. René Keil zur Verfügung gestellt. Zu deren Etablierung wurden MCF-7-Zellen entweder mit einem Plasmid, das für humanes p0071 codiert (p0071-WT-pLVX-puro), oder dem entsprechenden Grundvektor (pLVX-puro) lentiviral transduziert. Im Anschluss erfolgte eine mehrwöchige Selektion mit 1 µg/ml Puromycin im Kulturmedium. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben mit 1 µg/ml Puromycin im Kulturmedium.

3.2.2 Kultivierung von MCF-7-Zellen

MCF-7-Zellen wurden auf unbeschichteten 10cm-Kulturschalen bei einer Temperatur von 37 °C, 20 % O₂ und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Als Kulturmedium diente *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), versetzt mit 10 % FBS und 1 mM Natriumpyruvat. Alle 2–3 Tage erfolgte die Passagierung der Zellen. Hierzu wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen wurden anschließend mit PBSE gewaschen und durch 0,05 % Trypsin/PBSE von der Kulturschale abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in frisches Kulturmedium aufgenommen und bei 1.000 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt oder durch Zellzählung eine definierte Menge Zellen in entsprechende Zellkulturplatten eingesät.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von MCF-7-Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Das Auftauen erfolgte in Kulturmedium bei 37 °C. Die Zellen wurden anschließend bei 1.000 x g fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und die Suspension in Kulturschalen überführt. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese von der Kulturschale abgelöst und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen und in Einfriereröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte über Nacht bei – 80 °C. In einem Einfrierbehälter gefüllt mit Isopropanol betrug die Kühlungsrate -1 °C/Minute.

3.2.4 Zellzählung

Durch die Zählung von Zellen ist es möglich, eine definierte Menge Zellen in Kulturschalen einzusäen. Das Ablösen der Zellen von der Kulturschale erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Bevor die Zellsuspension in die neue Kulturschale gegeben

wurde, erfolgte die Zellzählung. Dafür wurde eine definierte Menge Kulturmedium, je nach gewünschter Verdünnung, in ein Eppendorfgefäß vorgelegt. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension gegeben und miteinander vermischt. Diese Suspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und vier Eckquadrate wurden ausgezählt.

Die Berechnung erfolgte durch folgende Formel:

Istzellzahl/ml = gezählte Zellzahl/Eckquadrate x Verdünnungsfaktor x 10^5

Die einzusäende Zielkonzentration wurde durch folgende Formel berechnet:

Zu pipettierende Menge in µl = Zielzellzahl/Istzellzahl

Die errechnete Menge wurde der Zellsuspension entnommen, in eine Kulturschale mit frischem Kulturmedium gegeben und die Zellen anschließend kultiviert.

3.2.5 Transfektion von si-RNA mittels Lipofection

Die Methode der Transfektion dient der Möglichkeit, fremde Nukleinsäuren, u. a. *small interfering* RNA (si-RNA), in Zellen einzubringen. Bei der Transfektion mit Lipofectamine[®] 2000 werden Nukleinsäuren in Liposomen eingebracht. Diese Liposomen fusionieren leicht mit der Zellmembran und bringen die si-RNA in die Zellen ein. Si-RNA-Moleküle codieren für kein Protein, sie binden in der Zelle an komplementäre mRNA. Über die Vermittlung des Enzymkomplexes RISC (*RNA-induced silencing complex*) kommt es zur Spaltung der mRNA und damit zur Zerstörung der Information. Dieser Vorgang wird RNA-Interferenz genannt und dient in den Biowissenschaften der experimentellen Stilllegung von Genen (Pratt und MacRae 2009). Alle Transfektionen von si-RNA erfolgten nach dem Herstellerprotokoll mittels Lipofectamine[®] 2000 (Invitogen). Dabei wurden Zellen mit einer Konzentration von $0,25 \times 10^5$ Zellen/cm² eingesät und über 24 Stunden kultiviert. Nach einem Wechsel des Kulturmediums wurde die Transfektion mit 1,5 µl Lipofectamin[®] 2000 und 20 pmol si-RNA, je 24 Well, durchgeführt und die Zellen wurden weiter kultiviert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein erneuter Wechsel des Kulturmediums. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte entweder die Proteinisolation für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot oder die Immunfluoreszenz.

3.2.6 Immunfluoreszenz

Die Methode der Immunfluoreszenz eignet sich, um Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und sichtbar zu machen. Dafür wurden Zellen einer definierten Menge ($0,3 \times 10^5$ Zellen/cm²) auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen eingesät. Je nach durchgeführtem Experiment erfolgte die Immunfluoreszenz 48 Stunden nach dem Einsäen oder 48 Stunden nach der Transfektion (entspricht 72 Stunden nach dem Einsäen). Am Tag der Immunfluoreszenz wurden die Deckgläschen in PBS gewaschen und anschließend 10

Minuten in Methanol (-20 °C) fixiert. Im Anschluss erfolgten eine 15-minütige Permeabilisierung mittels MT-Puffer bei Raumtemperatur und ein weiterer Waschschrift mit PBS. Danach wurden die Deckgläschen bei Raumtemperatur für 20 Minuten in 1 % Milchpulver/PBS inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte bei 4 °C, über Nacht, in einer feuchten Kammer. Hierfür wurde jedes Deckgläschen mit 25 µl Primärantikörperverdünnung (in 1 % Milchpulver/PBS) bedeckt. Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation in 1 % Milchpulver/PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen mit 25 µl Sekundärantikörperverdünnung (in 1 % Milchpulver/PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur, im Dunkeln, inkubiert. Die Anfärbung der Kern-DNA erfolgte mittels DAPI (1:4000), zeitgleich mit dem Sekundärantikörper. Nach weiteren drei jeweils 5-minütigen Waschschriften mit PBS wurden die Deckgläschen kurz in Wasser und anschließend kurz in 96 % Ethanol getaucht. Nach 10-minütiger Lufttrocknung erfolgte die Einbettung mit Mowiol[®]. Die Aufnahme und Dokumentation der Bilder erfolgten an einem Zeiss Axio Observer Mikroskop mit der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Jena) unter Verwendung eines Ölimmersions-Objektivs (Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil). Für die Bearbeitung der Bilder wurde das Programm ImageJ verwendet.

3.2.7 ,Wundheilungs-Assay‘ und *Live-Cell-Imaging*

Mit dem ,Wundheilungs-Assay‘ und dem ,*Live-Cell-Imaging*‘ ist es möglich, lebende Zellen bei der Fortbewegung zu beobachten und diese Beobachtungen zu dokumentieren. Für diese Untersuchungen wurden die Zelllinien MCF-7-OE-p0071 und MCF-7-OE-Kontrolle in *Culture-Silicon-Inserts* (Ibidi, München) in einer 12-Well-Platte eingesät. In jede Hälfte des *Culture Silicon Inserts* wurden 70 µl einer Zellsuspension (7×10^4 Zellen/70µl) pipettiert und über 24 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das *Culture-Silicon-Insert* vorsichtig aus dem Well gelöst, sodass zwischen beiden Zellrasen ein freier Streifen sichtbar war (Abb. 6). Innerhalb dieses Streifens erfolgte die Zellbewegung durch Proliferation und Migration. Die Bildaufnahme erfolgte mittels ,*Live-Cell-Imaging*‘ über 24 Stunden. Die Dokumentation der Bilder wurde stündlich durchgeführt. Während der Beobachtungszeit wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am Zeiss Axio Observer; Objektiv 10 x mit der Software AxioVision Rel. 4.7 (Carl Zeiss, Jena). Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Hierfür wurden die freien Flächen zwischen den Zellrasen ausgemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Zur besseren Visualisierung erfolgte die Auftragung der Öffnungsfläche in Prozent über die Zeit.

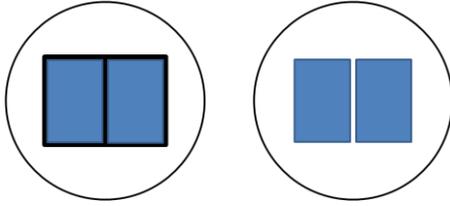


Abbildung 6: ‚Wundheilungs-Assay‘

Die erste Kulturschale zeigt das *Culture Silicon Inserts* (schwarz) und den Zellrasen (blau). Wenn das *Culture Silicon Inserts* herausgenommen wird, bleibt zwischen den beiden Zellrasen ein freier Streifen bestehen (zweite Kulturschale). Der Verschluss der Öffnungsfläche kann mittels ‚*Live-Cell-Imaging*‘ beobachtet werden.

3.2.8 Proteinisolation für Immunpräzipitation

MCF-7-Zellen wurden auf einer unbeschichteten 10cm-Kulturschale bei einer Temperatur von 37 °C, 20 % O₂ und 5 % CO₂-Gehalt über 24 Stunden kultiviert.

Nach 24 Stunden wurde zur Lyse der Zellen das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem TBS gewaschen und 1,2 ml Immunpräzipitationspuffer mit den Zusätzen 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM Pefabloc, 1 mM NaVO₃ und 10 mM NaF zu den Zellen gegeben. Das Lysat wurde zur effizienteren Lyse und Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen des Lysats erfolgte bei Raumtemperatur im Wasserbad. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 4 °C und 14.000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand wurde für die Immunpräzipitation verwendet.

3.2.9 Immunpräzipitation

Für jeden Immunpräzipitationsansatz wurden 20 µl Protein-Agarose verwendet. Diese wurden zur Vorbereitung dreimal in je 800 µl Immunpräzipitationspuffer gewaschen und jeweils für eine Minute bei 4 °C und 3.000 rpm zentrifugiert. Auf die äquilibrierte Agarose wurden je 800 µl Zelllysate und die entsprechende Antikörperverdünnung gegeben. Die Immunpräzipitation erfolgte bei 4 °C über 24 Stunden. Ein Teil des Zelllysats wurde nicht mit dem Antikörper inkubiert und diente als Gesamtextrakt (GE) zum Nachweis der vorhandenen Proteine im ursprünglichen Zelllysate. Nach 24 Stunden wurde die Agarose mit Immunpräzipitationspuffer gewaschen, anschließend trocken gesaugt, in 25 µl 2x SDS-Ladepuffer suspendiert und fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. 75 µl Gesamtextrakt wurden mit 25 µl 4x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C inkubiert. Beide Ansätze wurden dann für die SDS-PAGE und den Western Blot genutzt.

Im Ergebnisteil wird der Nachweis der Proteine im Gesamtextrakt (GE), im Überstand der Kontrolle (Ü_K), im Überstand der Immunpräzipitation (Ü_{IP}) und in der Immunpräzipitation (IP) gezeigt. Da kein Nachweis von Proteinen in der Kontrolle der

Immunpräzipitation (IP_K) möglich ist, können unspezifische Antikörperbindungen ausgeschlossen werden (siehe Abb. im Ergebnisteil).

3.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld. In ein SDS-Gel wurden in die erste Tasche 7 µl pEqGOLD Protein Marker I (Peqlab) und in die weiteren Taschen je 20 µl Proteinprobe aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 15 Minuten bei 70 Volt und danach für weitere 1,5 Stunden bei 90 Volt.

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dafür wurden je drei Lagen Filterpapier in Blotpuffer I, Blotpuffer II und Blotpuffer III getränkt. Die Nitrozellulosemembran wurde in Blotpuffer II getränkt. Die Transferapparatur wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf die Anode kamen je drei Lagen getränktes Filterpapier aus Blotpuffer I und Blotpuffer II, die getränkte Nitrozellulosemembran, das SDS-Polyacrylamidgel und drei Lagen getränktes Filterpapier aus Blotpuffer III. Pro Gel erfolgte der Transfer für 30 Minuten bei 100 Milliampere und weitere 15 Minuten bei 150 Milliampere. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-S-Rot angefärbt und danach mit Wasser gespült, bis die Banden sichtbar wurden. Die Proteinfärbung wurde mittels Scanner dokumentiert. Daraufhin folgten die Entfärbung der Membran mittels TBST und eine einstündige Inkubation mit 5 % Milchpulver/TBST bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungen. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in 3 % BSA/TBST in entsprechender Verdünnung. Nach 24 Stunden wurde die Nitrozellulosemembran 3 x je 15 Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper in 5 % Milchpulver/TBST eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrte in TBST und ein Waschschrte in TBS für je 15 Minuten. Nach Zugabe einer 1:1 Mischung von ECL-Lösung 1 und 2 auf die Membran erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz mittels Imager (Fusion SL 3500WL; Peqlab).

3.3 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden an mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken in den jeweiligen Diagrammen dargestellt. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der Student's t-Test verwendet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$).

4 ERGEBNISSE

MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) ist eine Brustkrebszelllinie, die von Soule et al. (1973) erstmals vorgestellt wurde. Da es sich bei MCF-7-Zellen um eine epitheliale Zelllinie handelt, ist diese gut zur Untersuchung von *Adherens junctions* und Desmosomen geeignet. In vorangegangenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass in MCF-7-Zellen u. a. E-Cadherin, Desmoplakin und die p120-Catenine p120, p0071 und NPRAP exprimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen zur Lokalisation von E-Cadherin, Desmoplakin und den p120-Cateninen p120, p0071 und NPRAP in Zellkontakten von MCF-7-Zellen. Weiterhin sollte der Einfluss des *knockdown* einzelner p120-Catenine und einer Überexpression von p0071 untersucht werden. Diese Experimente sollen einen Beitrag zum Verständnis möglicher unterschiedlicher Funktionen der p120-Catenine und der Proteinkomplexbildung mit E-Cadherin leisten. Es ist wichtig, diese Prozesse zu verstehen, da sie ein Schlüssel zum Verständnis der Metastasenbildung bei Tumoren darstellen und die Möglichkeit der Beeinflussung enthalten.

4.1 P120-Catenine interagieren mit E-Cadherin und bilden Proteinkomplexe

4.1.1 P120-Catenine interagieren mit E-Cadherin

Mit der Immunfluoreszenz ist es möglich, die beteiligten Proteine von Zellkontakten durch Fluoreszenzmarkierung sichtbar zu machen und die räumliche Nähe der Proteine zueinander darzustellen. Hierfür wurden verschiedene fluoreszierende Farbstoffe (Cy3 = rot und DL488 = grün), gebunden an Sekundärantikörper, verwendet. Diese Sekundärantikörper wurden mittels Primärantikörper an die zu detektierenden Proteine gebunden. Um zu untersuchen, ob die p120-Catenine in unterschiedlichen Zellkontakten lokalisieren, wurden Doppelfärbungen mit entweder zwei p120-Cateninen, einem p120-Catenin und E-Cadherin oder einem p120-Catenin und Desmoplakin angefertigt und die Co-Lokalisationen beider Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Bei diesen Experimenten ist zu bedenken, dass die Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie beschränkt ist (ca. 200–300 nm) und somit keine Aussagen darüber getroffen werden können, ob co-lokalisierende Proteine tatsächlich auch physikalisch miteinander interagieren.

Mit den Untersuchungen der Immunfluoreszenz sollte die Lokalisation der p120-Catenine, von E-Cadherin und Desmoplakin in Zellkontakten von nativen MCF-7-Zellen gezeigt werden. Weiterhin sollten Co-Lokalisationen der p120-Catenine untereinander sichtbar gemacht werden.

In den Experimenten zeigte sich, dass E-Cadherin (grün) mit p0071, p120 und NPRAP (alle rot) in Zellkontakten von MCF-7-Zellen co-lokalisiert. Diese Co-Lokalisation war unterschiedlich stark ausgeprägt. E-Cadherin und p120 co-lokalisierten am stärksten miteinander. Es gab wenige Bereiche an Zellkontakten mit E-Cadherin ohne p120 und so gut wie keine Zellkontakte mit p120 ohne E-Cadherin. E-Cadherin und NPRAP co-lokalisierten ähnlich stark miteinander wie E-Cadherin und p120. Auch hier zeigten sich vereinzelte Bereiche mit E-Cadherin ohne NPRAP, aber auch ganz vereinzelte Bereiche mit NPRAP ohne E-Cadherin. Die Co-Lokalisation zwischen E-Cadherin und p0071 war weniger stark ausgeprägt. An den Zellkontakten gab es auffällige Bereiche mit E-Cadherin ohne p0071 und Bereiche mit p0071 ohne E-Cadherin (Abb. 7).

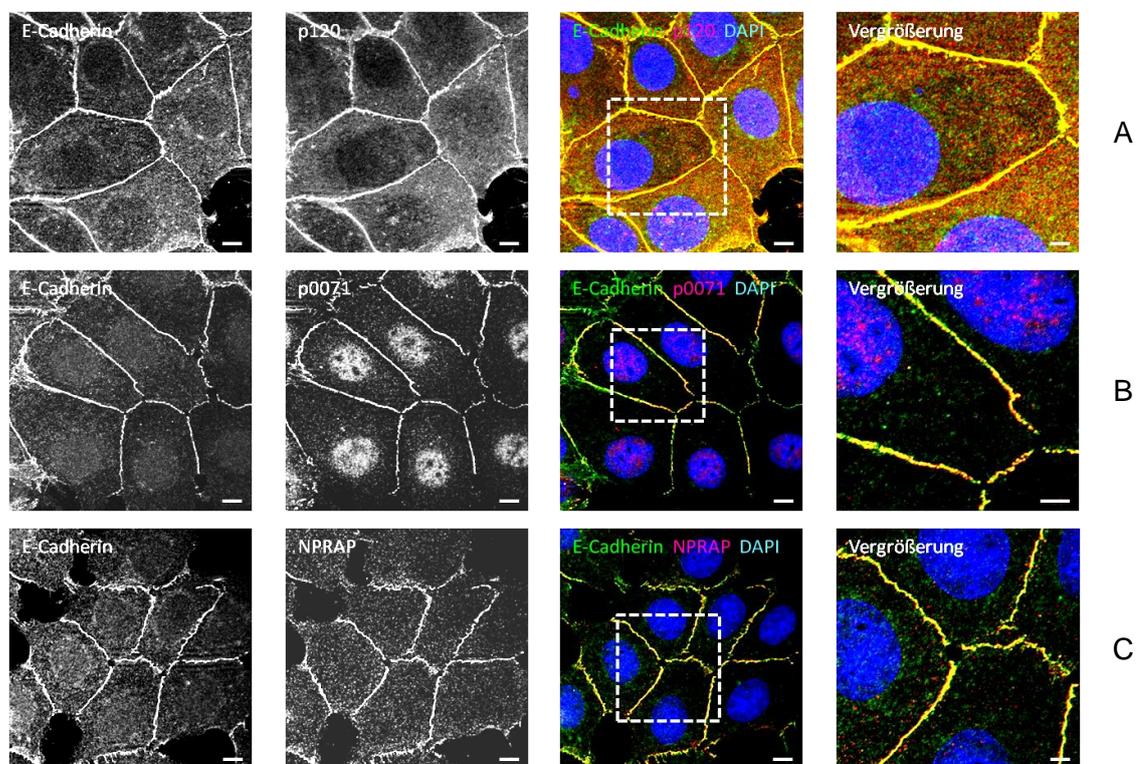


Abbildung 7: Ko-Lokalisation von E-Cadherin und p120 (A), p0071 (B) und NPRAP (C) in nativen MCF-7-Zellen
MCF-7-Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen in MeOH bei -20 °C fixiert. Als Primärantikörper wurden Anti-E-Cadherin-Kaninchen, Anti-p120-Maus, Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen und Anti-NPRAP-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (E-Cadherin) oder rot (p120, p0071, NPRAP) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm.

Es kann festgestellt werden, dass p120, NPRAP und p0071 in MCF-7-Zellen mit E-Cadherin co-lokalisieren und damit möglicherweise Bestandteile von *Adherens junctions* sind. Die unterschiedlichen Cadherin-Catenin-Komplexe sind vermutlich nicht räumlich voneinander getrennt. Aufgrund der Möglichkeit der deutlichen Darstellung von p0071 ohne E-Cadherin ist die Frage zu stellen, ob, und, falls ja, mit welchen weiteren Cadherinen p0071 co-lokalisiert.

Um zu untersuchen, ob die p120-Catenine auch miteinander co-lokalisieren, wurden Färbungen der Proteine p0071 (grün), p120 (rot) und NPRAP (rot oder grün) untereinander angefertigt. In diesen Experimenten wurde deutlich, dass p0071 mit NPRAP und p120 stärker co-lokalisiert als NPRAP mit p120. Die Ausprägung der Co-Lokalisation von p0071 mit NPRAP oder p120 war insgesamt vergleichbar. In beiden Fällen gab es Bereiche, in denen p0071 deutlich stärker akkumulierte und auch einzeln darstellbar war, während NPRAP und p120 in geringerer Ausprägung einzeln darstellbar waren. Weniger ausgeprägt war die Co-Lokalisation zwischen NPRAP und p120. Hier zeigten sich Bereiche, in denen vorwiegend p120 oder vorwiegend NPRAP lokalisierte (Abb. 8).

Diese Experimente zeigen, dass die p120-Catenine auch miteinander co-lokalisieren und möglicherweise eigene Proteinkomplexe bilden.

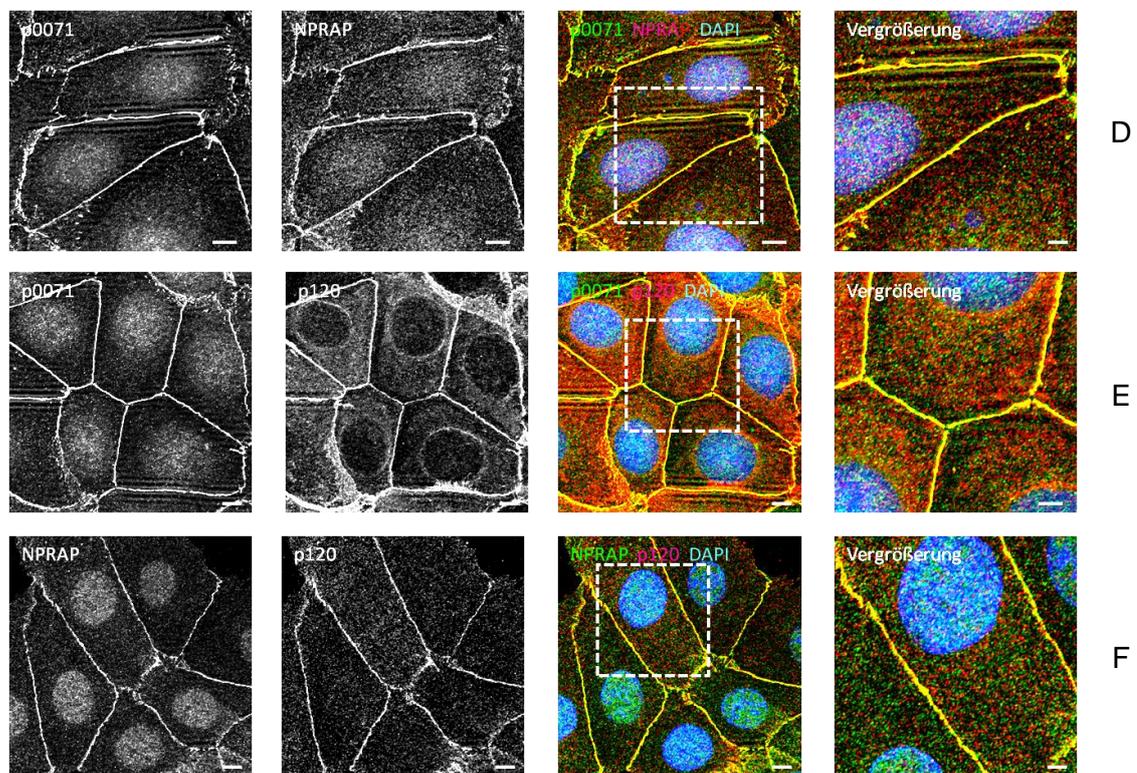


Abbildung 8: Co-Lokalisation von p0071 und NPRAP (D), p0071 und p120 (E) und NPRAP und p120 (F) in nativen MCF-7-Zellen

MCF-7-Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen in MeOH bei -20 °C fixiert. Als Primäntikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen, Anti-p120-Maus und Anti-NPRAP-Maus (D, E) bzw. Anti-p120-Kaninchen (F) verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071, NPRAP) oder rot (p120, NPRAP) markierte Sekundäntikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm.

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die p120-Catenine ebenfalls in Desmosomen lokalisieren. Hierfür erfolgte die Färbung von Desmoplakin (grün) jeweils mit p0071, p120 und NPRAP (alle rot).

Es lässt sich feststellen, dass alle p120-Catenine mit Desmoplakin co-lokalisieren. Die Ausprägung der Co-Lokalisation war unterschiedlich stark. Die stärkste Co-Lokalisation zeigte sich zwischen Desmoplakin und p120. Es waren viele überlappende Bereiche sichtbar. Desmoplakin und p120 waren aber auch jeweils einzeln darstellbar. Ähnlich zeigte sich die Ausprägung der Co-Lokalisation zwischen Desmoplakin und p0071 sowie NPRAP. In diesen Färbungen waren zum Teil deutliche Co-Lokalisationen sichtbar, alle drei Proteine waren aber auch einzeln an der Zellmembran darstellbar (Abb. 9). Diese Experimente weisen darauf hin, dass p120, p0071 und NPRAP möglicherweise auch Bestandteile von Desmosomen sind. Insgesamt ist die Auflösung der Immunfluoreszenz aber zu gering, um hierüber eine genauere Aussage zu treffen.

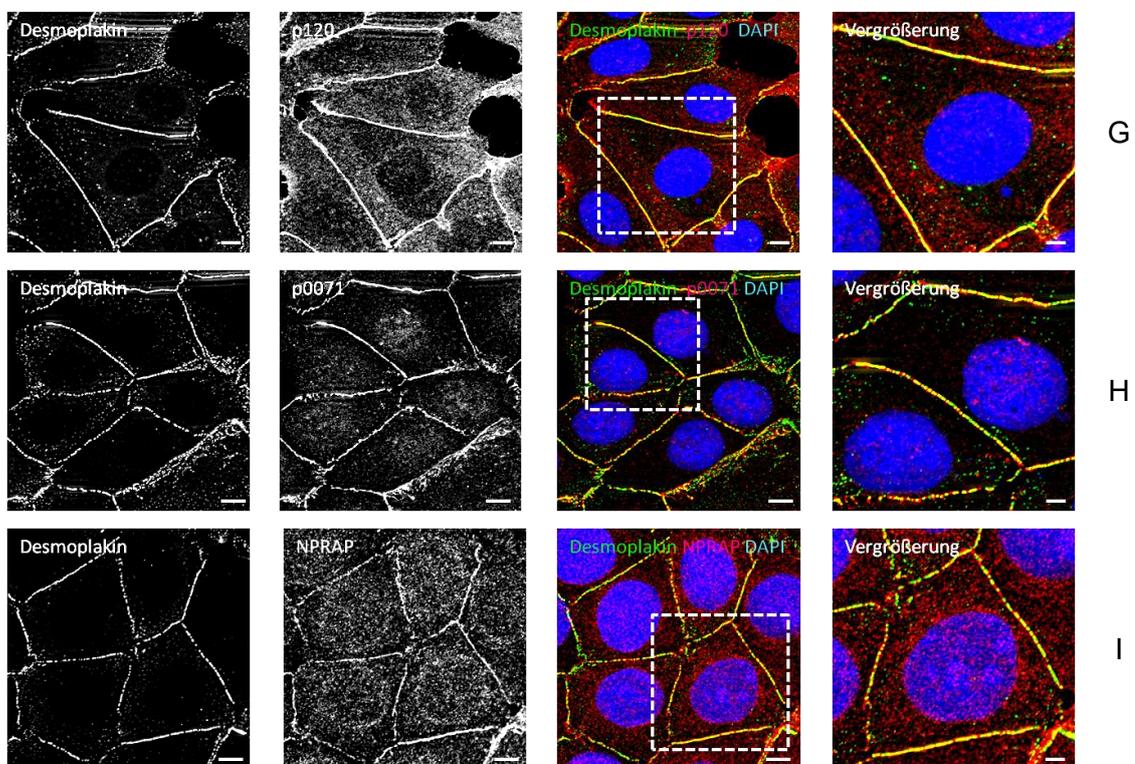


Abbildung 9: Co-Lokalisation von Desmoplakin und p120 (G), p0071 (H) und NPRAP (I) in nativen MCF-7-Zellen

MCF-7-Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen in MeOH bei -20 °C fixiert. Als Primärantikörper wurden Anti-Desmoplakin-Kaninchen, Anti-p120-Maus, Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen und Anti-NPRAP-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (Desmoplakin) oder rot (p120, p0071, NPRAP) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die untersuchten p120-Catenine mit E-Cadherin und Desmoplakin teilweise co-lokalisieren. Daher kann geschlossen werden, dass p120-Catenine Bestandteil von *Adherens junctions* und möglicherweise auch von Desmosomen sind. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die p120-Catenine teilweise auch miteinander co-lokalisieren. Dies lässt

vermuten, dass die p120-Catenine untereinander ebenfalls Proteinkomplexe bilden könnten.

4.1.2 P120-Catenine bilden Proteinkomplexe mit E-Cadherin

Aus den Ergebnissen der Immunfluoreszenz kann nicht geschlussfolgert werden, ob co-lokalisierende Proteine auch gemeinsam in einem Proteinkomplex vorhanden sind. Um dies zu untersuchen, erfolgte die Durchführung einer Immunpräzipitation. Hierfür wurden entweder Anti-p0071-Antikörper, Anti-p120-Antikörper oder Anti-E-Cadherin-Antikörper an Protein-Agarose gebunden. Diese Antikörper banden dann ihr entsprechendes Protein aus einem Zelllysate (Gesamtextrakt). Das zu detektierende Protein und die Proteine, die zusätzlich in diesem Proteinkomplex vorhanden sind, wurden damit über den Antikörper an die Protein-Agarose gebunden. Um unspezifische Antikörperbindungen zu erkennen, wurde ein unspezifischer, nicht gegen ein bestimmtes Epitop gerichteter IgG-Antikörper (Kontrolle [Ü_K und IP_K]) ebenfalls an die Protein-Agarose gebunden und mit dem Immunpräzipitationsansatz mitgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Western Blot sichtbar gemacht. Bei diesen Experimenten ist zu beachten, dass die Proteine vor der Präzipitation in einem Zelllysate vorliegen. Es ist also theoretisch möglich, dass sich im Zelllysate Proteinkomplexe bilden, die *in vivo* nicht vorhanden sind. Umgekehrt ist es ebenfalls möglich, dass *in vivo* vorhandene Proteinkomplexe mittels Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden, wenn das Epitop des für die Immunpräzipitation genutzten Antikörpers im Proteinkomplex nicht zugänglich ist oder der nachzuweisende Proteinkomplex bei der Lyse der Zellen dissoziiert.

Mit diesem Versuch sollte herausgefunden werden, welche p120-Catenine untereinander und gemeinsam mit E-Cadherin in einem Proteinkomplex vorhanden sind. Mit der Immunpräzipitation von E-Cadherin sollte untersucht werden, welche p120-Catenine gemeinsam mit E-Cadherin präzipitierbar sind und damit gemeinsam mit E-Cadherin einen Proteinkomplex bilden. In der E-Cadherin-Immunpräzipitation ist es möglich, p0071, p120, NPRAP und β -Catenin zu präzipitieren und im Western Blot nachzuweisen (Abb. 10). Das bedeutet, dass E-Cadherin mit p120, p0071, NPRAP und β -Catenin Proteinkomplexe bildet. Ob diese Proteine alle gemeinsam oder jeweils einzeln mit E-Cadherin in einem Komplex vorhanden sind, lässt sich aus diesem Experiment nicht ableiten.

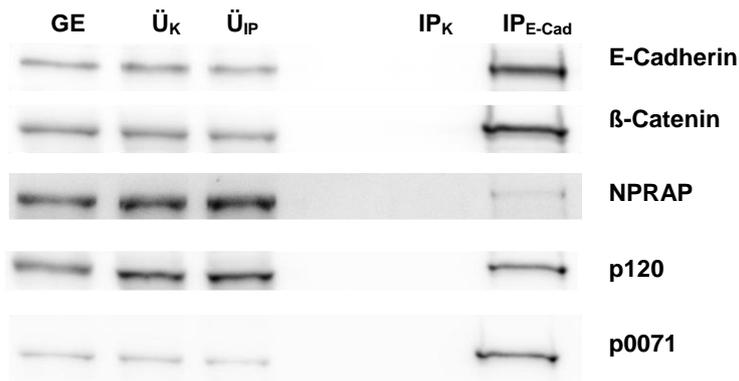


Abbildung 10: Nachweis der gemeinsamen Präzipitation von E-Cadherin, β -Catenin, NPRAP, p120 und p0071
 Nach der Proteinisolation erfolgte die Immunpräzipitation mittels Anti-E-Cadherin-Rabbit-Antikörper. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot sichtbar gemacht. Hierfür wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-E-Cadherin-Maus, Anti- β -Catenin-Maus, Anti-NPRAP-Maus, Anti-p120-Maus, Anti-p0071-Maus (Epitop 406). Als Sekundärantikörper wurde HRP-konjugierter Anti-Maus-Antikörper verwendet. Gezeigt wird der Nachweis der Proteine im Gesamtextrakt (GE), im Überstand der Kontrolle (\ddot{U}_K), im Überstand der IP (\ddot{U}_{IP}) und in der IP (IP). Ein Nachweis der Proteine in der Kontrolle der IP (IP_K) ist nicht möglich. Unspezifische Antikörperbindungen können damit ausgeschlossen werden. Die Kontrollen (\ddot{U}_K und IP_K) wurden mit dem Immunpräzipitationsansatz mitgeführt. Als Antikörper wurde ein unspezifischer, nicht gegen ein bestimmtes Epitop gerichteter IgG-Antikörper verwendet. Gezeigt sind WBs eines repräsentativen Experiments. Insgesamt wurden die IPs dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob verschiedene Proteinkomplexe mit E-Cadherin und den einzelnen p120-Cateninen existieren, wurden auch Immunpräzipitationen mit p0071 und p120 durchgeführt. Mit der Immunpräzipitation von p0071 war es möglich, E-Cadherin, β -Catenin und NPRAP zu präzipitieren. Die Präzipitation von p120 war nicht möglich (Abb. 11). Dies bedeutet, dass p0071 mit E-Cadherin, β -Catenin und NPRAP in Proteinkomplexen vorliegt, nicht aber mit p120.

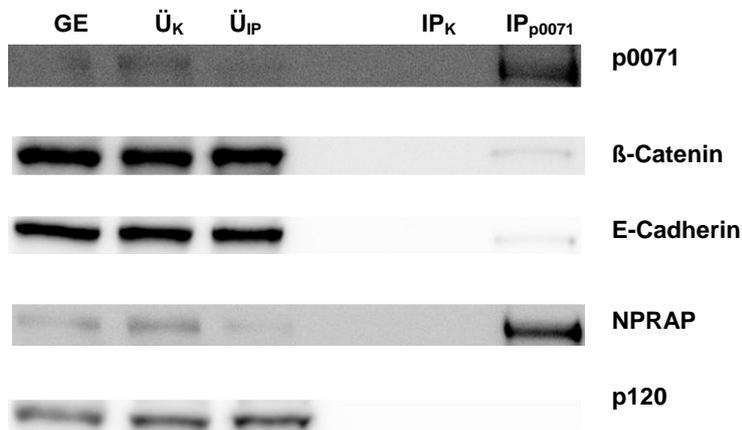


Abbildung 11: Nachweis der gemeinsamen Präzipitation von p0071, β -Catenin, E-Cadherin und NPRAP
 Nach der Proteinisolation erfolgte die Immunpräzipitation mittels Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen-Antikörper. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot sichtbar gemacht. Hierfür wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen, Anti- β -Catenin-Maus, Anti-E-Cadherin-Maus, Anti-NPRAP-Maus, Anti-p120-Maus. Als Sekundärantikörper wurden HRP-konjugierter Anti-Maus-Antikörper und HRP-konjugierter Anti-Meerschweinchen-Antikörper verwendet. Gezeigt wird der Nachweis der Proteine im Gesamtextrakt (GE), im Überstand der Kontrolle (\ddot{U}_K), im Überstand der IP (\ddot{U}_{IP}) und in der IP (IP). Ein Nachweis der Proteine in der Kontrolle der IP (IP_K) ist nicht möglich. Unspezifische Antikörperbindungen können damit ausgeschlossen werden. Die Kontrollen (\ddot{U}_K und IP_K) wurden mit dem Immunpräzipitationsansatz mitgeführt. Als Antikörper wurde ein unspezifischer, nicht gegen ein bestimmtes Epitop gerichteter IgG-Antikörper verwendet. Gezeigt sind WBs eines repräsentativen Experiments. Insgesamt wurden die IPs dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Umgekehrt war es durch die Immunpräzipitation von p120 möglich, E-Cadherin und β -Catenin zu präzipitieren. NPRAP und p0071 waren nicht im Präzipitat nachweisbar (Abb. 12). Dies bedeutet, dass p120 mit E-Cadherin und β -Catenin in Proteinkomplexen vorliegt, nicht aber mit p0071 und NPRAP.

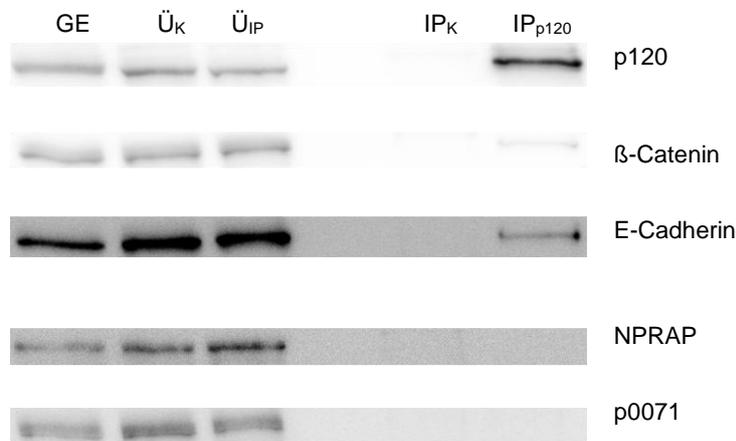


Abbildung 12: Nachweis der gemeinsamen Präzipitation von p120, β -Catenin und E-Cadherin

Nach der Proteinisolation erfolgte die Immunpräzipitation mittels Anti-p120-Maus-Antikörper. Im Anschluss wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot sichtbar gemacht. Hierfür wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen, Anti- β -Catenin-Maus, Anti-E-Cadherin-Maus, Anti-NPRAP-Maus, Anti-p120-Maus. Als Sekundärantikörper wurden HRP-konjugierter Anti-Maus-Antikörper und HRP-konjugierter Anti-Meerschweinchen-Antikörper verwendet. Gezeigt wird der Nachweis der Proteine im Gesamtextrakt (GE), im Überstand der Kontrolle (Ü_k), im Überstand der IP (Ü_{IP}) und in der IP (IP). Ein Nachweis der Proteine in der Kontrolle der IP (IP_k) ist nicht möglich. Unspezifische Antikörperbindungen können damit ausgeschlossen werden. Die Kontrollen (Ü_k und IP_k) wurden mit dem Immunpräzipitationsansatz mitgeführt. Als Antikörper wurde ein unspezifischer, nicht gegen ein bestimmtes Epitop gerichteter IgG-Antikörper verwendet. Gezeigt sind WBs eines repräsentativen Experiments. Insgesamt wurden die IPs dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Es wurde ebenfalls versucht, eine Immunpräzipitation mit NPRAP durchzuführen. Dieses Experiment ist auch nach mehreren Versuchen nicht gelungen.

Es konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin mit allen p120-Cateninen interagieren kann. Es ist anzunehmen, dass E-Cadherin mit den p120-Cateninen jeweils unterschiedliche Proteinkomplexe bildet. Die Ergebnisse legen nahe, dass neben dem einen Proteinkomplex – bestehend aus E-Cadherin, p120 und β -Catenin – ein zweiter Proteinkomplex – bestehend aus E-Cadherin, p0071, NPRAP und β -Catenin – existiert (Abb. 13). Aufgrund der Präzipitierbarkeit von NPRAP in der p0071-Immunpräzipitation ist zu fragen, ob NPRAP und p0071 einen eigenen Proteinkomplex bilden (auch im Zytoplasma möglich).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Ergebnisse der bisherigen Experimente gegenseitig unterstützen. In der Immunfluoreszenz konnten deutliche Co-Lokalisationen zwischen E-Cadherin und den p120-Cateninen nachgewiesen werden. Durch die gleichzeitige Präzipitierbarkeit der p120-Catenine in der Immunpräzipitation von E-Cadherin ist anzunehmen, dass E-Cadherin mit p0071, p120 und NPRAP jeweils unterschiedliche Proteinkomplexe bildet. Diese verschiedenen

Proteinkomplexe lokalisieren – vermutlich – räumlich nicht getrennt voneinander an der Zellmembran. NPRAP und p0071 scheinen in einer besonderen Beziehung zueinander zu stehen. Diese beiden Proteine zeigen sowohl in der Immunfluoreszenz eine ausgeprägte Co-Lokalisation als auch eine gemeinsame Präzipitierbarkeit in der Immunpräzipitation von p0071, was auf eine Proteinkomplexbildung zwischen diesen beiden Proteinen hindeutet. Um diese Fragestellung weiter zu untersuchen, ist es notwendig, die Immunpräzipitation von NPRAP zu optimieren, um herauszufinden, ob p0071 dabei ebenfalls präzipitierbar ist.

In der Immunpräzipitation von p120 konnte weder p0071 noch NPRAP präzipitiert werden, was vermuten lässt, dass p120 vorwiegend mit E-Cadherin und β -Catenin in einem Proteinkomplex vorhanden ist.

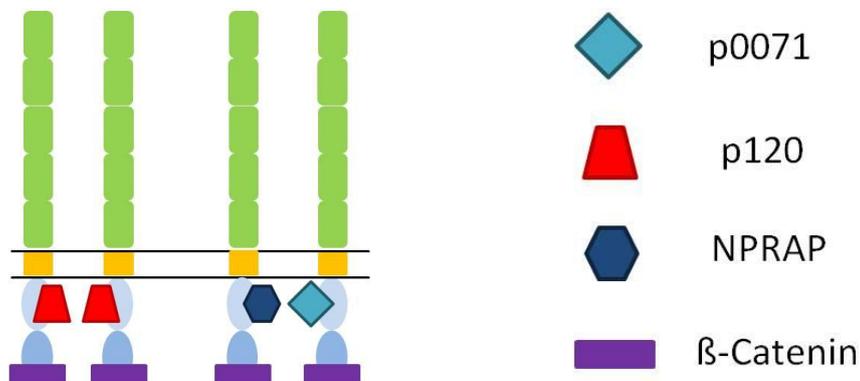


Abbildung 13: E-Cadherin bildet verschiedene Proteinkomplexe mit den p120-Cateninen

Schematische Darstellung der möglichen Cadherin-Catenin-Komplexe. Die Zellmembran ist als schwarze Linien, die extrazellulären Anteile von E-Cadherin sind in grüner, der transmembranäre Anteil ist in oranger und der intrazelluläre Anteil in blauer Farbe dargestellt. β -Catenin (lila) bindet intrazellulär an die Catenin-bindende Domäne von E-Cadherin. Im Bereich der juxtamembranären Domäne binden die unterschiedlichen p120-Catenine (siehe Legende).

Dargestellt sind ein Proteinkomplex, bestehend aus E-Cadherin, β -Catenin und p120, und ein zweiter Proteinkomplex, bestehend aus E-Cadherin, β -Catenin, p0071 und NPRAP.

4.2 P120-Catenine beeinflussen sich sowohl gegenseitig als auch E-Cadherin

4.2.1 Der Verlust von p120-Cateninen beeinflusst die *Adherens junctions*

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die p120-Catenine mit E-Cadherin unterschiedliche Proteinkomplexe bilden und Bestandteile von *Adherens junctions* sind. Weiterhin zeigte sich, dass p0071 und NPRAP in einer besonderen Beziehung zueinander stehen und möglicherweise einen eigenen Proteinkomplex bilden. Um den Einfluss der p120-Catenine untereinander und auf E-Cadherin und Desmoplakin weiter zu untersuchen, erfolgten Experimente mittels Immunfluoreszenz und vorausgegangener Transfektion von si-RNA, was zu einem *knockdown* des entsprechenden Proteins führte. Si-RNA (*small interfering RNA*) sind

kurze RNA-Moleküle, die nicht für ein Protein codieren. Wird si-RNA in eine Zelle eingebracht, bindet sie an die komplementäre mRNA innerhalb der Zelle. Durch den Enzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) kommt es zur Spaltung der mRNA. Die Translation der mRNA und die Proteinsynthese sind damit nicht mehr möglich. Durch die Hemmung eines spezifischen Proteins können Informationen über deren Funktion und die Einflussnahme auf andere Proteine gewonnen werden. Die Transfektion erfolgte 24 Stunden nach dem Einsäen der Zellen. Mit der Immunfluoreszenz wurde 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion begonnen. Um Beeinflussungen allein durch den Transfektionsvorgang sichtbar zu machen, wurden zusätzlich Zellen mit unspezifischer Kontroll-si-RNA transfiziert. Für die weiteren Transfektionen wurden p0071-si-RNA, p120-si-RNA und NPRAP-si-RNA verwendet. Im weiteren Verlauf erfolgten die Bindung der Primärantikörper an ihr spezifisches Protein und die Bindung der fluoreszenzmarkierten (grün und rot) Sekundärantikörper. Die Untersuchungen mittels *knockdown* durch si-RNA dienten der Überprüfung der Einflussnahme einer verminderten Expression eines p120-Catenins auf E-Cadherin, Desmoplakin und die jeweils anderen p120-Catenine.

Durch die Verringerung der p0071-Expression (grün) kam es zu einer Verringerung der E-Cadherin-Expression (rot) an Zellkontakten. Nach p0071-*knockdown* kam es zu einer Anreicherung von E-Cadherin im Zytoplasma (Abb. 14). Einen sehr deutlichen Effekt hatte die verminderte p0071-Expression (grün) auf NPRAP (rot). An den Stellen, an denen p0071 an Zellkontakten fehlte, fehlte auch NPRAP fast vollständig. Eine Anreicherung von NPRAP im Zytoplasma konnte nicht erkannt werden (Abb. 15). Einen geringeren Einfluss hatte die verminderte Expression von p0071 (grün) auf p120 (rot). Dieses Protein blieb nach p0071-*knockdown* fast unverändert an Zellkontakten bestehen. Eine Anreicherung von p120 im Zytoplasma war nur in geringem Maße sichtbar (Abb. 16).

Einen eher geringen Einfluss hatte die verminderte Expression von p0071 (grün) auf Desmoplakin (rot). Während Desmoplakin an Zellkontakten weitgehend stabil vorhanden war, kam es auch hier zu einer geringen Anreicherung von Desmoplakin im Zytoplasma (Abb. 17).

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass die verminderte Expression von p0071 die Lokalisation und Expression von E-Cadherin in *Adherens junctions* deutlich beeinflusst. P0071 scheint einen stabilisierenden Einfluss auf E-Cadherin an Zellkontakten zu haben. Nach Verlust von p0071 reichert sich E-Cadherin im Zytoplasma an. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust von p0071 zwar zu einer Internalisierung von E-Cadherin führt, aber nicht zu dessen Abbau. Weiterhin scheint p0071 ebenfalls einen stabilisierenden Einfluss auf NPRAP zu haben. Nach Verlust von p0071 ist eine

deutliche Reduktion, sowohl an Zellkontakten als auch im Zytoplasma sichtbar. Das heißt, dass ein Verlust von p0071 ebenfalls zu einem Verlust von NPRAP führt, möglicherweise durch Abbau von NPRAP. Einen deutlich geringeren Einfluss hatte der Verlust von p0071 auf p120 und Desmoplakin. In beiden Fällen kam es zu einer geringen Anreicherung der Proteine im Zytoplasma, und zwar bei weiterhin bestehendem Vorhandensein an Zellkontakten. Dies deutet darauf hin, dass p0071 keinen stabilisierenden Einfluss auf p120 und Desmosomen ausübt.

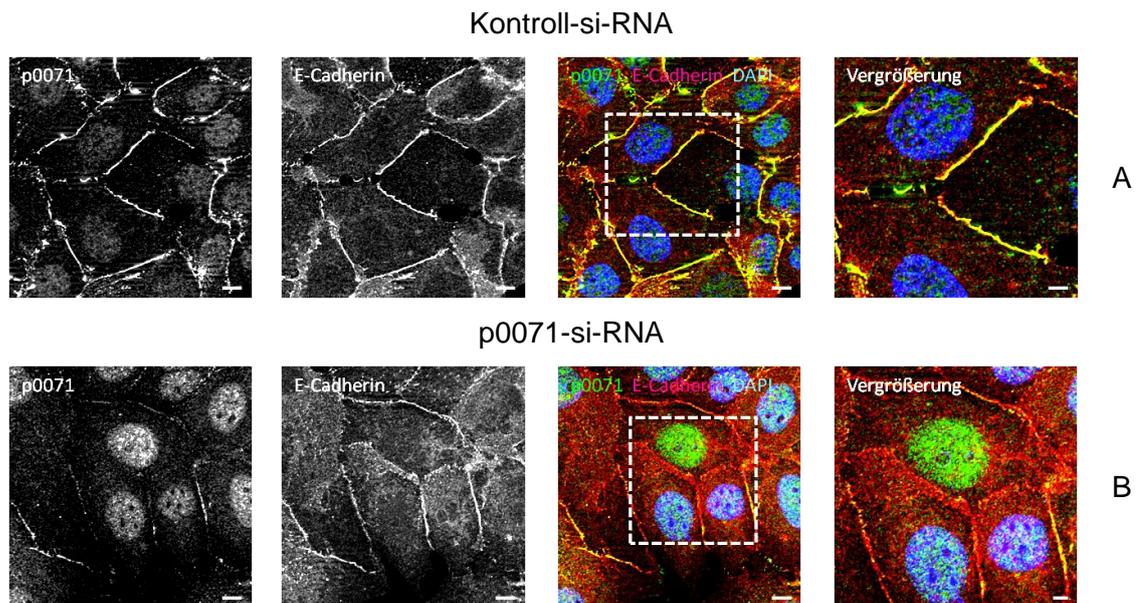
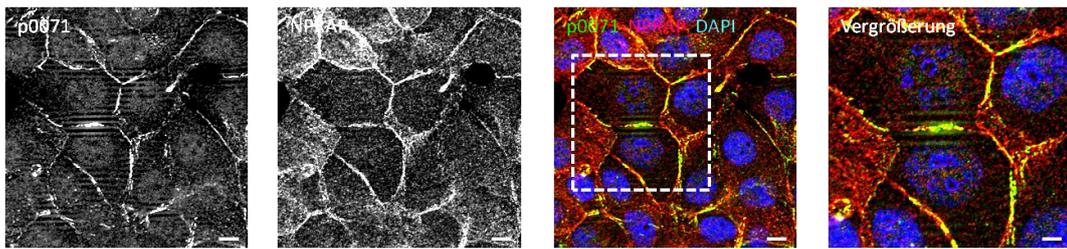


Abbildung 14: Reaktion von E-Cadherin auf eine verminderte Expression von p0071

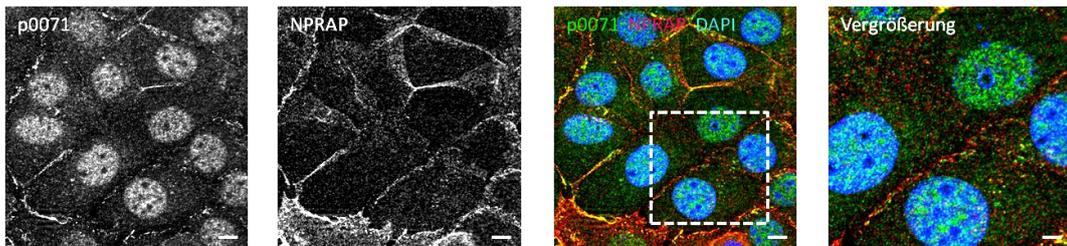
24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (A) oder der p0071-si-RNA (B) mittels Lipofection. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen und Anti-E-Cadherin-Kaninchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (E-Cadherin) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 μm , in der Vergrößerung 10 μm . Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

Kontroll-si-RNA



C

p0071-si-RNA

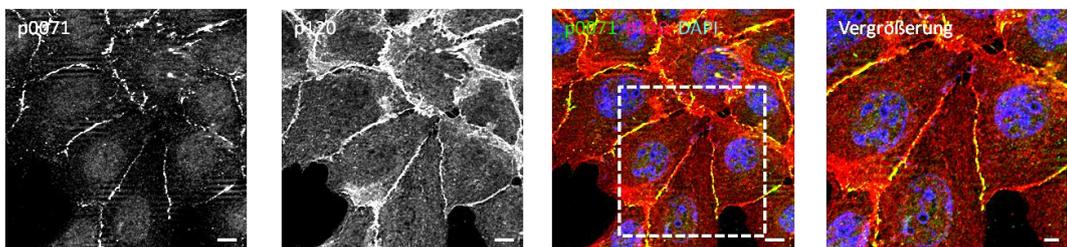


D

Abbildung 15: Reaktion von NPRAP auf eine verminderte Expression von p0071

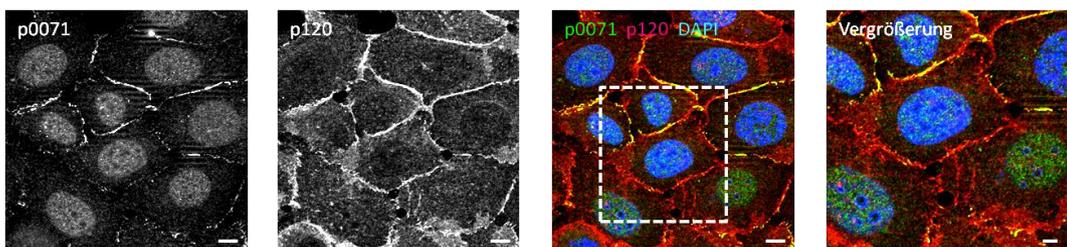
24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (C) oder der p0071-si-RNA (D) mittels Lipofection. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen und Anti-NPRAP-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (NPRAP) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

Kontroll-si-RNA



E

p0071-si-RNA



F

Abbildung 16: Reaktion von p120 auf eine verminderte Expression von p0071

24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (E) oder der p0071-si-RNA (F) mittels Lipofection. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen und Anti-p120-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (p120) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

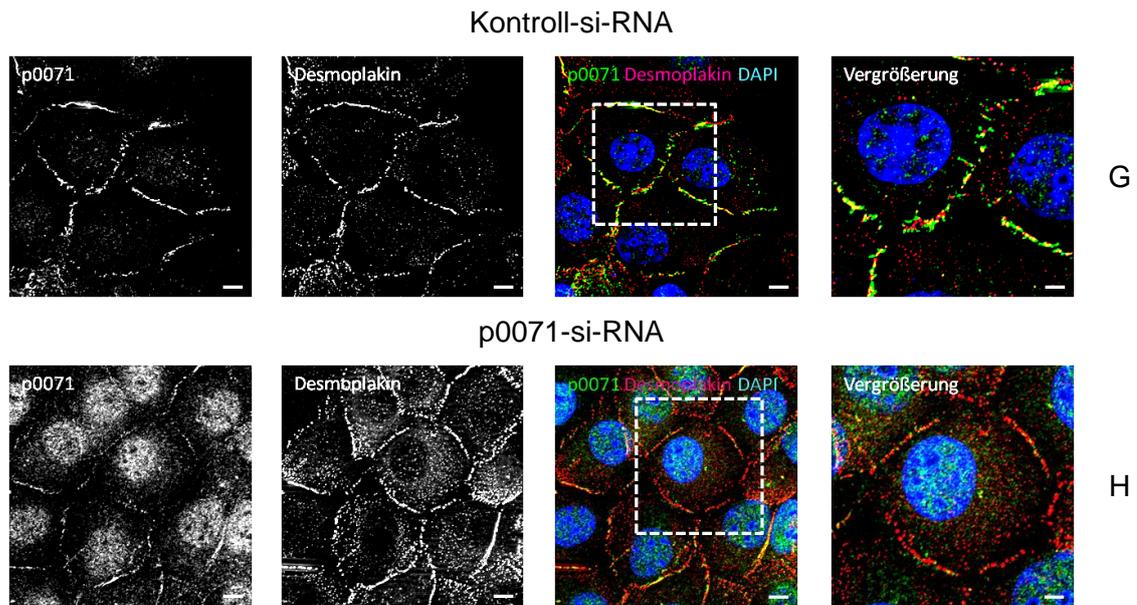


Abbildung 17: Reaktion von Desmoplakin auf eine verminderte Expression von p0071

24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (G) oder der p0071-si-RNA (H) mittels Lipofection. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen und Anti-Desmoplakin-Kaninchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (Desmoplakin) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 μm , in der Vergrößerung 10 μm . Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss einer verminderten Expression von p120 untersucht. Nach Verminderung der p120-Expression (rot) kam es zu einer deutlichen Reduktion von E-Cadherin (grün) an Zellkontakten. Diese Kontakte waren nur noch geringfügig ausgebildet. Eine Anreicherung von E-Cadherin im Zytoplasma konnte nicht beobachtet werden (Abb. 18). Keinen Einfluss hatte die verminderte p120-Expression (rot) auf NPRAP und p0071 (jeweils grün). Diese Proteine waren an Zellkontakten nahezu unverändert erhalten (Abb. 19 und 20). Ebenfalls einen geringen Einfluss hatte der p120-*knockdown* (rot) auf Desmoplakin (grün). Desmoplakin blieb an Zellkontakten weiterhin vorhanden, aber es kam zu einer geringen Anreicherung im Zytoplasma (Abb. 21).

Diese Experimente verdeutlichen den ausgeprägten stabilisierenden Einfluss von p120 auf E-Cadherin in *Adherens junctions*. Nach Verlust von p120 kam es zu einem fast vollständigen Verlust von E-Cadherin. E-Cadherin reichte sich im Zytoplasma nicht an, was darauf hindeutet, dass es vermehrt abgebaut und nicht nur internalisiert wird. Auf p0071 und NPRAP übte der Verlust von p120 keinen Einfluss aus. Interessant ist allerdings, dass nach Verlust von p120, und damit auch Verlust von E-Cadherin, p0071 weiterhin an Zellkontakten bestehen blieb. Dies deutet darauf hin, dass p0071 an ein anderes Cadherin (z. B. P-Cadherin) gebunden vorliegen könnte, was die Frage nach unterschiedlichen Affinitäten von p0071 an Cadherine aufwirft. Nach *knockdown* von p120 kam es zu einer geringen Anreicherung von Desmoplakin im Zytoplasma, ein

deutlicher Einfluss auf die Desmosomenstabilität konnte jedoch nicht beobachtet werden. P120 scheint keinen stabilisierenden Effekt auf Desmosomen zu haben.

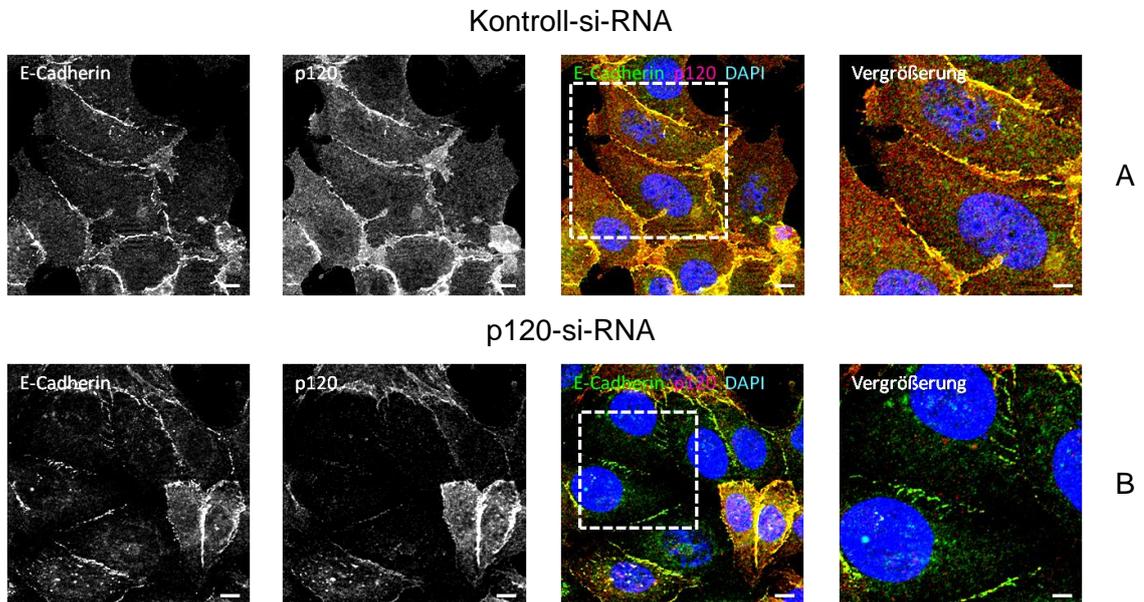


Abbildung 18: Reaktion von E-Cadherin auf eine verminderte Expression von p120

24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (A) oder der p120-si-RNA (B) mittels Lipofektion. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p120-Maus und Anti-E-Cadherin-Kaninchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (E-Cadherin) oder rot (p120) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

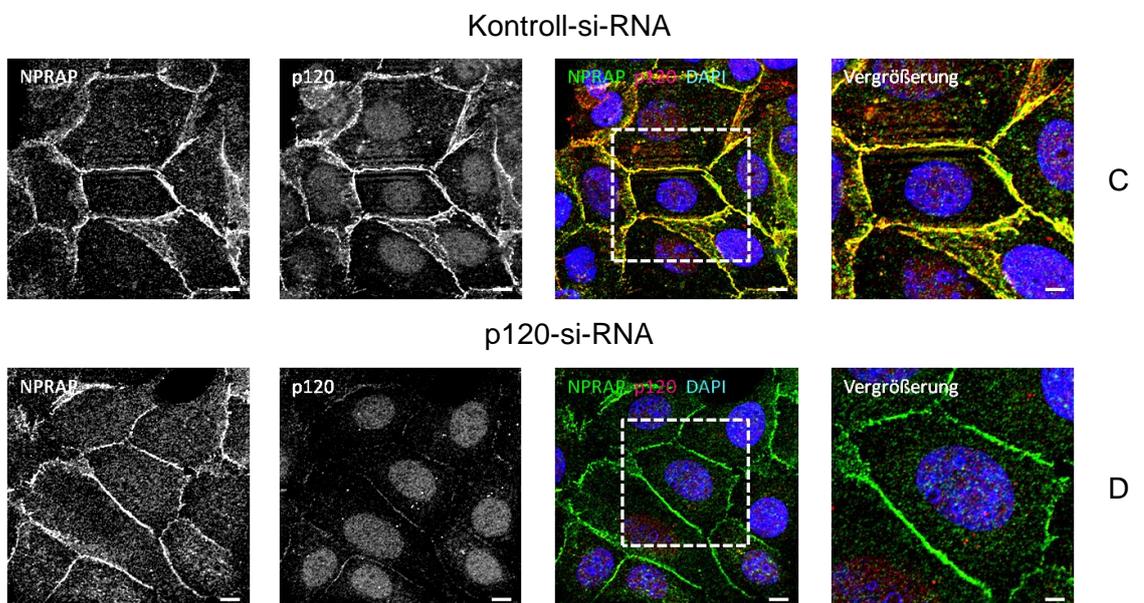
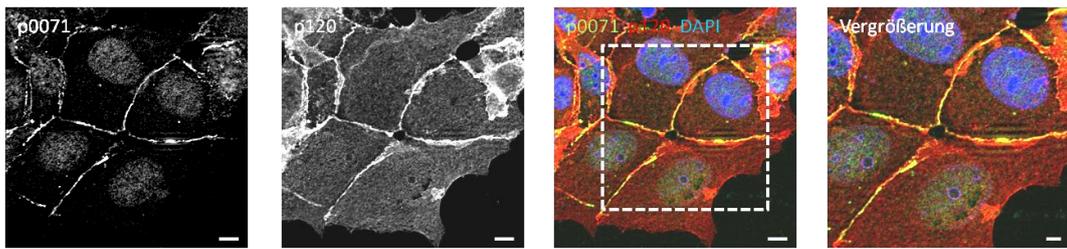


Abbildung 19: Reaktion von NPRAP auf eine verminderte Expression von p120

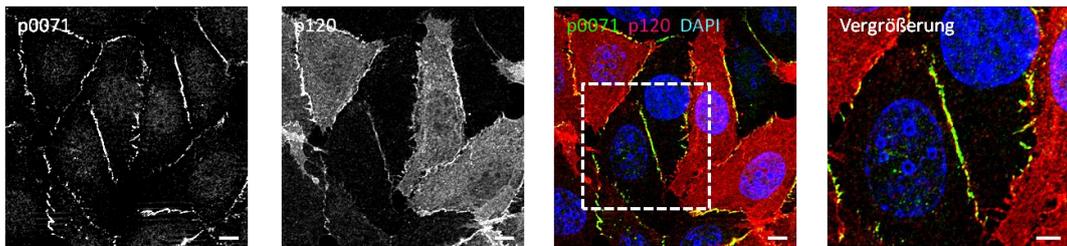
24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (C) oder der p120-si-RNA (D) mittels Lipofektion. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p120-Kaninchen und Anti-NPRAP-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (NPRAP) oder rot (p120) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

Kontroll-si-RNA



E

p120-si-RNA

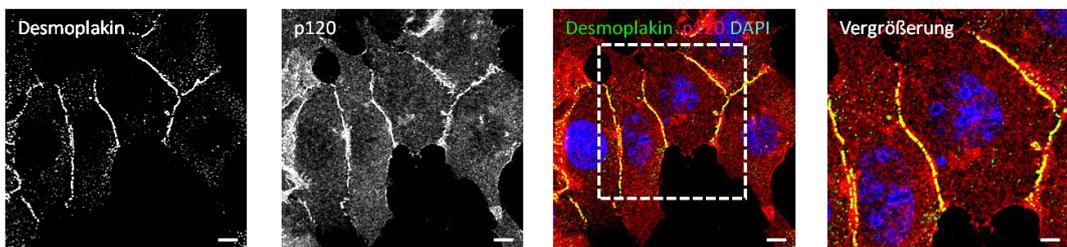


F

Abbildung 20: Reaktion von p0071 auf eine verminderte Expression von p120

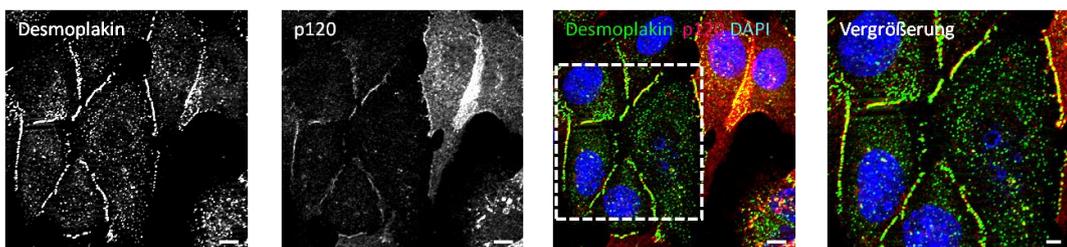
24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (E) oder der p120-si-RNA (F) mittels Lipofection. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p120-Maus und Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (p120) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

Kontroll-si-RNA



G

p120-si-RNA



H

Abbildung 21: Reaktion von Desmoplakin auf eine verminderte Expression von p120

24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (G) oder der p120-si-RNA (H) mittels Lipofection. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-p120-Maus und Anti-Desmoplakin-Kaninchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (Desmoplakin) oder rot (p120) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

Weiterhin wurde der Einfluss der Verringerung der NPRAP-Expression betrachtet. Bei verminderter NPRAP-Expression (rot) blieb E-Cadherin (grün) weitestgehend an Zellkontakten erhalten. Gleichzeitig kam es zu einer Verlagerung von E-Cadherin ins

Zytoplasma (Abb. 22). Den stärksten Einfluss hatte die verminderte NPRAP-Expression (rot) auf p0071 (grün). P0071 war nur noch in wenigen Bereichen der Zellkontakte sichtbar. Durchgängige Lokalisationen von p0071 an Zellkontakten waren nicht mehr nachweisbar (Abb. 23). Weniger Einfluss hatte der NPRAP-*knockdown* (rot) auf p120 und Desmoplakin (jeweils grün). P120 blieb an Zellkontakten stabil vorhanden. Es kam zur geringfügigen Verlagerung ins Zytoplasma (Abb. 24). Desmoplakin blieb an Zellkontakten ebenfalls stabil vorhanden (Abb. 25). Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass auch NPRAP, ähnlich wie p0071, einen stabilisierenden Effekt auf E-Cadherin in *Adherens junctions* auszuüben scheint. Nach Verlust von NPRAP kam es zur Verlagerung von E-Cadherin ins Zytoplasma. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer Internalisierung und nicht zum vermehrten Abbau von E-Cadherin kommt. Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Effekt auf p0071. Nach Verlust von NPRAP kam es ebenfalls zu einem fast vollständigen Verlust von p0071. Dies deutet auf einen vermehrten Abbau von p0071 hin. Der Einfluss einer Verminderung von NPRAP auf p120 und Desmoplakin ist sehr gering. NPRAP hat demzufolge keinen stabilisierenden Einfluss auf p120 und Desmosomen.

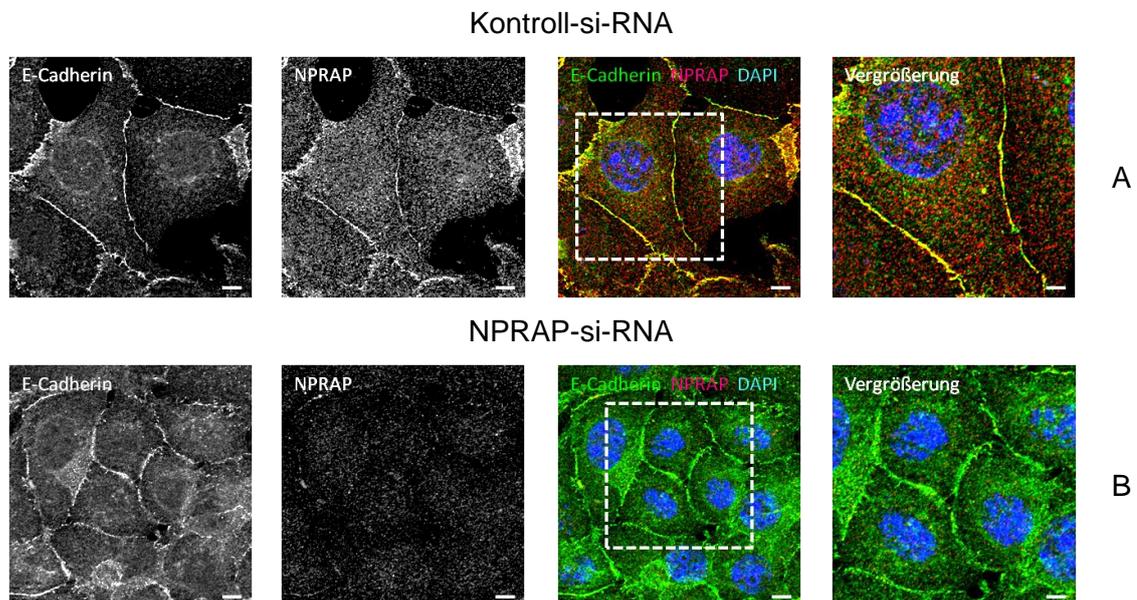
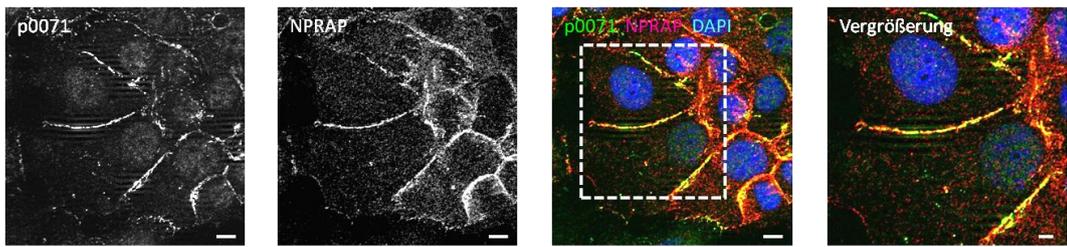


Abbildung 22: Reaktion von E-Cadherin auf eine verminderte Expression von NPRAP

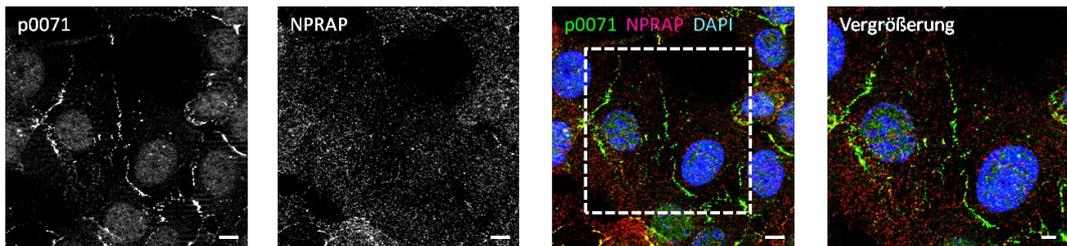
24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (A) oder der NPRAP-si-RNA (B) mittels Lipofection. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-NPRAP-Maus und Anti-E-Cadherin-Kaninchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (E-Cadherin) oder rot (NPRAP) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 μm , in der Vergrößerung 10 μm . Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

Kontroll-si-RNA



C

NPRAP-si-RNA

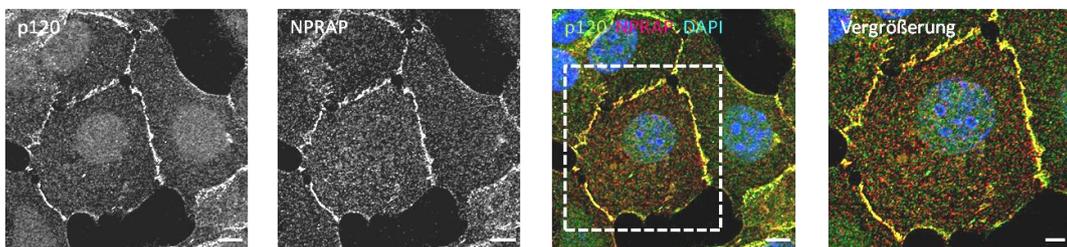


D

Abbildung 23: Reaktion von p0071 auf eine verminderte Expression von NPRAP

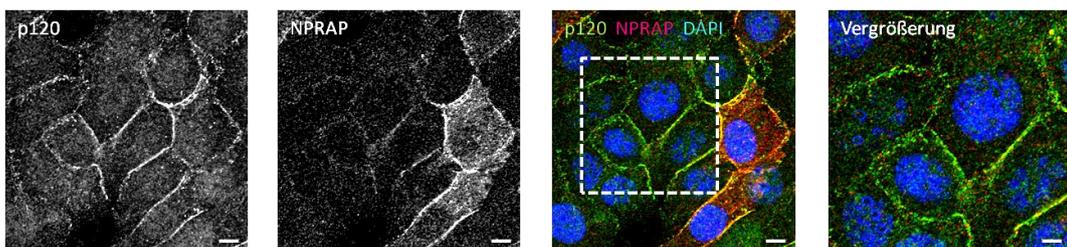
24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (C) oder der NPRAP-si-RNA (D) mittels Lipofektion. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-NPRAP-Maus und Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (NPRAP) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot - zu sehen.

Kontroll-si-RNA



E

NPRAP-si-RNA



F

Abbildung 24: Reaktion von p120 auf eine verminderte Expression von NPRAP

24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (E) oder der NPRAP-si-RNA (F) mittels Lipofektion. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-NPRAP-Maus und Anti-p120-Kaninchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p120) oder rot (NPRAP) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm. Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

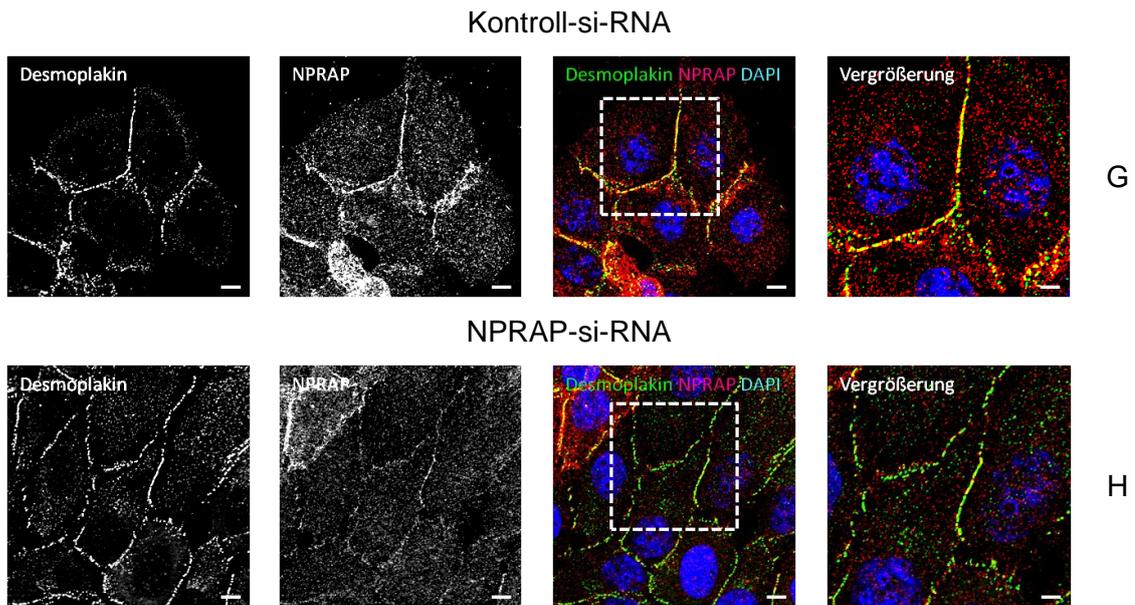


Abbildung 25: Reaktion von Desmoplakin auf eine verminderte Expression von NPRAP

24 Stunden nach Einsaat der Zellen erfolgte die Transfektion der Kontroll-si-RNA (G) oder der NPRAP-si-RNA (H) mittels Lipofektion. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenz. Als Primärantikörper wurden Anti-NPRAP-Maus und Anti-Desmoplakin-Kaninchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (Desmoplakin) oder rot (NPRAP) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 μm , in der Vergrößerung 10 μm . Die Effizienz der Transfektion ist in Abb. 26 – Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot – zu sehen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Verminderung aller p120-Catenine zu einer Verminderung von E-Cadherin an Zellkontakten führt. Damit üben alle p120-Catenine einen stabilisierenden Effekt auf E-Cadherin an Zellkontakten und damit auch auf *Adherens junctions* aus. Der Effekt des Verlustes von p120 auf E-Cadherin ist besonders deutlich. Da es nicht zu einer Anreicherung von E-Cadherin im Zytoplasma kommt, lässt dies auf einen vermehrten Abbau von E-Cadherin schließen. Der Verlust von p0071 und NPRAP auf die Expression von E-Cadherin verhält sich ähnlich. Die Reduktion von E-Cadherin an Zellkontakten ist geringer ausgeprägt als bei p120. Es kommt zu einer Anreicherung von E-Cadherin im Zytoplasma. Dies lässt darauf schließen, dass auch p0071 und NPRAP E-Cadherin an der Zellmembran stabilisieren, aber nach Verlust eher zu einer Internalisierung und nicht zum Abbau führen.

Weiterhin zeigte sich, dass p0071 und NPRAP möglicherweise stabilisierend aufeinander wirken. Nach *knockdown* von p0071 oder NPRAP kam es zum Verlust des jeweils anderen Proteins, ohne vermehrte Anreicherung im Zytoplasma. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust des einen Proteins zu einem vermehrten Abbau des anderen Proteins führt.

Somit lässt sich festhalten, dass alle p120-Catenine stabilisierend auf E-Cadherin und damit auf *Adherens junctions* wirken, aber trotzdem unterschiedliche Funktionen

ausüben. Es zeigte sich, dass der Verlust eines p120-Catenins durch die anderen p120-Catenine nicht vollständig ersetzt werden kann.

4.2.2 Der Verlust von p120-Cateninen beeinflusst die Proteinmengen der jeweils anderen Catenine

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass alle p120-Catenine einen stabilisierenden Effekt auf E-Cadherin haben. Weiterhin zeigte sich, dass p0071 und NPRAP möglicherweise stabilisierend aufeinander wirken und dass der Verlust des einen Proteins zu einem fast vollständigen Verlust des anderen Proteins führt.

Mit dem folgenden Experiment sollte die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss der Verlust der p120-Catenine auf die Proteinmengen der jeweils anderen p120-Catenine und von E-Cadherin oder β -Catenin ausübt. Dafür wurden Zellen mit einer Zelldichte von $0,25 \times 10^5$ Zellen/cm² in Well-Platten eingesät und nach 24 Stunden mittels Lipofektamin[®] 2000 und si-RNA transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgten die Proteinisolation, die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und die Sichtbarmachung im Western Blot. Die absoluten Proteinmengen wurden mittels mitgeführtem Tubulinabgleich korrigiert, um sicherzustellen, dass eine erhöhte oder verminderte Proteinmenge nicht durch eine vermehrte oder verminderte Probenauftragung bedingt ist. Die gezeigten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Abb. 26 zeigt die Kontrollen und damit die Wirksamkeit des *knockdown* für die p0071-, p120- und NPRAP-si-RNA.

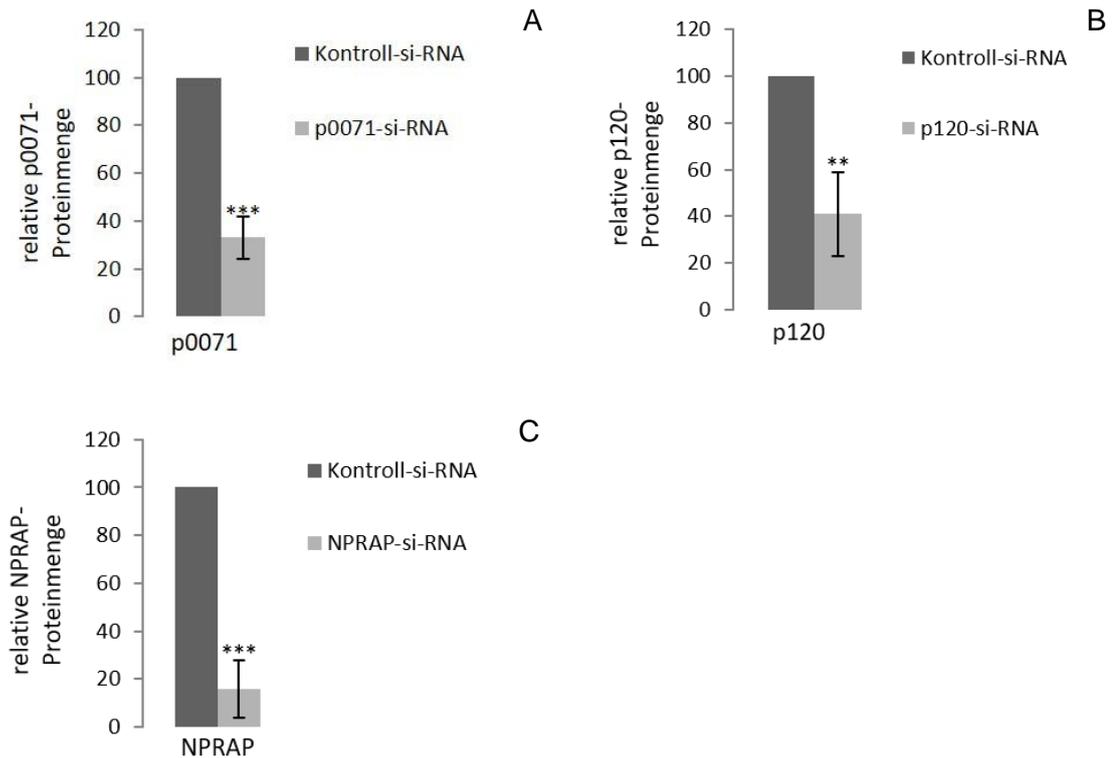


Abbildung 26: Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot

MCF-7-Zellen wurden mit Kontroll-si-RNA (A, B, C), p0071-si-RNA (A), p120-si-RNA (B) oder NPRAP-si-RNA (C) transfiziert. Die Proteinisolierung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen (A), Anti-p120-Maus (B), Anti-NPRAP-Maus (C) und Anti-Tubulin-Maus (A, B, C) verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden HRP-markierte Sekundärantikörper verwendet. Zusätzlich ist jeweils der Tubulinabgleich dargestellt. Die Western-Blot-Membranen dieser Experimente sind im Anlageteil separat dargestellt.

** entspricht $p \leq 0,005$; *** entspricht $p \leq 0,001$

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proteinlevel der p120-Catenine, von E-Cadherin und β -Catenin nach *knockdown* vorgestellt.

Nach *knockdown* von p0071 zeigte sich eine signifikante Reduktion von β -Catenin um ca. 20 %. Die Proteinmenge von p120 blieb nahezu unverändert. Eine sichere Aussage über NPRAP und E-Cadherin kann nicht getroffen werden, da die Standardabweichung jeweils zu groß ist.

Durch den *knockdown* von p120 konnte eine signifikante Reduktion von NPRAP um ca. 30 % und von E-Cadherin und β -Catenin jeweils um ca. um 35 % detektiert werden. Die Proteinmenge von p0071 blieb nahezu unverändert.

Die Reduktion von NPRAP führte zu einer signifikanten Reduktion von p0071 um ca. 20 %. Die Proteinmenge von β -Catenin blieb unverändert. Zur Proteinmenge von p120 und E-Cadherin ist keine Aussage möglich, da die Standardabweichung jeweils zu groß ist (Abb. 27).

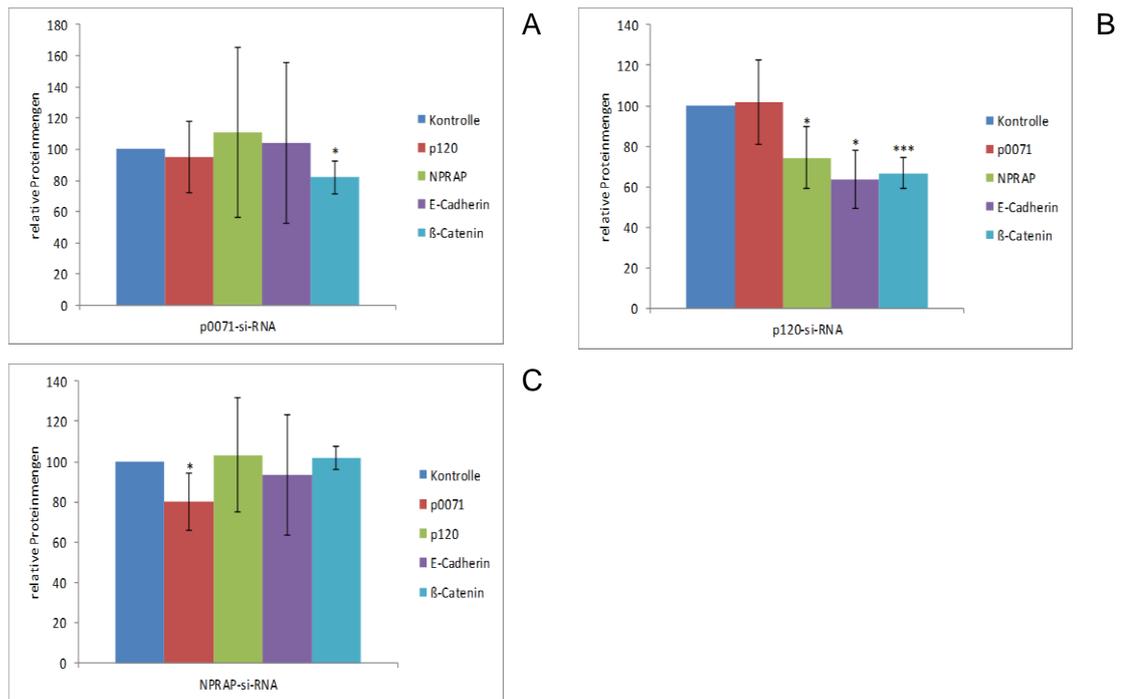


Abbildung 27: Proteinmengen nach selektivem *knockdown* von p0071, p120 und NPRAP

MCF-7-Zellen wurden mit Kontroll-si-RNA (A, B, C) p0071-si-RNA (A), p120-si-RNA (B) oder NPRAP-si-RNA (C) transfiziert. Die Proteinisolierung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen, Anti-p120-Maus, Anti-NPRAP-Maus, Anti-E-Cadherin-Maus, Anti-β-Catenin-Maus und Anti-Tubulin-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden HRP-markierte Sekundärantikörper verwendet. Als interner Standard wurde Tubulin mitgeführt. Die Gesamtproteinmenge wurde mit der jeweiligen Tubulinmenge abgeglichen. Die Gesamtproteinmenge der Kontrolle entspricht 100 %. Die Western-Blot-Membranen dieser Experimente sind im Anlageteil separat dargestellt.

* entspricht $p \leq 0,05$, ** entspricht $p \leq 0,005$, *** entspricht $p \leq 0,001$

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen die vorangegangenen Ergebnisse größtenteils unterstützen.

Mittels Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass es nach *knockdown* von p120 zu einem deutlichen Verlust von E-Cadherin, sowohl an Zellkontakten als auch im Zytoplasma, kam. Mit diesem Experiment konnte der Effekt auf Proteinebene ebenfalls nachgewiesen werden. Nach Verlust von p120 kam es zur signifikanten Reduktion der Proteinlevel von E-Cadherin und β-Catenin. Diese Ergebnisse unterstreichen zum einen den ausgeprägten stabilisierenden Effekt von p120 auf E-Cadherin und, durch die gleichzeitige Reduktion von β-Catenin, zusätzlich auf den gesamten Cadherin-Catenin-Komplex und damit insgesamt auf die *Adherens junctions*. Es ist anzunehmen, dass es nach Verlust von p120 zu einem vermehrten Abbau von E-Cadherin und β-Catenin kommt.

Nach *knockdown* von p0071 und NPRAP konnte in der Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass E-Cadherin an Zellkontakten vermindert vorhanden ist, es aber gleichzeitig zu einer Verlagerung ins Zytoplasma kommt. Dies ist Hinweis auf eine Internalisierung von E-Cadherin nach Verlust von p0071 oder NPRAP. Auf Proteinebene kann nach *knockdown* von p0071 oder NPRAP keine Aussage über den

Proteinlevel von E-Cadherin getroffen werden, da hier jeweils die Standardabweichung zu groß ist. Es lässt sich aber zeigen, dass durch den Verlust von p0071 der Proteinlevel von β -Catenin signifikant reduziert wird, im Vergleich zu p120 aber in einem geringeren Ausmaß (Reduktion um ca. 20 % bei Verlust von p0071 vs. Reduktion um ca. 35 % bei Verlust von p120). Dies lässt zum einen den stabilisierenden Effekt von p0071 auf den Cadherin-Catenin-Komplex und damit auf *Adherens junctions* vermuten und zum anderen wird hier deutlich, dass p120 wahrscheinlich den ausgeprägteren Effekt auf die E-Cadherinstabilität aufweist. Nach Verlust von NPRAP kommt es auf Proteinebene zu keiner Reduktion von β -Catenin. In Bezug auf die gegenseitige Beeinflussung der p120-Catenine untereinander lässt sich feststellen, dass es in der Immunfluoreszenz zu einer deutlichen Beeinflussung zwischen p0071 und NPRAP kam. Der Verlust des einen Proteins führte zum Verlust des anderen Proteins, sowohl an Zellkontakten als auch im Zytoplasma. Dies lässt vermuten, dass es nach Verlust des einen Proteins zu einem vermehrten Abbau des anderen Proteins kommt. Auf Proteinebene, im Western Blot, kann dieser Effekt für p0071 nach *knockdown* von NPRAP ebenfalls nachgewiesen werden (Reduktion um ca. 20 %). Umgekehrt, also in Bezug auf den NPRAP-Proteinlevel nach p0071-*knockdown*, kann dies nicht gezeigt werden, da hier die Standardabweichung zu groß ist. In der Immunfluoreszenz konnte nach *knockdown* von p0071 oder NPRAP keine Veränderung bei p120 gesehen werden, und nach Verlust von p120 keine Veränderung bei p0071 oder NPRAP. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass E-Cadherin Proteinkomplexe einerseits mit p120 und andererseits mit p0071 und NPRAP bildet. In der Proteinanalyse konnte gezeigt werden, dass es nach *knockdown* von p0071 zu keiner Veränderung des p120-Proteinlevels und umgekehrt kommt. Der p120-Proteinlevel nach *knockdown* von NPRAP ist bei zu großer Standardabweichung nicht zu beurteilen. Interessant, und den Ergebnissen der Immunfluoreszenz gegenüberstehend, ist die signifikante Reduktion des NPRAP-Proteinlevels (um ca. 30 %) nach Verlust von p120. Tab. 11 gibt eine schematische Übersicht über die Veränderungen der Proteinmengen nach *knockdown* im Western Blot.

Tabelle 11: Übersicht über die Veränderungen der Proteinmengen im Western Blot nach <i>knockdown</i> von p0071, p120 und NPRAP			
Dargestellt sind die Veränderungen der Proteinmenge nach Transfektion von p0071-, p120- und NPRAP-si-RNA. Die Verringerung des Proteinlevels der eigenen si-RNA bleibt unberücksichtigt (z. B. p0071-Proteinlevel nach p0071-si-RNA).			
↓ signifikante Verringerung des Proteinlevels; o keine signifikante Veränderung des Proteinlevels, k. A. keine sichere Aussage möglich			
	p0071-si-RNA	p120-si-RNA	NPRAP-si-RNA
p0071-Proteinlevel		o	↓
p120-Proteinlevel	o		k. A.
NPRAP-Proteinlevel	k. A.	↓	
E-Cadherin-Proteinlevel	k. A.	↓	k. A.
β -Catenin-Proteinlevel	↓	↓	o

4.3 P0071 beeinflusst die Zellproliferation/-migration

4.3.1 P0071 beeinflusst E-Cadherin und NPRAP

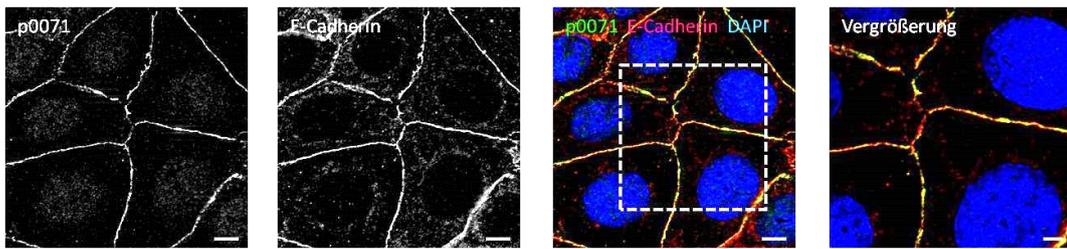
Um den Einfluss von p0071 auf NPRAP, p120, E-Cadherin und Desmoplakin genauer zu untersuchen, wurde eine Zelllinie verwendet, die p0071 dauerhaft überexprimiert (MCF-7-OE-p0071). Diese Zelllinie wurde durch Dr. René Keil zu Verfügung gestellt. Zu deren Etablierung wurden MCF-7-Zellen entweder mit einem Plasmid, das für humanes p0071 codiert (p0071-WT-pLVX-puro), oder mit dem entsprechenden Grundvektor (pLVX-puro) lentiviral transduziert.

Mittels Immunfluoreszenz sollte untersucht werden, wie sich die Überexpression von p0071 auf die Lokalisation von NPRAP, p120, E-Cadherin und Desmoplakin an Zellkontakten auswirkt. Hierfür wurden die entsprechenden Proteine durch Primärantikörper markiert und anschließend durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht (Cy3 = rot und DL488 = grün). Um Effekte sichtbar zu machen, die allein auf die Transfektion der Zellen zurückzuführen sind, wurde eine Kontrollzellreihe mitgeführt (MCF-7-OE-Kontrolle).

In den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p0071 mit E-Cadherin Proteinkomplexe bildet und Bestandteil von *Adherens junctions* ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass p0071 E-Cadherin an der Zellmembran stabilisiert und sein Verlust zu einer Internalisierung von E-Cadherin führt.

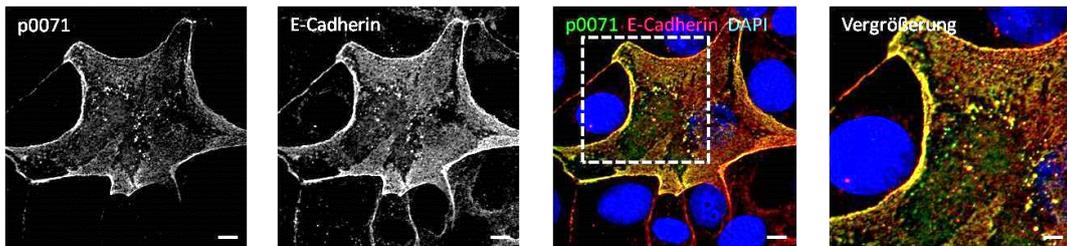
Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass die Überexpression von p0071 (grün) einen deutlichen Einfluss auf die Zellmorphologie hat. Die p0071 überexprimierenden Zellen verlieren ihre ursprüngliche Zellform fast vollständig und bilden teilweise Zellausläufer. In den MCF-7-OE-p0071-Zellen kommt es weiterhin zu einer Anreicherung von p0071 im Zytoplasma und an Zellkontakten. Die p0071-Überexpression beeinflusst die Expression von E-Cadherin und NPRAP (jeweils rot) deutlich. E-Cadherin ist in MCF-7-OE-p0071-Zellen deutlich vermehrt vorhanden, sowohl an Zellkontakten als auch im Zytoplasma. Invers dazu verhält sich die Expression von NPRAP. Diese zeigte sich deutlich vermindert, sowohl an Zellkontakten als auch im Zytoplasma. Auf die Expression und Lokalisation von p120 und Desmoplakin (jeweils rot) hatte die Überexpression von p0071 nur einen geringen Einfluss. P120 scheint etwas mehr an Zellkontakten lokalisiert zu sein und Desmoplakin etwas mehr im Zytoplasma (Abb. 28 bis 31).

MCF-7-OE-Kontrolle



A

MCF-7-OE-p0071

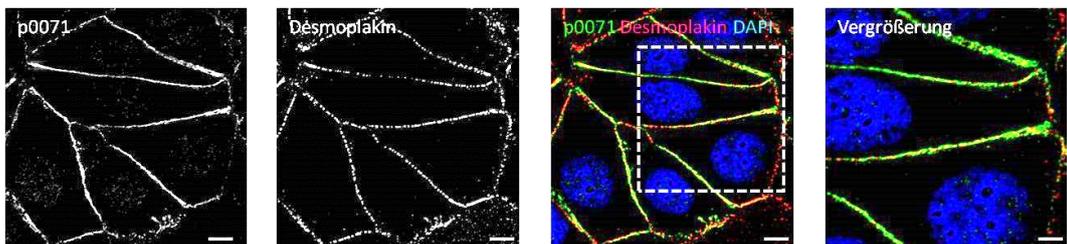


B

Abbildung 28: Reaktion von E-Cadherin auf die Überexpression von p0071

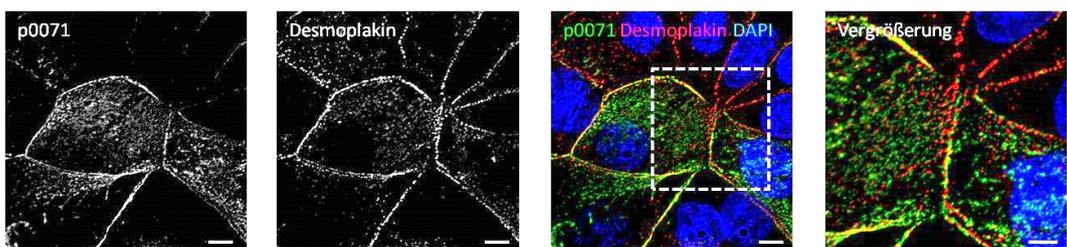
Die Zellreihen MCF-7-OE-Kontrolle (A) und MCF-7-OE-p0071 (B) wurden durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen in MeOH bei -20 °C fixiert. Als Primärantikörper wurden Anti-E-Cadherin-Kaninchen und Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (E-Cadherin) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm.

MCF-7-OE-Kontrolle



C

MCF-7-OE-p0071

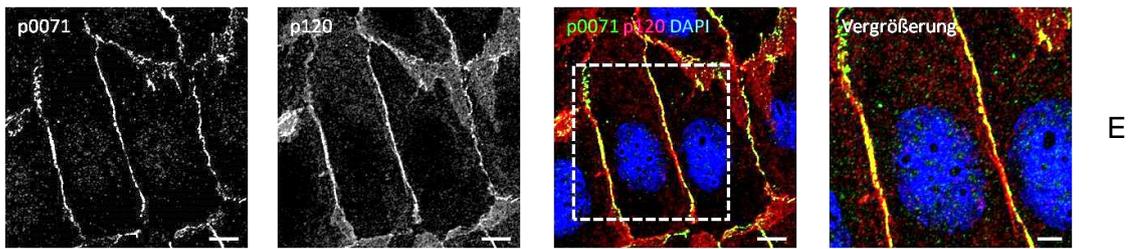


D

Abbildung 29: Reaktion von Desmoplakin auf die Überexpression von p0071

Die Zellreihen MCF-7-OE-Kontrolle (C) und MCF-7-OE-p0071 (D) wurden durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen in MeOH bei -20 °C fixiert. Als Primärantikörper wurden Anti-Desmoplakin-Kaninchen und Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (Desmoplakin) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm.

MCF-7-OE-Kontrolle



MCF-7-OE-p0071

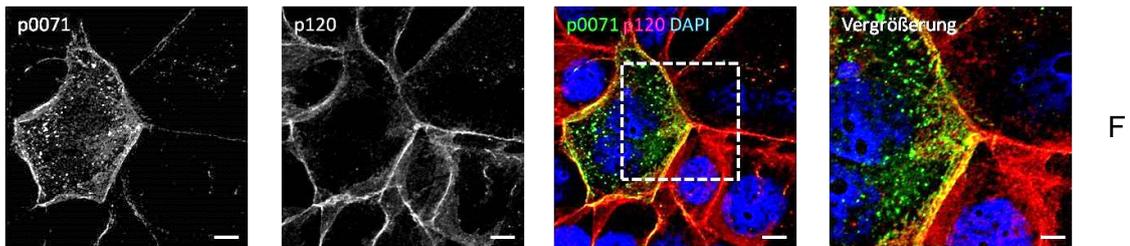
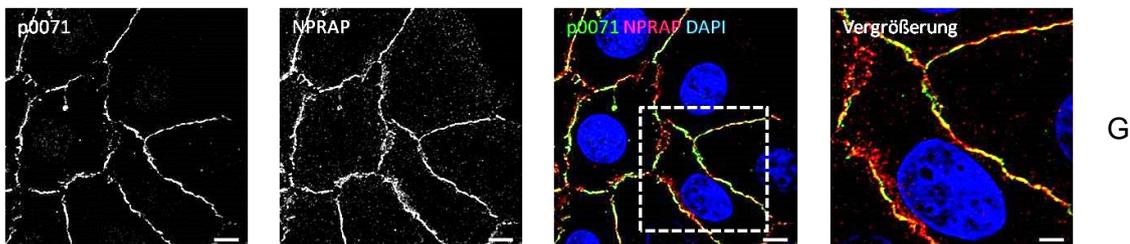


Abbildung 30: Reaktion von p120 auf die Überexpression von p0071

Die Zellreihen MCF-7-OE-Kontrolle (E) und MCF-7-OE-p0071 (F) wurden durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen in MeOH bei -20 °C fixiert. Als Primärantikörper wurden Anti-p120-Maus und Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (p120) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm.

MCF-7-OE-Kontrolle



MCF-7-OE-p0071

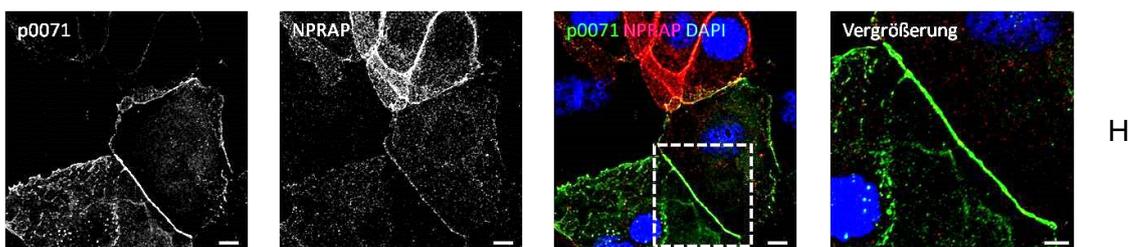


Abbildung 31: Reaktion von NPRAP auf die Überexpression von p0071

Die Zellreihen MCF-7-OE-Kontrolle (G) und MCF-7-OE-p0071 (H) wurden durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen in MeOH bei -20 °C fixiert. Als Primärantikörper wurden Anti-NPRAP-Maus und Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden grün (p0071) oder rot (E-Cadherin) markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (blau). Der Balken entspricht 20 µm, in der Vergrößerung 10 µm.

4.3.2 P0071 beeinflusst die Expression von NPRAP

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Überexpression von p0071 auf die Proteinlevel von p120, NPRAP, E-Cadherin und β -Catenin hat, erfolgte die Analyse mittels Western Blot. Hierfür wurden Zellen mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/cm²

in Well-Platten eingesät. Nach 24 Stunden erfolgten die Proteinisolation, die SDS-PAGE und der Western Blot. Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte mittels HRP-konjugierter Sekundärantikörper. Die absoluten Proteinmengen wurden mittels mitgeführtem Tubulinabgleich korrigiert, um sicherzustellen, dass eine erhöhte oder verminderte Proteinmenge nicht durch eine vermehrte oder verminderte Probenauftragung bedingt ist. Die gezeigten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Abb. 32 zeigt die Expression von p0071 der Zellreihen MCF-7-OE-Kontrolle und MCF-7-OE-p0071.

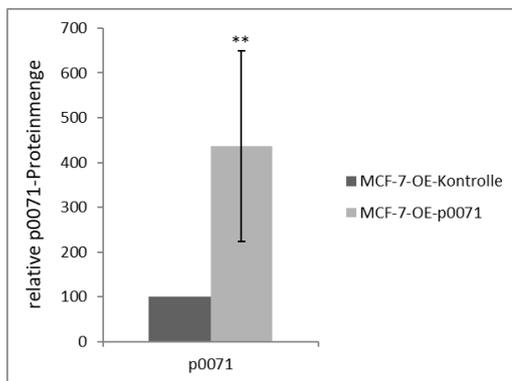


Abbildung 32: Kontrolle der Überexpression von p0071 im Western Blot

Die Zellreihen MCF-7-OE-Kontrolle und MCF-7-OE-p0071 wurden durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Proteinisolation, die SDS-PAGE und der Western Blot erfolgten 24 Stunden nach dem Aussäen. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen und Anti-Tubulin-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden HRP-markierte Sekundärantikörper verwendet. Die Western-Blot-Membranen dieser Experimente sind im Anlageteil separat dargestellt. ** entspricht $p \leq 0,005$

Nach Überexpression von p0071 kam es zu einer signifikanten Reduktion von NPRAP um ca. 25 %. Die Level von p120, E-Cadherin und β -Catenin zeigten keine signifikanten Veränderungen der Proteinlevel (Abb. 33).

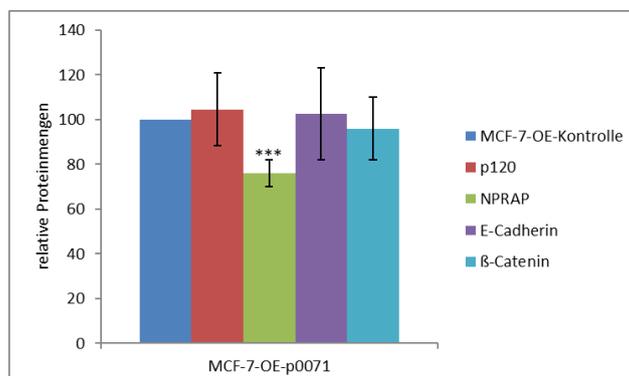


Abbildung 33: Proteinmengen nach Überexpression von p0071

Proteinmengen von p120, NPRAP, E-Cadherin und β -Catenin in der Zelllinie MCF-7-OE-p0071. Die Proteinisolation, die SDS-PAGE und der Western Blot erfolgten 24 Stunden nach der Einsaat. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen, Anti-p120-Maus, Anti-NPRAP-Maus, Anti-E-Cadherin-Maus, Anti- β -Catenin-Maus und Anti-Tubulin-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Als interner Standard wurde α -Tubulin mitgeführt. Die Proteinmengen wurden mit der jeweiligen Tubulinmenge abgeglichen. Die Proteinmenge der Zelllinie MCF-7-OE-Kontrolle entspricht 100 %. Die Western-Blot-Membranen dieser Experimente sind im Anlageteil separat dargestellt. *** entspricht $p \leq 0,001$

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Überexpression von p0071 einen deutlichen Einfluss auf E-Cadherin und NPRAP ausübt. In der Immunfluoreszenz, nach p0071-Überexpression, zeigte sich eine Zunahme von E-Cadherin an Zellkontakten und im Zytoplasma. Eine Zunahme der Proteinmenge konnte mit den Western-Blot-Analysen allerdings nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente und zeigt deutlich den stabilisierenden Effekt von p0071 auf E-Cadherin. In der Immunfluoreszenz zeigte sich weiterhin eine Reduktion von NPRAP an Zellkontakten und im Zytoplasma nach Überexpression von p0071. Diese Reduktion konnte auch im Proteinlevel von NPRAP nachgewiesen werden.

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass sich NPRAP und p0071 möglicherweise gegenseitig beeinflussen. Nach Verlust des einen Proteins kam es gleichzeitig zum Verlust des anderen Proteins. Nach Überexpression von p0071 kam es aber nicht zu einer Überexpression von NPRAP (wie durch die Ergebnisse der vorherigen Experimente vielleicht zu erwarten gewesen wäre), sondern zu einem Verlust von NPRAP. Dies lässt vermuten, dass sich die beiden Proteine möglicherweise über ein bestimmtes numerisches Verhältnis zueinander regulieren und eine grobe Abweichung davon in einem Verlust des anderen Proteins resultiert. In der Immunfluoreszenz und in den Western-Blot-Analysen zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen für p120, Desmoplakin und β -Catenin.

4.3.3 P0071 beeinflusst die Zellproliferation/-migration

Mit dem folgenden Experiment sollten die Zellmigration und -proliferation nach Überexpression von p0071 untersucht werden.

Hierfür wurde der ‚Wundheilungs-Assay‘ durchgeführt. Dabei wurde zunächst ein zweikammeriger Silikonrahmen in ein Well eingesetzt, anschließend wurden die beiden Kammern mit einer definierten Zellsuspension gefüllt. 24 Stunden nach dem Einsäen hatten die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet und der Silikonrahmen wurde aus dem Well genommen. Zwischen den beiden Zellrasen blieb ein zellfreier Streifen bestehen, in welchen die Zellen anschließend ‚einwanderten‘. Die Dokumentation der ‚Wundheilung‘ erfolgte stündlich durch *Live-Cell-Imaging*. Der Beobachtungszeitraum betrug insgesamt 24 Stunden. Die Zellreihen MCF-7-OE-Kontrolle und MCF-7-OE-p0071 wurden miteinander verglichen.

Nach Ablauf von 24 Stunden waren bei der Zellreihe MCF-7-OE-Kontrolle circa 70 % der Öffnungsfläche verschlossen, während dies bei der Zellreihe MCF-7-OE-p0071 auf circa 95 % der Öffnungsfläche zutraf (Abb. 34). Dies lässt vermuten, dass p0071 die

Zellproliferation und/oder -migration fördert. Ob dieser Effekt vor allem aufgrund verstärkter Migration oder Proliferation zustande kommt, lässt sich aus diesem Experiment nicht ableiten.

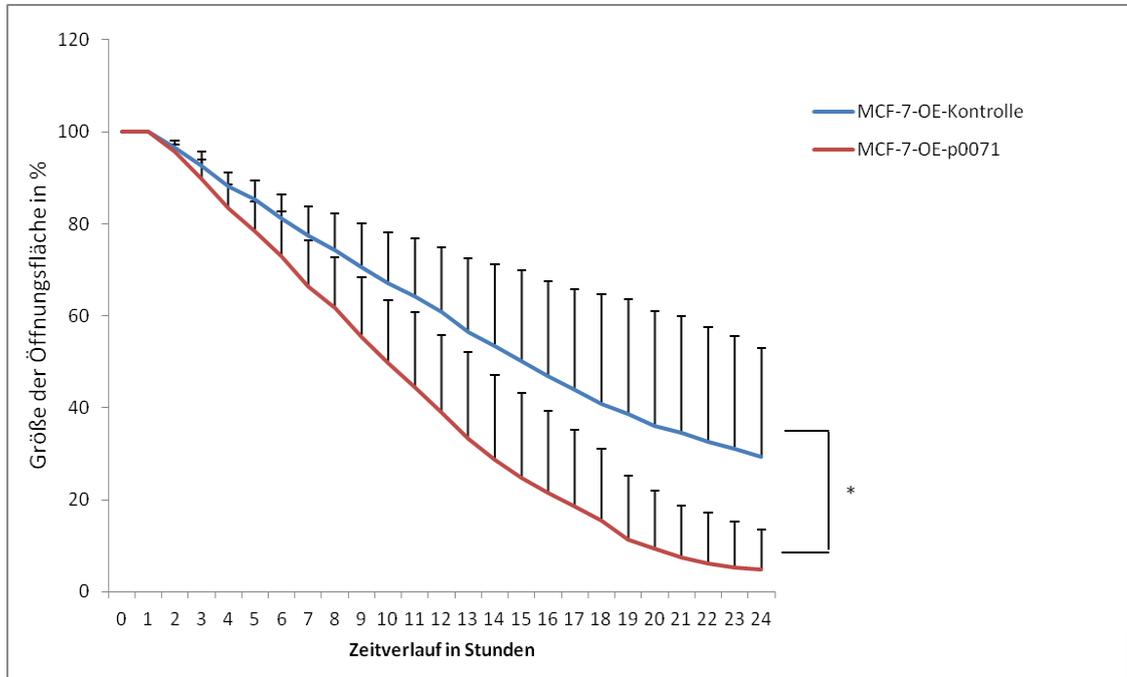


Abbildung 34: Zellproliferation und -migration nach Überexpression von p0071 im ‚Wundheilungs-Assay‘

Für den ‚Wundheilungs-Assay‘ wurden Zellen der Zelllinie MCF-7-OE-Kontrolle und MCF-7-OE-p0071 in je zwei Kavitäten eines Silikonrahmens eingesät. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Silikonrahmen entfernt, sodass zwischen beiden Zellrasen ein zellfreier Raum bestand. Die Proliferation und Migration der Zellen in diesen Raum wurden mittels *Live-Cell-Imaging* stündlich beobachtet und dokumentiert.

Im Diagramm ist auf der Ordinate die Öffnungsfläche des Bereichs zwischen den beiden Zellrasen dargestellt, auf der Abszisse der Zeitverlauf in Stunden. Die Geschwindigkeit des Verschlusses der Öffnungsfläche wurde für die MCF-7-OE-Kontrolle (blau) und für MCF-7-OE-p0071 (rot) durchgeführt.

* entspricht $p \leq 0,05$ (gilt nur für die Werte nach 24 Stunden)

Abschließend kann festgestellt werden, dass alle untersuchten p120-Catenine mit E-Cadherin Proteinkomplexe bilden und Bestandteile von *Adherens junctions* sind. E-Cadherin und die p120-Catenine bilden verschiedene Cadherin-Catenin-Komplexe, die gleichzeitig in *Adherens junctions* vorkommen und vermutlich räumlich nicht voneinander getrennt sind. Die Experimente mit *knockdown* legen nicht redundante Funktionen der p120-Catenine nahe, da beispielsweise der Verlust von E-Cadherin nach *knockdown* von p120 durch die anderen p120-Catenine nicht vollständig kompensiert werden kann, obwohl alle p120-Catenine stabilisierend auf E-Cadherin wirken. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass sich p120-Catenine gegenseitig beeinflussen. Hier sind vor allem die Wechselwirkung und möglicherweise die eigene Proteinkomplexbildung von p0071 und NPRAP zu nennen. Zusätzlich fördert p0071 die Zellproliferation und/oder -migration.

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Lokalisationen und Co-Lokalisationen von E-Cadherin, Desmoplakin und der p120-Catenine p120, p0071 und NPRAP in nativen MCF-7-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die p120-Catenine Bestandteile von *Adherens junctions* sind. Weiterhin sollte mit Immunpräzipitationsuntersuchungen gezeigt werden, welche Proteinkomplexe, bestehend aus E-Cadherin und den p120-Cateninen, existieren. Es konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin mit allen p120-Catenine Proteinkomplexe bildet, sich diese Proteinkomplexe aber unterschiedlich zusammensetzen. Durch *knockdown* einzelner p120-Catenine konnte gezeigt werden, dass diese nicht redundante Funktionen aufweisen und sich gegenseitig beeinflussen. Um die Funktionen von p0071 weiter zu untersuchen, erfolgte die Herstellung einer Zelllinie, die p0071 dauerhaft überexprimierte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von p0071 E-Cadherin an der Zellmembran stabilisiert und zu einem Verlust von NPRAP führt. Weiterhin wurde gezeigt, dass es nach p0071-Überexpression zu einer Zunahme der Zellproliferation und -migration kam.

5.1 P120-Catenine interagieren mit E-Cadherin und bilden Proteinkomplexe

Die Familie der Armadillo-Proteine unterteilt sich in mehrere Subgruppen, u. a. die p120-Catenine, die klassischen Catenine und die Plakophiline. Zur Gruppe der p120-Catenine gehören u. a. p120, p0071 und NPRAP. Die Mitglieder der Armadillo-Proteine besitzen jeweils eine Armadillo-Domäne (Abb. 5). Über diese Armadillo-Domäne erfolgt die Bindung der p120-Catenine an die JMD der klassischen Cadherine, wie z. B. E-Cadherin, und damit die Bildung des Cadherin-Catenin-Komplexes (Yap et al., 1998; Hatzfeld et al., 2003; Choi und Weis, 2005).

In den Lokalisationsuntersuchungen mittels Immunfluoreszenz konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zwischen den untersuchten p120-Cateninen und E-Cadherin zur deutlichen Co-Lokalisation an Zellkontakten kommt. Am stärksten ausgeprägt war diese Co-Lokalisation zwischen E-Cadherin und p120 sowie E-Cadherin und NPRAP. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin – in geringer Menge – auch jeweils ohne p120 oder NPRAP an der Zellmembran lokalisiert. An diesen ‚freien E-Cadherinen‘ bindet dann (vermutlich) ein anderes p120-Catenin, z. B. p0071. Die Co-Lokalisation zwischen E-Cadherin und p0071 war ebenfalls ausgeprägt, aber schwächer als zwischen E-Cadherin und p120 oder NPRAP. Es zeigten sich deutliche Bereiche mit p0071 ohne E-Cadherin, was vermuten lässt, dass p0071 dort an ein

anderes Cadherin, z. B. P-Cadherin (das auch in MCF-7-Zellen exprimiert wird) bindet (Abb. 7). In weiteren Untersuchungen wäre daher zu klären, mit welchen weiteren Cadherinen p0071 Bindungen eingehen kann und ob die p120-Catenine unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Cadherinen haben.

Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass p0071 und p120 möglicherweise an der Regulation von Desmosomen beteiligt sind. Hatzfeld et al. (2003) konnten zeigen, dass die Kopf- und Schwanzdomäne von p0071 mit Desmosomen interagiert. Weiterhin konnte p120 als Bindungspartner von Desmoglein identifiziert werden (Kanno et al., 2008a; Kanno et al., 2008b). Für NPRAP ist eine Interaktion mit desmosomalen Cadherinen aktuell nicht beschrieben. In den Lokalisationsuntersuchungen dieser Arbeit konnte eine Co-Lokalisation zwischen den untersuchten p120-Cateninen und Desmoplakin festgestellt werden. Die Co-Lokalisationen waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Am deutlichsten zeigten sie sich zwischen p120 und Desmoplakin; in geringerem Maß, aber ebenfalls vorhanden, zwischen p0071 und Desmoplakin und NPRAP und Desmoplakin (Abb. 9). Da sowohl p0071 als auch p120 als desmosomale Interaktionspartner beschrieben worden sind und gerade p0071 und NPRAP strukturell sehr ähnlich sind, liegt der Verdacht nahe, dass auch NPRAP als desmosomaler Interaktionspartner infrage kommt. Letztlich ist die Auflösung der Immunfluoreszenz aber zu gering, um allein aufgrund dieser Untersuchung darauf schließen zu lassen, dass die p120-Catenine Bestandteile von Desmosomen sind.

Im Folgenden wurde die Co-Lokalisation zwischen den p120-Cateninen untereinander untersucht. Hierbei zeigte sich, dass alle Interaktionspartner miteinander co-lokalisieren. Die Co-Lokalisation zwischen p0071 und NPRAP sowie zwischen p0071 und p120 war stärker ausgeprägt als zwischen NPRAP und p120. In der Färbung mit p120 und NPRAP zeigten sich Bereiche, in denen jeweils p120 und auch NPRAP alleine dargestellt werden konnten. In den Färbungen mit p0071 und entweder NPRAP oder p120 konnte jeweils nur p0071 einzeln dargestellt werden, nicht aber NPRAP oder p120 (Abb. 8). Dies ist ein Hinweis darauf, dass p0071 nicht nur an die klassischen Cadherine wie z. B. E-Cadherin bindet, sondern möglicherweise zusätzlich an NPRAP oder p120 und mit diesen Proteinen eigene Komplexe bildet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *Adherens junctions* aus unterschiedlichen Cadherin-Catenin-Komplexen aufgebaut sind, die wahrscheinlich voneinander nicht räumlich getrennt sind. Ob und wie sich die membranären Bereiche mit den unterschiedlichen Cadherin-Catenin-Komplexen unterscheiden, ist aktuell unklar.

Bei den Experimenten der Immunfluoreszenz ist es wichtig, zu bedenken, dass die Detektion des zu untersuchenden Proteins durch Markierung mittels Primärantikörper

erfolgt. An diesen bindet im Anschluss ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper. Damit entsteht ein Protein-Antikörper-Komplex. Die Tatsache, dass dieser Komplex eine gewisse Größe aufweist, ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen. Theoretisch ist es möglich, dass ein gemischtes Fluoreszenzsignal entsteht, obwohl die beiden Proteine nicht direkt miteinander interagieren (Abb. 35).

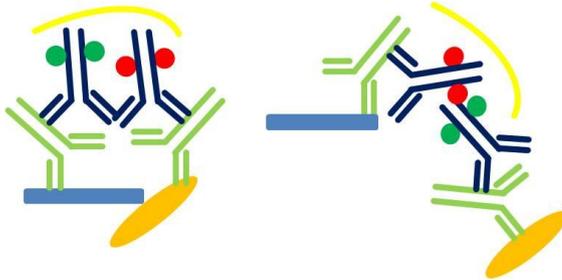


Abbildung 35: Methodisches Prinzip und Möglichkeit der Fehlinterpretation der Immunfluoreszenz

Linkes Bild: Protein 1 (blau) und Protein 2 (orange) stehen miteinander in Verbindung. Die Bindung der Antikörper erfolgte so, dass ein gemeinsames, gelbes Fluoreszenzsignal entsteht, das eine räumliche Nähe der Proteine anzeigt.

Rechtes Bild: Protein 1 (blau) und Protein 2 (orange) stehen nicht miteinander in Verbindung. Die Bindung der Antikörper erfolgte so, dass ein gemeinsames, gelbes Fluoreszenzsignal entsteht. Hier ist die Fehlinterpretation möglich, dass die Proteine miteinander co-lokalisieren.

Grün: Primärantikörper; dunkelblau: rot oder grün markierter Sekundärantikörper

Aufgrund der Ergebnisse der Immunfluoreszenz kann damit kein Rückschluss darauf gezogen werden, ob die co-lokalisierenden Proteine auch in einem gemeinsamen Proteinkomplex vorhanden sind. Um diese Fragestellung weiter zu untersuchen, erfolgten Experimente mittels Immunpräzipitation. Hierfür erfolgte die Bindung eines Antikörpers an das zu untersuchende Protein. In weiteren Schritten erfolgte die Identifikation der Proteine, die mit dem zu untersuchenden Protein assoziieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in der Immunpräzipitation von E-Cadherin p0071, p120, NPRAP und β -Catenin ebenfalls präzipitierbar waren (Abb. 10). In der Immunpräzipitation von p0071 waren E-Cadherin, β -Catenin und NPRAP präzipitierbar (Abb. 11), in der p120-Immunpräzipitation hingegen nur E-Cadherin und β -Catenin (Abb. 12). Diese Untersuchungen zeigen, dass E-Cadherin jeweils mit p0071, p120 und NPRAP Proteinkomplexe bildet. Interessant ist hier die Tatsache, dass es in der Immunpräzipitation von p0071 möglich war, gleichzeitig NPRAP zu präzipitieren, nicht aber p120. Dies ist ein Hinweis darauf, dass verschiedene Proteinkomplexe in der Zelle nebeneinander existieren könnten: ein Proteinkomplex bestehend aus E-Cadherin, p120 und β -Catenin und ein Proteinkomplex bestehend aus E-Cadherin, p0071, NPRAP und β -Catenin (Abb. 13). Weiterhin ist ein einzelner Proteinkomplex bestehend aus p0071 und NPRAP denkbar. Untersuchungen von Deguchi et al. (2000) konnten zeigen, dass ein Protein namens PAPIN mit seiner zweiten der sechs PDZ-Domänen jeweils p0071 und NPRAP binden kann. Ob PAPIN p0071 und NPRAP

gleichzeitig binden kann und damit als Linker zwischen beiden Proteinen fungiert, konnte nicht abschließend geklärt werden. Bei der Immunpräzipitation von p120 gelang es nicht, zusätzlich p0071 oder NPRAP zu präzipitieren (Abb. 12). Wenn PAPIN als Linker zwischen p0071 und NPRAP infrage kommt und die Verbindung über die PDZ-Domäne erfolgen würde, könnte auch erklärt werden, warum p120 nicht durch p0071 gebunden wird, da p120 keine PDZ-Bindedomäne besitzt.

Bei den Untersuchungen der Immunpräzipitation ist es wichtig, zu bedenken, dass vor der Bindung des Antikörpers an das zu untersuchende Protein ein Zelllysat hergestellt wurde. Bei der Co-Präzipitation verschiedener Proteine kann also darauf geschlossen werden, dass diese Proteine einen gemeinsamen Proteinkomplex bilden. Ob dieser Proteinkomplex *in vivo* bereits existierte oder erst nach Zelllyse entstanden ist, bleibt dabei jedoch unklar. Aus diesem Grund wäre es interessant, die Proteine des *in vivo* bestehenden Proteinkomplexes vor der Zelllyse miteinander zu verbinden, z. B. durch Crosslinking, und diese Proteinkomplexe anschließend zu untersuchen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass E-Cadherin mit den p120-Cateninen p120, p0071 und NPRAP unterschiedliche Proteinkomplexe bildet und die p120-Catenine Bestandteile von *Adherens junctions* sind. Diese unterschiedlichen Cadherin-Catenin-Komplexe lokalisieren – wahrscheinlich – nicht räumlich getrennt voneinander an der Zellmembran. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass p0071 und NPRAP einen eigenen Proteinkomplex bilden könnten, und zwar unabhängig von E-Cadherin. Die Untersuchungen von Deguchi et al. (2000) konnten zeigen, dass es zwischen p0071 und NPRAP ein Linkerprotein namens PAPIN geben könnte.

5.2 P120-Catenine beeinflussen sich gegenseitig und E-Cadherin

Um mehr über die Interaktionen und Funktionen der p120-Catenine zu erfahren, erfolgten Untersuchungen mit vorangegangenem *knockdown* einzelner p120-Catenine. Hierfür wurden die Zellen mittels si-RNA, spezifisch für p0071, p120 oder NPRAP, transfiziert. Für die Transfektion wurden Nukleinsäuren in Liposomen eingebracht. Diese Liposomen fusionierten mit der Zellmembran und brachten die si-RNA in die Zellen ein. Si-RNA Moleküle codieren für kein Protein. Sie binden in der Zelle an komplementäre mRNA. Über die Vermittlung des Enzymkomplexes RISC (RNA *induced silencing complex*) kommt es zur Spaltung der mRNA und damit zur Zerstörung der Information. Mit dieser Methode kann die Synthese eines Proteins in der Zelle gehemmt werden und damit die Funktion und die Einflussnahme auf andere Proteine untersucht werden. Um Beeinflussungen allein durch den Transfektionsvorgang sichtbar zu machen, wurden ebenfalls Zellen mit Kontroll-si-RNA transfiziert. Zum einen erfolgten Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz, um die

Einflussnahme des *knockdown* auf die Proteinlokalisierung im Bereich der Zellkontakte zu untersuchen, zum anderen erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge nach *knockdown* mittels Western Blot.

Der stabilisierende Effekt von p120 auf E-Cadherin wurde bereits hinreichend untersucht und beschrieben (Peifer und Yap, 2003; Reynolds und Carnahan, 2004; Reynolds und Rocznik-Ferguson, 2004; Xiao et al., 2007). P120 bindet mit seiner Armadillo-Domäne an die JMD von E-Cadherin. P120-Catenine, E-Cadherin, β -Catenin und α -Catenin bilden gemeinsam den *Adherens junctions complex* (Reynolds et al., 1994; Yap et al., 1998). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Reduktion von p120 gleichzeitig zu einer Reduktion der klassischen Cadherine, sowie von β -Catenin und α -Catenin führt (Davis et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Yuan et al. (2015) konnte außerdem zeigen, dass es nach Verlust von NPRAP zu einem Verlust von N-Cadherin und damit zur gestörten Architekturbildung in neuronalem Gewebe kommt. Insgesamt gibt es viele Hinweise darauf, dass alle p120-Catenine einen (mehr oder weniger starken) stabilisierenden Effekt auf E-Cadherin ausüben (Calkins et al., 2003; Hatzfeld et al., 2003; Setzer et al., 2004).

Die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass es nach *knockdown* von p120 in der Immunfluoreszenz zu einer deutlichen Reduktion von E-Cadherin an Zellkontakten – ohne Akkumulation im Zytoplasma – kommt (Abb. 18). Mittels Western Blot konnte eine signifikante Reduktion der E-Cadherin- und β -Catenin-Proteinlevel gezeigt werden (Abb. 27). Die deutliche Reduktion von E-Cadherin nach *knockdown* von p120 kann damit erklärt werden, dass es nach Verlust von p120 zu einer vermehrten Endozytose von E-Cadherin mit anschließender Degradierung kommt. Nach *knockdown* von p0071 und NPRAP kam es in der Immunfluoreszenz zu einer Verlagerung von E-Cadherin in das Zytoplasma, eine eindeutige Reduktion von E-Cadherin konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 14 und 22). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Reduktion von p0071 und NPRAP nur eine Internalisierung (ohne Abbau) und damit Verlagerung in das Zytoplasma von E-Cadherin bewirkt. In den Western-Blot-Analysen kann aufgrund der großen Standardabweichung keine Aussage über den E-Cadherin-Proteinlevel getroffen werden. Nach *knockdown* von p0071 kommt es allerdings zu einer signifikanten Reduktion des β -Catenin-Proteinlevels (Abb. 27). Dies ist ein Hinweis darauf, dass auch p0071 einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität des *Adherens junctions complex* hat. Nach NPRAP-*knockdown* zeigte sich der Proteinlevel von β -Catenin unverändert (Standardabweichung klein), als Hinweis darauf, dass NPRAP einen weniger starken Einfluss auf die Stabilisierung des Cadherin-Catenin-Komplexes ausübt (Abb. 27).

Über das Zusammenspiel von p120 und NPRAP wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von NPRAP in Tumorzellen mit einem geringeren Differenzierungsgrad und schlechterem *Outcome* assoziiert ist (Fang et al., 2012; Zhang et al., 2013). Dies ist ein Hinweis auf einen destabilisierenden Effekt von NPRAP auf *Adherens junctions*. Yang et al. (2010) konnten zeigen, dass die Überexpression von NPRAP zu einem reduzierten Level von p120 führt. Es wird eine kompetitive Bindung an E-Cadherin vermutet, die dazu führt, dass die erfolgreiche Bindung des einen Proteins an E-Cadherin zu einer Destabilisierung des jeweils anderen Proteins führt. Die Arbeitsgruppe um Zhang et al. (2010) konnte in zwei Lungenkrebszelllinien eine nicht kompetitive Bindung zwischen NPRAP und p120 an E-Cadherin im Zytoplasma zeigen. Auch hier war die Überexpression von NPRAP mit einem schlechteren Tumorstadium und *Outcome* für den Patienten vergesellschaftet. Andererseits gelang es Davis et al. (2003), nachzuweisen, dass NPRAP und ARVCF in Zellen mit p120-*knockdown* in der Lage sind, die Cadherin-basierten Zellverbindungen wiederherzustellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach p120-*knockdown* NPRAP an Zellkontakten unverändert vorhanden ist (Abb. 19). Im Western Blot konnte allerdings eine signifikante Reduktion des NPRAP-Proteinlevels nachgewiesen werden (Abb. 27).

Nach *knockdown* von NPRAP zeigte sich auch p120 an Zellkontakten unverändert (Abb. 24). Zum p120-Proteinlevel im Western Blot kann aufgrund einer zu großen Standardabweichung keine sichere Aussage getroffen werden. Aufgrund der Inkonsistenz der Ergebnisse und der Unklarheit über das Zusammenspiel der beiden Proteine, sollten hierzu in Zukunft weitere Experimente erfolgen.

Über die Interaktion zwischen p0071 und NPRAP sowie p0071 und p120 ist aktuell wenig bekannt. Mittels Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass es nach *knockdown* von p120 zu keiner Beeinflussung von p0071 kommt (Abb. 20). Umgekehrt blieb nach p0071-*knockdown* p120 ebenfalls unverändert an der Zellmembran vorhanden (Abb. 16). Diese Ergebnisse konnten mittels Western-Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 27). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass sich p0071 und p120 nicht gegenseitig beeinflussen.

Nach *knockdown* von p0071 konnte eine Reduktion von NPRAP in der Immunfluoreszenz gezeigt werden (Abb. 15). Ebenfalls kam es nach *knockdown* von NPRAP zu einer Reduktion von p0071 (Abb. 23). Auf der Ebene der Proteinlevel konnte nach NPRAP-*knockdown* eine signifikante Reduktion von p0071 gezeigt werden (Abb. 27). Nach p0071-*knockdown* kann über das Proteinlevel von NPRAP keine Aussage getroffen werden, da die Standardabweichung zu groß ist. Aufgrund

dieser Experimente kann geschlossen werden, dass sich p0071 und NPRAP möglicherweise gegenseitig stabilisieren oder regulieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle untersuchten p120-Catenine einen Einfluss auf E-Cadherin und damit auf *Adherens junctions* haben. Alle p120-Catenine stabilisieren E-Cadherin an der Zellmembran, während p120 den stärksten Einfluss zu haben scheint. Ein Verlust von p120 resultiert in einer Internalisierung und Degradierung von E-Cadherin. Ein Verlust von p0071 oder NPRAP resultiert in einer Internalisierung von E-Cadherin, aber nicht in einer Degradierung. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die p120-Catenine unterschiedliche Funktionen ausüben, die nicht vollständig durch die anderen Proteine ersetzt werden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die p120-Catenine gegenseitig beeinflussen. Hier ist vor allem das Zusammenspiel zwischen p0071 und NPRAP zu nennen. Der Verlust des einen Proteins führt - möglicherweise - zu einem Verlust des anderen Proteins.

5.3 P0071 beeinflusst E-Cadherin und NPRAP

Um die Funktionen von p0071 weiter zu untersuchen, erfolgten Experimente mit einer Zelllinie, die p0071 dauerhaft überexprimierte. Diese Zelllinie wurde durch Dr. René Keil zu Verfügung gestellt. Zu deren Etablierung wurden MCF-7-Zellen entweder mit einem Plasmid, das für humanes p0071 codiert (p0071-WT-pLVX-puro), oder dem entsprechenden Grundvektor (pLVX-puro) lentiviral transduziert. Anschließend erfolgten Fluoreszenzuntersuchungen, um den Einfluss einer p0071-Überexpression auf p120, NPRAP, E-Cadherin und Desmoplakin darzustellen. Weiterhin wurden die Proteinlevel von p120, NPRAP, E-Cadherin und β -Catenin in Western-Blot-Analysen untersucht.

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass p0071, p120 und NPRAP Bestandteile von *Adherens junctions* sind und E-Cadherin an der Zellmembran stabilisieren. Hatzfeld (2003) konnte zeigen, dass die transiente Überexpression von p0071 E-Cadherin an die Zellmembran rekrutiert und stabilisiert. P0071 ist weiterhin an vielfältigen Funktionen im Zellkern und Zytoplasma beteiligt. Es übt wesentliche Funktionen in der Koordination der Zellteilung aus. Über direkte Interaktion mit RhoA ist p0071 für die Ausbildung eines kontraktiven Ringes verantwortlich. Die Überexpression von p0071 beeinträchtigt die Zellteilung maßgeblich (Elia et al., 2006; Wolf et al., 2006; Keil et al., 2007).

In diesen Experimenten zeigte sich nach Überexpression von p0071 eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie. P0071-überexprimierende Zellen haben ihre normale Form verloren und fingerförmige Zellausläufer gebildet. Weiterhin konnte eine

Anreicherung von E-Cadherin, sowohl an Zellkontakten als auch im Zytoplasma (Abb. 28), festgestellt werden. Der Proteinlevel von E-Cadherin im Western Blot blieb allerdings unbeeinflusst (Abb. 33). Dieses Ergebnis unterstreicht den stabilisierenden Effekt von p0071 auf E-Cadherin und damit auf *Adherens junctions*. Die Tatsache des unbeeinflussten Proteinlevels von E-Cadherin im Western Blot könnte mit einer geringen Transduktionseffizienz innerhalb der Zelllinie erklärt werden. Die Zellen, die p0071 überexprimierten, wurden in der Immunfluoreszenz durch ein sehr helles Fluoreszenzsignal erkannt und gezielt aufgesucht. Wenn aber innerhalb der Zelllinie zu wenige Zellen p0071 überexprimieren, kann im Western Blot möglicherweise keine Änderung der Proteinmenge von E-Cadherin gezeigt werden.

Über die Interaktion zwischen p0071 und NPRAP wird in der Literatur aktuell wenig geschrieben. In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass es nach Überexpression von p0071 zu einer Reduktion von NPRAP in der Immunfluoreszenz, sowohl an der Zellmembran als auch im Zytoplasma, kommt (Abb. 31). Weiterhin konnte eine signifikante Reduktion des NPRAP-Proteinlevels nach p0071-Überexpression im Western Blot gezeigt werden (Abb. 33). Mit den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass sich NPRAP und p0071 gegenseitig beeinflussen könnten. Nach Verlust des einen Proteins, kam es gleichzeitig zum Verlust des anderen Proteins. Nach Überexpression von p0071 kam es aber nicht zu einer Überexpression von NPRAP (wie durch die Ergebnisse der vorherigen Experimente vielleicht zu vermuten gewesen wäre), sondern ebenfalls zu einem Verlust von NPRAP. Dies lässt vermuten, dass sich die beiden Proteine möglicherweise über ein bestimmtes numerisches Verhältnis zueinander regulieren und eine grobe Abweichung davon in einem Verlust des anderen Proteins resultiert.

Die Überexpression von p0071 hatte nur wenig Einfluss auf p120. Diese zeigte sich an Zellkontakten allenfalls als geringgradig erhöht (Abb. 30). Der Proteinlevel im Western Blot blieb unbeeinflusst. Des Weiteren ist bekannt, dass p0071 und p120 auch an der Regulation von Desmosomen beteiligt sind (Hatzfeld et al., 2003; Kanno et al., 2008a; Kanno et al., 2008b). Nach Überexpression von p0071 konnte kein ausgeprägter Effekt auf Desmoplakin in der Immunfluoreszenz gesehen werden. Es kam lediglich zu einer leichten Anreicherung von Desmoplakin im Zytoplasma (Abb. 29).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Überexpression von p0071 zu einer deutlichen Beeinflussung der Zellmorphologie führt. Weiterhin stabilisiert es E-Cadherin an der Zellmembran. Nach Überexpression von p0071 konnte eine deutliche Reduktion von NPRAP an Zellkontakten und im Zytoplasma festgestellt werden, was zeigt, dass sich p0071 und NPRAP möglicherweise gegenseitig

regulieren. Wie genau diese Regulation funktioniert, ist aktuell unklar. P0071-Überexpression hat keinen Einfluss auf Desmosomen und auf p120.

5.4 P0071 beeinflusst die Zellproliferation/-migration

Um die Funktionen von p0071 auf Zellmigration und -proliferation zu untersuchen, erfolgten Experimente mittels ‚Wundheilungs-Assay‘. Hierbei wurde ein zweifelhastiger Silikonrahmen in ein Well eingelegt. In beide Fenster wurde eine Zellsuspension gleicher Konzentration gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation (konfluenter Zellrasen in beiden Fenstern vorhanden) erfolgte die Entfernung des Silikonrahmens, sodass zwischen beiden Zellrasen ein zellfreier Raum sichtbar war. Die Bewegung der Zellen in diesen Raum wurde stündlich mittels *Live-Cell-Imaging* dokumentiert. Der Beobachtungszeitraum betrug insgesamt 24 Stunden.

Es ist bereits bekannt, dass Proteine der p120-Catenine Rho-GTPasen regulieren und damit in Prozesse wie Zelladhäsion, -migration, epithelial-mesenchymale Transition und Zellteilung eingebunden sind (Anastasiadis und Reynolds, 2001; Grosheva et al., 2001; Perez-Moreno et al., 2006; Wildenberg et al., 2006). Weiterhin konnte für p0071 eine Modulation des Aktinzytoskeletts über Rho-GTPasen gezeigt werden (Elia et al., 2006; Wolf et al., 2006). Allein für p0071 konnten 22 Bindungspartner identifiziert werden, die an der Zytoskelettorganisation beteiligt sind (Keil et al., 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellreihe MCF-7-OE-p0071 den zellfreien Raum im Vergleich zur Kontrolle (MCF-7-OE-Kontrolle) nach 24 Stunden schneller verschlossen hat (Abb. 34). Dies legt den Verdacht nahe, dass die Überexpression von p0071 zu einer Zunahme der Proliferations- und/oder Migrationsfähigkeit von Zellen führt. Setzer et al. (2004) konnten in einem ähnlichen Experiment zeigen, dass sich die Wundheilung einer *In-vitro*-Wunde nach p0071-Überexpression langsamer vollzog als ohne Überexpression von p0071. Dies deutet auf eine Hemmung der Proliferation und Migration durch Überexpression von p0071 hin. Für die Überexpression von p120 und Plakophilin 1 konnte keine Veränderung der Wundheilung beobachtet werden. Bei dem Vergleich beider Experimente muss beachtet werden, dass diese mit unterschiedlichen Zelllinien (A431-Zellen vs. MCF-7-Zellen) und veränderter Durchführung stattgefunden haben. Setzer et al. (2004) fügten dem Zellrasen eine ‚natürliche Wunde‘ durch einen Kratzer zu. Der zellfreie Raum, der bei den Experimenten dieser Arbeit genutzt wurde, wurde von Beginn an freigehalten und nicht nachträglich in einen intakten Zellverband eingebracht. Eine Wunde, die einem intakten Zellverband zugeführt wird, setzt möglicherweise Mediatoren frei, welche das Verhalten der Zellen zusätzlich beeinflussen und somit zu einem anderen Testergebnis führen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass p0071 zum einen E-Cadherin an der Zellmembran stabilisiert und zum anderen die Zellproliferation und/oder -migration fördern kann.

5.5 Klinische Bedeutung und Perspektiven

Maligne Tumoren gehören zu den häufigsten Erkrankungen in der heutigen Gesellschaft. Bis heute ist es noch nicht möglich, alle malignen Tumoren so zu therapieren, dass der Patient nach Abschluss der Behandlung wieder vollständig geheilt ist. Bei der Entstehung von malignen Tumoren und vor allem deren Metastasierung spielen Zellkontakte eine wesentliche Rolle. Eine Zelle kann sich nur dann aus dem Zellverband lösen und an eine andere Stelle des Körpers gelangen (Metastase), wenn es ihr möglich ist, Zellkontakte aufzulösen. Das Verständnis dieser Mechanismen ist daher wichtig, um eine Metastasierung (in Zukunft) beeinflussen zu können.

Die Interaktion der p120-Catenine in *Adherens junctions* und Desmosomen spielt hierbei eine wichtige Rolle. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stabilisieren p0071, p120 und NPRAP E-Cadherin an der Zellmembran und wirken damit – möglicherweise – stabilisierend auf einen Zellverband und damit einer eventuellen Metastasierung entgegen. Andererseits sind die Proteine der p120-Catenin-Familie multifunktional und haben vielfältige Funktionen im Zytoplasma, Zellkern und Zytoskelett einer Zelle. Daher verwundert es nicht, dass einzelne Untersuchungsergebnisse der theoretischen Betrachtung eines Sachverhaltes konträr gegenüberstehen können.

Für die Zukunft ist es daher wichtig, mehr über die einzelnen Funktionen der p120-Catenine, deren Zusammenspiel und gegenseitiger Beeinflussung zu erfahren, um im nächsten Schritt ein Verständnis für die Mechanismen in malignen Tumoren zu entwickeln. Für alle Patienten mit einer Krebserkrankung ist es wünschenswert, dass diese Mechanismen gut verstanden werden, um anschließend eine medikamentöse Beeinflussung möglich zu machen. Daher ist es wichtig, durch weitere Untersuchungen mehr über die p120-Catenine, *Adherens junctions* und Desmosomen zu erfahren. Um Langzeiteffekte der p120-Catenine auf Zellen zu untersuchen, wäre es hilfreich, Zellreihen herzustellen, die p0071, p120 oder NPRAP effektiv und dauerhaft überexprimieren, und solche, die p120-Catenine gar nicht exprimieren. An diesen Zellen könnten dann Untersuchungen zur Lokalisation von Proteinen und funktionelle Tests durchgeführt werden, z. B. könnte der ‚Wundheilungs-Assay‘ mit Hemmung der Zellproliferation durchgeführt werden, um mehr über die Migrationsfähigkeit zu erfahren und umgekehrt. Mit der Actin Phalloidin-Färbung könnten Auswirkungen auf die

Ausbildung des Zytoskeletts untersucht werden. Weiterhin ist es wichtig, zu erfahren, welchen Einfluss das Protein ARVCF in *Adherens junctions* hat.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zellkontakte sind wichtige Strukturen mehrzelliger Lebewesen, da sie den interzellulären Zusammenhalt und die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen ermöglichen. Unter diesen vermitteln *Adherens junctions* und Desmosomen einen mechanischen Zellzusammenhalt. Der Aufbau von *Adherens junctions* und Desmosomen ist sehr ähnlich und durch drei Hauptkomponenten gekennzeichnet: die transmembranären Cadherine, an deren intrazellulären Anteil die Proteine der p120-Catenine binden, die ihrerseits als Adapterproteine für das Zytoskelett wirken. Das zu den klassischen Cadherinen gehörende E-Cadherin ist charakteristisch für epitheliale *Adherens junctions*. E-Cadherin ist ein transmembranes Protein, das über eine extrazelluläre Domäne, kalziumabhängig, homologe Verbindungen zur Nachbarzelle eingeht. Im Bereich der intrazellulären Domäne binden die Proteine der p120-Catenine und regulieren so die Stabilität von E-Cadherin an der Zellmembran. Über weitere Proteine wie β -Catenin und α -Catenin erfolgt die Verbindung zum Zytoskelett.

Zur Familie der p120-Catenine gehören die in *Adherens junctions* vorkommenden Proteine p120, p0071 und NPRAP sowie die primär desmosomalen Plakophiline 1–3. Diese Proteine sind multifunktional: Zum einen haben sie über die Interaktion mit Cadherinen Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion, zum anderen lokalisieren diese Proteine im Zytoplasma und Zellkern, wo sie an der Regulation vielfältiger Signalwege beteiligt sind. Da die Proteine p120, p0071 und NPRAP klassische Cadherine über deren juxtamembranäre Domäne binden, liegt der Schluss nahe, dass sie um dieselbe Bindungsstelle kompetieren und entsprechend verschiedene Cadherin-Catenin-Komplexe in *Adherens junctions* existieren. Inwieweit diese unterschiedlichen Komplexe in Epithelzellen tatsächlich vorkommen und ob diese unterschiedliche Funktionen bedingen, ist bisher weitestgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten daher Untersuchungen zur Lokalisation der Proteine p120, p0071, NPRAP und E-Cadherin in nativen MCF-7-Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und nach *knockdown* einzelner p120-Catenine. Weiterhin wurden die Proteinlevel der p120-Catenine, von E-Cadherin und β -Catenin nach *knockdown* einzelner p120-Catenine untersucht, um ihre Rolle bei der Stabilisierung des E-Cadherins zu charakterisieren. Zur Untersuchung weiterer Funktionen – speziell von p0071 – wurde eine Zellreihe hergestellt, die p0071 dauerhaft überexprimiert. Hieran wurden Lokalisationsstudien und Experimente zur Zellproliferation und -migration durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin mit p120, p0071 und NPRAP verschiedene Proteinkomplexe bildet, die parallel nebeneinander in *Adherens junctions*

vorkommen können. Eine räumliche Trennung der unterschiedlichen Proteinkomplexe ist zu vermuten, konnte hier aber nicht beobachtet werden. Daher bleibt es weiterhin offen, ob sich die Proteinkomplexe in einem Zellkontakt miteinander mischen oder ob getrennte *Adherens junctions* entstehen, die aber aufgrund der unzureichenden Auflösung der Lichtmikroskopie nicht unterschieden werden können.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die p120-Catenine E-Cadherin an der Zellmembran stabilisieren. P0071, p120 und NPRAP haben in *Adherens junctions* jeweils unterschiedliche Funktionen, die sich nicht gegenseitig ersetzen lassen. Weiterhin zeigte sich, dass sich die p120-Catenine gegenseitig beeinflussen, regulieren und möglicherweise miteinander Proteinkomplexe bilden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass p0071 einerseits E-Cadherin an der Zellmembran stabilisiert und andererseits Zellmigration und/oder -proliferation fördert.

Das Verständnis der Funktion und Regulation von *Adherens junctions* und Desmosomen ist wichtig für das Verständnis von Tumorentstehung und Metastasierung. Die Auflösung von Zellkontakten und damit das Herauslösen einer Zelle aus einem Zellverband sind wichtige Eigenschaften von malignen Zellen. Das Verständnis und die Beeinflussung dieser Mechanismen können Grundlage für die Entwicklung von Medikamenten gegen bösartige Tumorerkrankungen sein.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Anastasiadis PZ, Reynolds AB (2001) Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Current opinion in cell biology* 13:604–610
- Bass-Zubek AE, Godsel LM, Delmar M, Green KJ (2009) Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Current opinion in cell biology* 21:708–716. doi:10.1016/j.ceb.2009.07.002
- Behrens J (1989) Dissecting tumor cell invasion; Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology* 108:2435–2447. doi:10.1083/jcb.108.6.2435
- Birchmeier W (1994) Molecular aspects of the loss of cell adhesion and gain of invasiveness in carcinomas. *Princess Takamatsu symposia* 24:214–232
- Böcker W, Höfler HK, Lax S, Poremba C, Moll R, Tannapfel A, Probst-Hensch N (2008) Tumorerkrankungen. In: Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, Böcker-Denk-Heitz-Moch (Hrsg) *Pathologie. Mit über 200 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch; www.studentconsult.de]. Elsevier Urban & Fischer, München, S 167–217*
- Bruin A de, Müller E, Wurm S, Caldelari R, Wyder M, Wheelock MJ, Suter MM (1999) Loss of invasiveness in squamous cell carcinoma cells overexpressing desmosomal cadherins. *Cell adhesion and communication* 7:13–28
- Calkins CC, Hoepner BL, Law CM, Novak MR, Setzer SV, Hatzfeld M, Kowalczyk AP (2003) The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 278:1774–1783. doi:10.1074/jbc.M205693200
- Chalmers IJ, Höfler H, Atkinson MJ (1999) Mapping of a cadherin gene cluster to a region of chromosome 5 subject to frequent allelic loss in carcinoma. *Genomics* 57:160–163. doi:10.1006/geno.1998.5717
- Choi H-J, Weis WI (2005) Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *Journal of molecular biology* 346:367–376. doi:10.1016/j.jmb.2004.11.048
- Citalán-Madrid AF, García-Ponce A, Vargas-Robles H, Betanzos A, Schnoor M (2013) Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms. *Tissue barriers* 1:e26938. doi:10.4161/tisb.26938
- Dai S-D, Wang Y, Zhang J-Y, Di Zhang, Zhang P-X, Jiang G-Y, Han Y, Zhang S, Cui Q-Z, Wang E-H (2011) Upregulation of delta-catenin is associated with poor prognosis

and enhances transcriptional activity through Kaiso in non-small-cell lung cancer. *Cancer science* 102:95–103. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01766.x

Daniel JM, Reynolds AB (1999) The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and cellular biology* 19:3614–3623

Davies E, Cochrane R, Hiscox S, Jiang W, Sweetland H, Mansel R (1997) The role of desmoglein 2 and E-cadherin in the invasion and motility of human breast cancer cells. *International journal of oncology* 11:415–419

Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of cell biology* 163:525–534. doi:10.1083/jcb.200307111

Deguchi M, Iizuka T, Hata Y, Nishimura W, Hirao K, Yao I, Kawabe H, Takai Y (2000) PAPIN. A novel multiple PSD-95/Dlg-A/ZO-1 protein interacting with neural plakophilin-related armadillo repeat protein/delta-catenin and p0071. *The Journal of biological chemistry* 275:29875–29880. doi:10.1074/jbc.M005384200

Di Zhang, Zhang J-Y, Wang E-H (2015) delta-catenin promotes the malignant phenotype in breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36:569–575. doi:10.1007/s13277-014-2680-8

Elia LP, Yamamoto M, Zang K, Reichardt LF (2006) p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins. *Neuron* 51:43–56. doi:10.1016/j.neuron.2006.05.018

Fang Y, Li Z, Wang X, Zhang S (2012) Expression and biological role of delta-catenin in human ovarian cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 138:1769–1776. doi:10.1007/s00432-012-1257-4

Fei Y, Cheng Z, Liu S, Liu X, Ge Z, Wang F, Zong G, Wang W (2009) Expression and clinical significance of p120 catenin mRNA and protein in pancreatic carcinoma. *Bosnian journal of basic medical sciences* 9:191–197

Franke WW (2009) Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a003061. doi:10.1101/cshperspect.a003061

Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (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. *Journal of cell science* 114:695–707

- Hatta K, Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule; Its identity in the cadherin gene family. *The Journal of cell biology* 106:873–881
- Hatzfeld M (2003) Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *Journal of cell science* 116:1219–1233. doi:10.1242/jcs.00275
- Hatzfeld M, Nachtsheim C (1996) Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *Journal of cell science* 109 (Pt 11):2767–2778
- Hatzfeld M, Haffner C, Schulze K, Vinzens U (2000) The Function of Plakophilin 1 in Desmosome Assembly and Actin Filament Organization. *The Journal of cell biology* 149:209–222
- Hatzfeld M (2007) Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et biophysica acta* 1773:69–77. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.009
- Hatzfeld M, Green KJ, Sauter H (2003) Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *Journal of cell science* 116:1219–1233
- Hatzfeld M, Keil R, Magin TM (2017) Desmosomes and Intermediate Filaments; Their Consequences for Tissue Mechanics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9. doi:10.1101/cshperspect.a029157
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90:871–882
- Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F, Reynolds AB (2002) A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of cell biology* 159:465–476. doi:10.1083/jcb.200205115
- Israely I, Costa RM, Xie CW, Silva AJ, Kosik KS, Liu X (2004) Deletion of the neuron-specific protein delta-catenin leads to severe cognitive and synaptic dysfunction. *Current biology* : CB 14:1657–1663. doi:10.1016/j.cub.2004.08.065
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119:1420–1428. doi:10.1172/JCI39104

- Kanno M, Aoyama Y, Isa Y, Yamamoto Y, Kitajima Y (2008a) P120 catenin is associated with desmogleins when desmosomes are assembled in high-Ca²⁺ medium but not when disassembled in low-Ca²⁺ medium in DJM-1 cells. *The Journal of dermatology* 35:317–324. doi:10.1111/j.1346-8138.2008.00480.x
- Kanno M, Isa Y, Aoyama Y, Yamamoto Y, Nagai M, Ozawa M, Kitajima Y (2008b) P120-catenin is a novel desmoglein 3 interacting partner; Identification of the p120-catenin association site of desmoglein 3. *Experimental cell research* 314:1683–1692. doi:10.1016/j.yexcr.2008.01.031
- Kaufmann U, Zuppinger C, Waibler Z, Rudiger M, Urbich C, Martin B, Jockusch BM, Eppenberger H, Starzinski-Powitz A (2000) The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *Journal of cell science* 113 (Pt 22):4121–4135
- Keil R, Wolf A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M (2007) Beyond regulation of cell adhesion; Local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.) 6:122–127. doi:10.4161/cc.6.2.3741
- Keil R, Schulz J, Hatzfeld M (2013) p0071/PKP4, a multifunctional protein coordinating cell adhesion with cytoskeletal organization. *Biological chemistry* 394:1005–1017. doi:10.1515/hsz-2013-0114
- Kim J-S, Bareiss S, Kim KK, Tatum R, Han J-R, Jin YH, Kim H, Lu Q, Kim K (2006) Presenilin-1 inhibits delta-catenin-induced cellular branching and promotes delta-catenin processing and turnover. *Biochemical and biophysical research communications* 351:903–908. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.135
- Kim H, Han J-R, Park J, Oh M, James SE, Chang S, Lu Q, Lee KY, Ki H, Song W-J, Kim K (2008) Delta-catenin-induced dendritic morphogenesis. An essential role of p190RhoGEF interaction through Akt1-mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 283:977–987. doi:10.1074/jbc.M707158200
- Kowalczyk AP, Green KJ (2013) Structure, function, and regulation of desmosomes. *Progress in molecular biology and translational science* 116:95–118. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4
- Liauw J, van Nguyen, Huang J, St George-Hyslop P, Rozmahel R (2002) Differential display analysis of presenilin 1-deficient mouse brains. *Brain research. Molecular brain research* 109:56–62
- Lu Q, Paredes M, Medina M, Zhou J, Cavallo R, Peifer M, Orecchio L, Kosik KS (1999) delta-catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *The Journal of cell biology* 144:519–532

- Malliri A, Collard JG (2003) Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Current opinion in cell biology* 15:583–589
- Mareel MM, Behrens J, Birchmeier W, Bruyne GK de, Vleminckx K, Hoogewijs A, Fiers WC, van Roy FM (1991) Down-regulation of E-cadherin expression in Madin Darby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *International journal of cancer* 47:922–928
- Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS (2000) Hemizyosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics* 63:157–164. doi:10.1006/geno.1999.6090
- Moll R, Schäfer S, Koch PJ (1994) Molekulare Diversität der desmosomalen Cadherine und ihr Potential als Marker in der Histodiagnose von Karzinomen. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 78:277–284
- Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *The EMBO journal* 7:3679–3684
- Navarro P (1991) A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *The Journal of cell biology* 115:517–533. doi:10.1083/jcb.115.2.517
- Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B (2000) p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *The Journal of cell biology* 150:567–580
- Nose A, Nagafuchi A, Takeichi M (1987) Isolation of placental cadherin cDNA; Identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *The EMBO journal* 6:3655–3661
- Paffenholz R, Franke WW (1997) Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation; research in biological diversity* 61:293–304. doi:10.1046/j.1432-0436.1997.6150293.x
- Peifer M, Yap AS (2003) Traffic control; P120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 163:437–440. doi:10.1083/jcb.200310090
- Perez-Moreno M, Davis MA, Wong E, Pasolli HA, Reynolds AB, Fuchs E (2006) p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell* 124:631–644. doi:10.1016/j.cell.2005.11.043

- Pratt AJ, MacRae IJ (2009) The RNA-induced silencing complex; A versatile gene-silencing machine. *The Journal of biological chemistry* 284:17897–17901. doi:10.1074/jbc.R900012200
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & development* 15:1613–1618. doi:10.1101/gad.198501
- Reynolds AB, Roesel DJ, Kanner SB, Parsons JT (1989) Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Molecular and cellular biology* 9:629–638
- Reynolds AB, Herbert L, Cleveland JL, Berg ST, Gaut JR (1992) p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* 7:2439–2445
- Reynolds AB, Daniel J, McCrea PD, Wheelock MJ, Wu J, Zhang Z (1994) Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Molecular and cellular biology* 14:8333–8342
- Reynolds AB, Carnahan RH (2004) Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn; Implications in disease and cancer. *Seminars in cell & developmental biology* 15:657–663. doi:10.1016/j.semcdb.2004.09.003
- Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A (2004) Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* 23:7947–7956. doi:10.1038/sj.onc.1208161
- 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 & development* 3:96–113
- Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, Eistetter H, Lottspeich F, Engel J, Dölz R, Jähnig F, Epplen J, Mayer S (1987) The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *The EMBO journal* 6:3647–3653
- Robert-Koch-Institut (Hrsg) (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. Robert Koch-Institut, Berlin
- Schackmann RCJ, Tenhagen M, van de Ven RAH, Derksen PWB (2013) p120-catenin in cancer - mechanisms, models and opportunities for intervention. *Journal of cell science* 126:3515–3525. doi:10.1242/jcs.134411

- Scheel C, Weinberg RA (2012) Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in cancer biology* 22:396–403. doi:10.1016/j.semcancer.2012.04.001
- Setzer SV, Calkins CC, Garner J, Summers S, Green KJ, Kowalczyk AP (2004) Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration. *The Journal of investigative dermatology* 123:426–433. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23319.x
- Silva Neto B, Smith GL, Mandeville JA, Vanni AJ, Wotkowicz C, Rieger-Christ KM, Baumgart E, Jacobs MA, Cohen MS, Zeheb R, Loda M, Libertino JA, Summerhayes IC (2008) Prognostic significance of altered p120 ctn expression in bladder cancer. *BJU international* 101:746–752. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07264.x
- Silverman JB, Restituto S, Lu W, Lee-Edwards L, Khatri L, Ziff EB (2007) Synaptic anchorage of AMPA receptors by cadherins through neural plakophilin-related arm protein AMPA receptor-binding protein complexes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:8505–8516. doi:10.1523/JNEUROSCI.1395-07.2007
- Sotomayor M, Gaudet R, Corey DP (2014) Sorting out a promiscuous superfamily: towards cadherin connectomics. *Trends in cell biology* 24:524–536. doi:10.1016/j.tcb.2014.03.007
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51:1409–1416
- Statistisches Bundesamt (2017) *Gesundheit; Todesursachen in Deutschland*
- Takeichi M (1988) The cadherins; Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development (Cambridge, England)* 102:639–655
- Tselepis C, Chidgey M, North A, Garrod D (1998) Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8064–8069
- Turner TN, Sharma K, Oh EC, Liu YP, Collins RL, Sosa MX, Auer DR, Brand H, Sanders SJ, Moreno-De-Luca D, Pihur V, Plona T, Pike K, Soppet DR, Smith MW, Cheung SW, Martin CL, State MW, Talkowski ME, Cook E, Haganir R, Katsanis N, Chakravarti A (2015) Loss of delta-catenin function in severe autism. *Nature* 520:51–56. doi:10.1038/nature14186

- van Roy F, Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 65:3756–3788. doi:10.1007/s00018-008-8281-1
- Wijnhoven BPL, Pignatelli M, Dinjens WNM, Tilanus HW (2005) Reduced p120ctn expression correlates with poor survival in patients with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *Journal of surgical oncology* 92:116–123. doi:10.1002/jso.20344
- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settlemann J, Reynolds AB (2006) p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 127:1027–1039. doi:10.1016/j.cell.2006.09.046
- Wolf A, Keil R, Götzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Hüttelmaier S, Hatzfeld M (2006) The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nature cell biology* 8:1432–1440. doi:10.1038/ncb1504
- Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP (2007) Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochimica et biophysica acta* 1773:8–16. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.005
- Yang I, Chang O, Lu Q, Kim K (2010) Delta-catenin affects the localization and stability of p120-catenin by competitively interacting with E-cadherin. *Molecules and cells* 29:233–237. doi:10.1007/s10059-010-0030-2
- Yap AS, Niessen CM, Gumbiner BM (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *The Journal of cell biology* 141:779–789
- Yuan L, Seong E, Beuscher JL, Arikath J (2015) δ -Catenin Regulates Spine Architecture via Cadherin and PDZ-dependent Interactions. *The Journal of biological chemistry* 290:10947–10957. doi:10.1074/jbc.M114.632679
- Zatloukal K, Roth J, Denk H (2008) Zell-und Gewebereaktionen. In: Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, Böcker-Denk-Heitz-Moch (Hrsg) *Pathologie*. Elsevier Urban & Fischer, München, S 35–72
- Zhang J-Y, Wang Y, Di Zhang, Yang Z-Q, Dong X-J, Jiang G-Y, Zhang P-X, Dai S-D, Dong Q-Z, Han Y, Zhang S, Cui Q-Z, Wang E-H (2010) delta-Catenin promotes malignant phenotype of non-small cell lung cancer by non-competitive binding to E-cadherin with p120ctn in cytoplasm. *The Journal of pathology* 222:76–88. doi:10.1002/path.2742

Zhang J-Y, Di Zhang, Wang E-H (2013) Overexpression of small GTPases directly correlates with expression of delta-catenin and their coexpression predicts a poor clinical outcome in nonsmall cell lung cancer. *Molecular carcinogenesis* 52:338–347. doi:10.1002/mc.21854

Zhao H, Di Zhang, Yang L, Wang E (2018) p0071 interacts with E-cadherin in the cytoplasm so as to promote the invasion and metastasis of non-small cell lung cancer. *Molecular carcinogenesis* 57:89–96. doi:10.1002/mc.22734

Zhou J, Liyanage U, Medina M, Ho C, Simmons AD, Lovett M, Kosik KS (1997) Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport* 8:2085–2090

8 THESEN

1. P0071, p120 und NPRAP sind Bestandteile von *Adherens junctions*.
2. E-Cadherin bildet Proteinkomplexe mit p0071, p120 und NPRAP.
3. In *Adherens junctions* existieren verschiedene Cadherin-Catenin-Komplexe.
4. P0071, p120 und NPRAP stabilisieren E-Cadherin an der Zellmembran und haben damit Einfluss auf die Stabilität des Cadherin-Catenin-Komplexes.
5. P0071, p120 und NPRAP haben unterschiedliche Funktionen in *Adherens junctions*, die sich nicht gegenseitig ersetzen können.
6. Der Verlust von p120 resultiert in Internalisierung und Degradierung von E-Cadherin und β -Catenin.
7. Der Verlust von p0071 oder NPRAP resultiert in Internalisierung – ohne Degradierung – von E-Cadherin.
8. P0071 fördert die Zellproliferation und -migration.
9. NPRAP und p0071 beeinflussen sich gegenseitig und könnten unabhängig von p120 mit E-Cadherin interagieren.
10. NPRAP und p0071 beeinflussen sich gegenseitig und könnten unabhängig von E-Cadherin miteinander interagieren.

9 ANLAGEN

9.1 Ergänzende Darstellungen

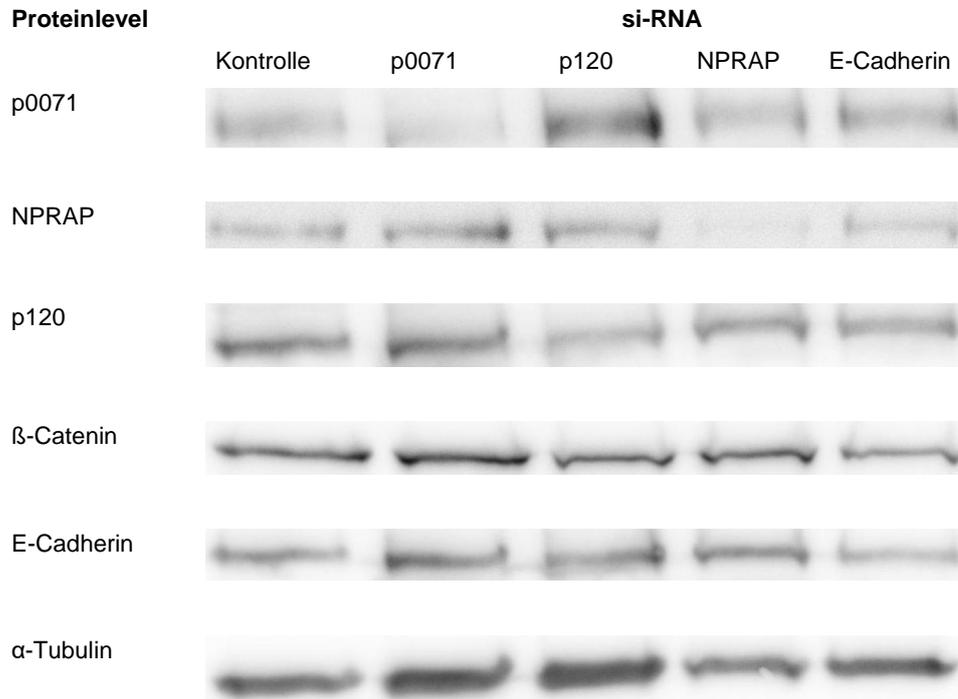


Abbildung 36: Western-Blot-Membranen nach *knockdown* von p0071, p120 und NPRAP

MCF-7-Zellen wurden mit Kontroll-si-RNA, p0071-si-RNA, p120-si-RNA, NPRAP-si-RNA und E-Cadherin-si-RNA (in Auswertung nicht dargestellt) transfiziert. Die Proteinisolation erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen, Anti-p120-Maus, Anti-NPRAP-Maus, Anti-E-Cadherin-Maus, Anti- β -Catenin-Maus und Anti-Tubulin-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden HRP-markierte Sekundärantikörper verwendet. Als interner Standard wurde Tubulin mitgeführt. Die Gesamtproteinmenge wurde mit der jeweiligen Tubulinmenge abgeglichen. Die Gesamtproteinmenge der Kontrolle entspricht 100 %. Dargestellt sind die Membranen zu den Abb. 25 und 26 im Ergebnisteil.

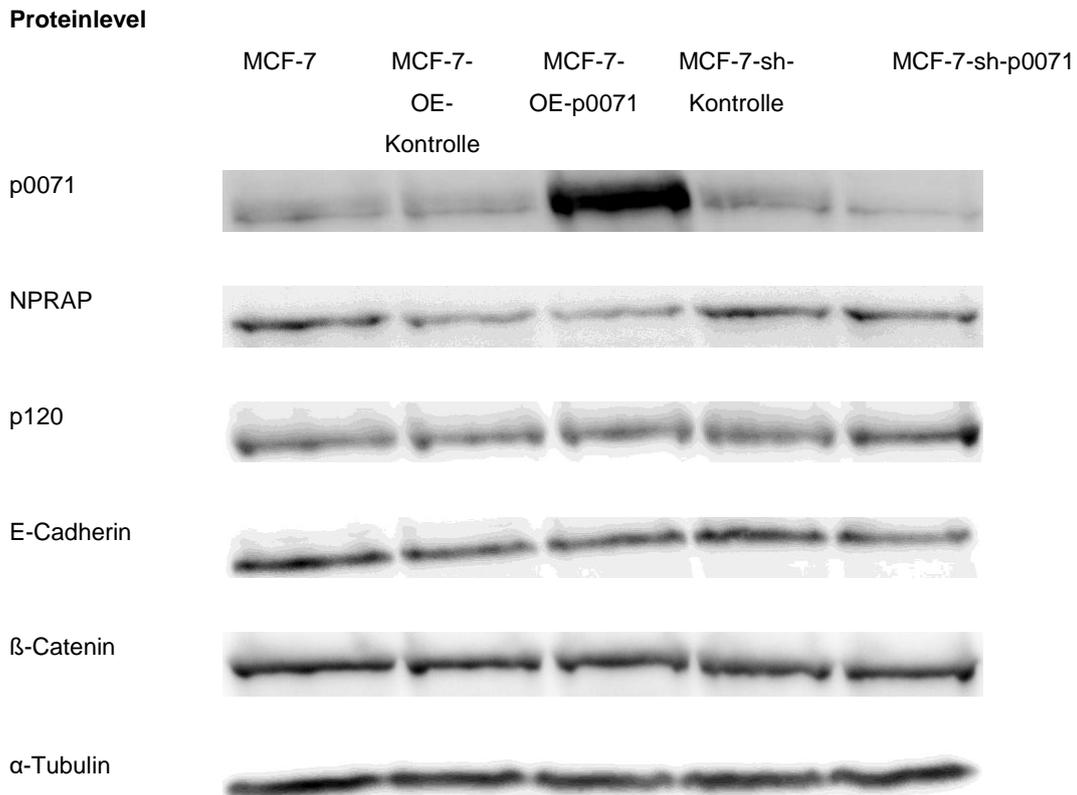


Abbildung 37: Western Blot Membranen der Zelllinie MCF-7-OE-Kontrolle und MCF-7-OE-p0071
 Gesamtproteinmengen von p0071, NPRAP, p120, E-Cadherin und β-Catenin in den Zelllinien MCF-7-OE-Kontrolle und MCF-7-OE-p0071. Die Proteinisolierung, SDS-PAGE und Western Blot erfolgten 24 Stunden nach der Einsaat. Als Primärantikörper wurden Anti-p0071-Tail#10-Meerschweinchen, Anti-p120-Maus, Anti-NPRAP-Maus, Anti-E-Cadherin-Maus, Anti-β-Catenin-Maus und Anti-Tubulin-Maus verwendet. Für die Detektion der Proteine wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper verwendet.
 Als interner Standard wurde α-Tubulin mitgeführt. Die Gesamtproteinmenge wurde mit der jeweiligen Tubulinmenge abgeglichen. Die Gesamtproteinmenge der Zelllinie MCF-7-OE-Kontrolle entspricht 100 %. Dargestellt sind die Membranen zu den Abb. 31 und 32 im Ergebnisteil.
 In dieser Darstellung der Membranen sind weiterhin MCF-7, MCF-7-sh-Kontrolle und MCF-7-sh-p0071. Diese Auswertungen sind im Ergebnisteil nicht dargestellt.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Epithelial-mesenchymale Transition (schematisch, modifiziert nach Kalluri und Weinberg, 2009, S. 1421).....	4
Abbildung 2: Übersicht über verschiedene Zellkontakte (schematisch)	5
Abbildung 3: Aufbau von E-Cadherin und Interaktion mit assoziierten Proteinen (schematisch, modifiziert nach van Roy und Berx, 2008, S. 3759 - 3760)	7
Abbildung 4: Aufbau desmosomaler Cadherine und Interaktion mit assoziierten Proteinen (schematisch, modifiziert nach Kowalczyk und Green, 2013, S. 18 - 19).....	9
Abbildung 5: Armadillo-Proteine (schematisch, modifiziert nach Bass-Zubek et al. 2009, S. 11)	10
Abbildung 6: ‚Wundheilungs-Assay‘	20
Abbildung 7: Ko-Lokalisation von E-Cadherin und p120 (A), p0071 (B) und NPRAP (C) in nativen MCF-7-Zellen	23

Abbildung 8: Co-Lokalisation von p0071 und NPRAP (D), p0071 und p120 (E) und NPRAP und p120 (F) in nativen MCF-7-Zellen.....	24
Abbildung 9: Co-Lokalisation von Desmoplakin und p120 (G), p0071 (H) und NPRAP (I) in nativen MCF-7-Zellen.....	25
Abbildung 10: Nachweis der gemeinsamen Präzipitation von E-Cadherin, β -Catenin, NPRAP, p120 und p0071	27
Abbildung 11: Nachweis der gemeinsamen Präzipitation von p0071, β -Catenin, E-Cadherin und NPRAP	27
Abbildung 12: Nachweis der gemeinsamen Präzipitation von p120, β -Catenin und E-Cadherin	28
Abbildung 13: E-Cadherin bildet verschiedene Proteinkomplexe mit den p120-Cateninen.....	29
Abbildung 14: Reaktion von E-Cadherin auf eine verminderte Expression von p0071 .	31
Abbildung 15: Reaktion von NPRAP auf eine verminderte Expression von p0071	32
Abbildung 16: Reaktion von p120 auf eine verminderte Expression von p0071.....	32
Abbildung 17: Reaktion von Desmoplakin auf eine verminderte Expression von p0071	33
Abbildung 18: Reaktion von E-Cadherin auf eine verminderte Expression von p120...34	34
Abbildung 19: Reaktion von NPRAP auf eine verminderte Expression von p120	34
Abbildung 20: Reaktion von p0071 auf eine verminderte Expression von p120.....	35
Abbildung 21: Reaktion von Desmoplakin auf eine verminderte Expression von p120	35
Abbildung 22: Reaktion von E-Cadherin auf eine verminderte Expression von NPRAP	36
Abbildung 23: Reaktion von p0071 auf eine verminderte Expression von NPRAP	37
Abbildung 24: Reaktion von p120 auf eine verminderte Expression von NPRAP	37
Abbildung 25: Reaktion von Desmoplakin auf eine verminderte Expression von NPRAP	38
Abbildung 26: Kontrollen der si-RNA-Transfektion im Western Blot.....	40
Abbildung 27: Proteinmengen nach selektivem <i>knockdown</i> von p0071, p120 und NPRAP.....	41
Abbildung 28: Reaktion von E-Cadherin auf die Überexpression von p0071	44
Abbildung 29: Reaktion von Desmoplakin auf die Überexpression von p0071.....	44
Abbildung 30: Reaktion von p120 auf die Überexpression von p0071	45
Abbildung 31: Reaktion von NPRAP auf die Überexpression von p0071	45
Abbildung 32: Kontrolle der Überexpression von p0071 im Western Blot	46
Abbildung 33: Proteinmengen nach Überexpression von p0071	46

Abbildung 34: Zellproliferation und -migration nach Überexpression von p0071 im ‚Wundheilungs-Assay‘	48
Abbildung 35: Methodisches Prinzip und Möglichkeit der Fehlinterpretation der Immunfluoreszenz	51
Abbildung 36: Western-Blot-Membranen nach <i>knockdown</i> von p0071, p120 und NPRAP	72
Abbildung 37: Western Blot Membranen der Zelllinie MCF-7-OE-Kontrolle und MCF-7-OE-p0071.....	73

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterscheidung zwischen benignen und malignen Tumoren (modifiziert nach Böcker et al., 2008, S. 168)	2
Tabelle 2: Beispiele für Onkogene und ihre Funktionen (modifiziert nach Böcker et al., 2008, S. 184).....	2
Tabelle 3: Übersicht über die wichtigsten Zellkontakte und deren assoziierte Proteine (modifiziert nach Franke, 2009, S. 2).....	6
Tabelle 4: Verwendete Puffer	15
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper	15
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz	15
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot	16
Tabelle 8: Verwendete si-RNA	16
Tabelle 9: Verwendete Geräte.....	16
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien.....	16
Tabelle 11: Übersicht über die Veränderungen der Proteinmengen im Western Blot nach <i>knockdown</i> von p0071, p120 und NPRAP	42

10 ANHANG

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld und Herrn Dr. René Keil für die exzellente Betreuung bei der Anfertigung der Laborarbeit und der Dissertation. Vielen Dank für die ausführliche und kompetente Beantwortung all meiner Fragen (ob persönlich oder per E-Mail) im Rekordtempo!

11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich, Babett Frommann, erkläre ehrenwörtlich, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von Armadillo Proteinen in *Adherens junctions*“ unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Hatzfeld selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertationsschrift aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen Universität/anderen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

Babett Frommann Halle/Saale, 10.09.2019