

**Molekulare Analysen
des *armadillo repeat* Proteins mARVCF**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Zoe Waibler
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2002
(D F 1)

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

Dekan:.....

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

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn

Datum der Disputation: 28. November 2002



für Stefan

Danksagung

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich bedanken für Unterstützung, geduldiges Ausharren und Anteilnahme.

Ein großes Dankeschön geht an die Leute, die die 3½ Jahre im Labor angenehm gemacht haben: Carsten, Richard, Nonni und natürlich Andi. Und außerdem an...

... Beata und Sanita, für die in diesem Labor manchmal unerlässliche weibliche Unterstützung und Solidarität. Und an Christine, für das weltbeste *Catering*.

... Frank, für Geduld und Ruhe und einen sehr großzügigen *hardware home service*.

So Bernd, nun zu Dir: soll ich mich bei Dir überhaupt bedanken, oder sollte ich Dich viel eher verfluchen, weil...!? Egal wie – das meiste, was ich „an der *bench*“ gelernt habe, hast Du mir beigebracht; und dafür vielen Dank. Nicht zuletzt auch Danke dafür, daß Du mit der Zeit gelernt hast, an den richtigen Stellen „Hmm“ zu machen, wenn sich wütende und empörte Redeschwalle über Dir ergießen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Cadherine	1
1.1.1 Aufbau und Struktur der Cadherine	1
1.1.2 M-Cadherin und Myogenese	3
1.2 Cadherine und Catenine	4
1.2.1 <i>armadillo repeat</i> Proteine	5
1.2.2 p120(ctn)-verwandte Proteine	6
1.2.2.1 p120(ctn)	6
1.2.2.2 ARVCF	9
1.3 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeit und Ziel der Arbeit	11
2. Material	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Lösungen und Puffer	12
2.3 Enzyme	16
2.4 Bakterienstämme	16
2.5 Zelllinien	17
2.6 Größenmarker	17
2.7 Oligonucleotide (<i>Primer</i>)	17
2.8 Plasmide	19
2.9 Zugriffsnummern für Nucleotidsequenzen (<i>accession number</i>)	19
2.10 Antikörper	20
2.11 <i>Kits</i> und Transfectionsreagenzien	21
2.12 Geräte	21
2.13 Verbrauchsmaterial	22
3. Methoden	24
3.1 Fällung von Nucleinsäuren	24
3.2 Reinigung von Nucleinsäuren	24
3.3 Photometrische Bestimmung von Nucleinsäure-Konzentrationen	24
3.4 Photometrische Bestimmung von Protein-Konzentrationen	25
3.5 Präparation von Plasmid-DNA	25

3.6	Gelelektrophorese	25
3.6.1	Native Gelelektrophorese	25
3.6.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	26
3.7	Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	26
3.8	Autoradiographie (Fluorographie)	26
3.9	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	27
3.10	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen	27
3.11	Anlegen eines Glycerolstockes	27
3.12	Enzymkatalysierte Modifikationen von DNA	27
3.13	Synthese einzelsträngiger cDNA (Reverse Transkription)	28
3.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.15	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	30
3.16	Arbeiten mit Zellkulturen	30
3.17	Kulturbedingungen für eukaryotische Zellen	31
3.18	Lagerung von Zellen	31
3.19	Passagieren von Zellen	31
3.20	Induzieren von Zellen zur Fusion	31
3.21	Auftauen von Zellen	32
3.22	Einfrieren von Zellen	32
3.23	Immunfluoreszenz	32
3.24	Herstellung von Ganzzellextrakten	33
3.25	Immunpräzipitation	33
3.26	Western blot	34
3.27	Proteinnachweis mit Antikörpern	34
3.28	<i>In vitro</i> GST-binding assay (Pull-down-Experimente)	35
3.28.1	Expression rekombinanter Proteine in Bakterien	35
3.28.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	35
3.28.3	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	36
3.28.4	Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase-Systems	36
4.	Ergebnisse	38
4.1	Überprüfung der Funktionalität von putativem NLS und NES	38
4.1.1	NES (<i>nuclear export signal</i>)	40
4.1.2	NLS (<i>nuclear import signal</i>)	42
4.2	Clonierung und Charakterisierung der mARVCF Splice-Varianten	46

4.2.1	Expression muriner ARVCF mRNA	46
4.2.2	Clonierung und Charakterisierung der mARVCF Splice-Varianten	49
4.2.3	Einfluß des zellulären Kontexts auf die Lokalisation der mARVCF Splice-Varianten	50
4.2.4	Unterschiedliche Interaktion von mARVCF mit E-, M- und N-Cadherin	53
4.3	Assoziation von mARVCF mit dem LIM- <i>only</i> Protein FHL2	60
4.3.1	Identifizierung von FHL2 als potentieller Interaktionspartner der CPD von M-Cadherin	60
4.3.2	mARVCF bindet direkt an FHL2	61
4.3.3	mARVCF transloziert FHL2 aus den Fokalkontakten zum Cadherin-Catenin Komplex an der Plasmamembran	62
4.3.4	Charakterisierung der mARVCF Bindungsdomäne in FHL2	66
4.4	Clonierungen	68
 5. Diskussion		73
5.1	Überprüfung der Funktionalität von putativem NLS und NES	73
5.2	Clonierung und Charakterisierung der mARVCF Splice-Varianten	76
5.3	Assoziation von mARVCF mit dem LIM- <i>only</i> Protein FHL2	79
 6. Zusammenfassung		82
 7. Abkürzungsverzeichnis		83
 8. Literaturverzeichnis		85

1. Einleitung

1.1 Cadherine

Cadherine sind eine Familie transmembraner Glycoproteine, die über ihre extrazelluläre Domäne homophile Wechselwirkungen eingehen und somit Zelladhäsion und Zell-Zell-Erkennung vermitteln. Da diese Vorgänge grundlegend für die Organogenese und den Zusammenhalt der entstandenen Gewebe sind, bezeichnet man Cadherine auch als morphoregulatorische Moleküle (Takeichi, 1991). Die von Cadherinen vermittelte Zelladhäsion ist Ca^{2+} -abhängig; ohne Calcium kommt es zu einer Konformationsänderung der Cadherine und sie werden in Folge proteolytisch abgebaut (Ringwald et al., 1987; Takeichi 1991; Geiger und Aylon 1992; Huber et al., 1996).

Da die Expression der Cadherine gewebe- und entwicklungspezifisch ist, wurden die ersten klassischen Cadherine nach den Geweben benannt, aus denen sie isoliert wurden: E-Cadherin (Uvomorulin) wurde als epitheliales Cadherin charakterisiert und ist an der Polarisierung von Epithelzellen (McNeill et al., 1990) und der Kompaktation von Präimplantationsembryonen beteiligt (Vestber und Kemler, 1985; Larue et al., 1994). Weiterhin wird ihm eine Funktion als Tumorsuppressormolekül zugeschrieben (Takeichi, 1993; Birchmeier und Behrens, 1994; Mareel et al., 1994). Neuronales (N-) Cadherin wird in neuronalen, mesodermalen und endothelialen Zellen exprimiert (Reid und Hemperly, 1990; Detrick et al., 1990; Liaw et al., 1990; Benson und Tanaka 1998). Aus Zellen der Plazenta wurde P-Cadherin isoliert (Nose et al., 1987; Shimoyama et al., 1989). M-cadherin, welches für myotomale Zellen charakteristisch ist, wird in Abschnitt 1.1.2 beschrieben.

1.1.1 Aufbau und Struktur der Cadherine

Alle klassischen Cadherine werden als Vorläufermoleküle mit N-terminalem Signal- und Propeptid synthetisiert, welche dann abgespalten werden. Diese Reifung der Proteine ist notwendig, um aktive, adhäsions-kompetente Moleküle zu erhalten (Ozawa und Kemler, 1990). Nach Abspaltung von Signal- und Propeptid bestehen die prozessierten Cadherine aus ca. 740 Aminosäuren (AS) und weisen damit ein

Molekulargewicht zwischen 120 und 130 kDa auf. Das reife Protein kann in drei Domänen unterteilt werden: Die N-terminal gelegene extrazelluläre (EC) Domäne, eine kurze Transmembranregion und die C-terminal lokalisierte cytoplasmatische Domäne (vgl. Abb. 1.1).

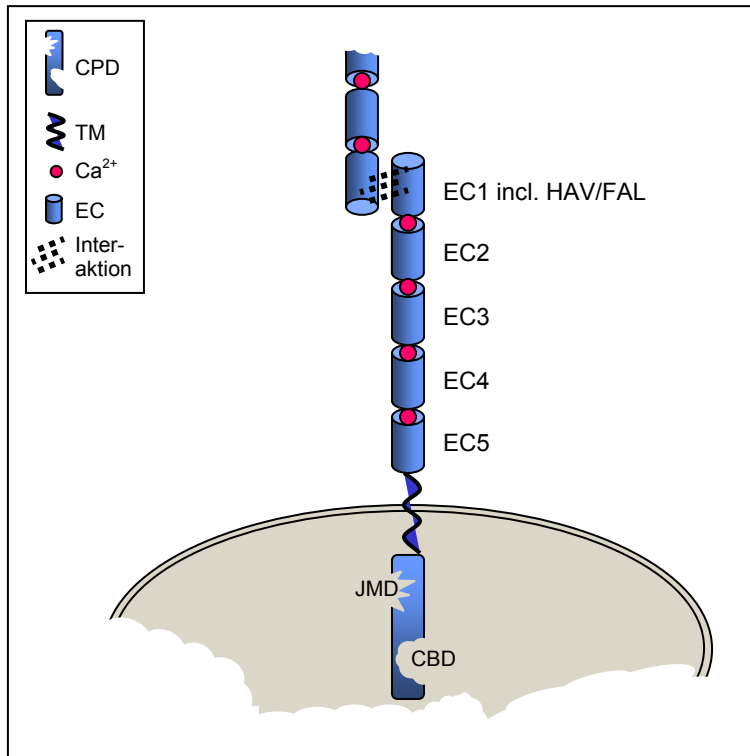


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der klassischen Cadherine. (CBD: *catenin binding domain*; CPD: cytoplasmatische Domäne; EC: extrazelluläre Subdomäne; JMD: juxtamembran Domäne; TM: transmembran Region).

Im extrazellulären Bereich können fünf Subdomänen, EC1 bis EC5, unterschieden werden, wovon jede aus etwa 110 AS besteht. Zwischen diesen EC-Bereichen lokalisieren die Ca²⁺-Bindestellen. Die N-terminal gelegene EC1 beinhaltet die Erkennungs- und Bindemotive (in der Regel ein HAV-Tripeptid), die für die Adhäsionsfunktion der Cadherine von Bedeutung sind (Nose et al., 1990) und die homophile Wechselwirkung der Zelladhäsionsmoleküle ermöglicht. Zusätzlich zu der so vermittelten *trans*-Interaktion (Interaktion zwischen Cadherinen benachbarter Zellen) sind Cadherine auch in der Lage, sog. *cis*-Dimere zu bilden (Interaktion zwischen Cadherinen der selben Zelle). Dabei scheint diese Ca²⁺-abhängige Dimerisierung notwendige Voraussetzung für eine folgende *trans*-Interaktion zu sein (Chothia und Jones, 1997; Tamura et al., 1998; Humphries et al., 1998; Steinberg und McNutt 1999; Takeda et al., 1999). Die ursprüngliche Annahme, eine *cis*-Dimerisierung finde nur zwischen Cadherinen des gleichen Typs statt, wurde durch

Untersuchungen widerlegt, bei denen *cis*-Heterodimere zwischen N- und R-Cadherin nachgewiesen werden konnten (Shan et al., 2000).

Die cytoplasmatische Domäne (CPD) der Cadherine weist eine Größe von 150 bis 160 AS auf und ist für die Interaktion der Cadherine mit den intrazellulären Cateninen bzw. *armadillo repeat* Proteinen verantwortlich.

1.1.2 M-Cadherin und Myogenese

Muskuläres (M-) Cadherin wurde 1991 aus einer cDNA-Bank von C2C12 Zellen isoliert (Donalies et al., 1991). Es besteht, wie die klassischen Cadherine, aus den drei Bereichen extracelluläre Domäne, Transmembranregion und cytoplasmatische Domäne und ist somit zu einer Calcium-abhängigen (Eng et al., 1997), homophilen Wechselwirkung fähig. Im Unterschied zu den klassischen Cadherinen weist M-Cadherin an Stelle des HAV-Tripeptides in der EC1 ein FAL-Motiv auf. Das M-Cadherin-Gen konnte bei der Maus auf Chromosom 8 lokalisiert werden; beim Mensch liegt das Homolog auf 16q (Kaupmann et al., 1992). Die murine genomische DNA beinhaltet 14 Exons und überspannt einen Bereich von 19,5 kb.

Die Expression von M-Cadherin ist, wie die anderer Cadherine, entwicklungs- und gewebespezifisch. Am Tag E10^{1/3} der Embryonalentwicklung der Maus ist M-Cadherin auf der Oberfläche myotomaler Zellen nachzuweisen (Rose et al., 1994). Im adulten Organismus ist das Molekül zwischen Sarcolemma und Plasmamembran bzw. Myotube und Satellitenzelle lokalisiert (Bornemann und Schmalbruch, 1994). In einer speziellen Form von Adhäsionsverbindungen (*Contactus adherens*) in den Glomeruli des Cerebellums konnte M-Cadherin ebenfalls nachgewiesen werden (Rose et al., 1995). Während der Fusion von einkernigen Myoblasten zu vielkernigen Myotuben in Zellkultur wird M-Cadherin über einen Zeitraum von 72 erst hoch, und in fusionierten Myotuben wieder herunter reguliert (Donalies et al., 1991; Kuch et al., 1997). Im regenerierenden Skelettmuskel konnte eine vergleichbare Regulation der Expression dargestellt werden: Nach einer Verletzung kommt es zu einer verstärkten Expression von M-Cadherin (Moor und Walsh, 1993), die nach Regeneration des Muskelgewebes wieder abnimmt (Irintchev et al., 1994).

Die wahrscheinliche Beteiligung von M-Cadherin an Prozessen der Myogenese wurde durch Experimente mit antagonistischen M-Cadherin Peptiden und solchen mit *antisense* mRNA unterstrichen (Zeschnigk et al., 1995). Außerdem ist es möglich,

die Expression von M-Cadherin durch 5-Bromo-2'-Desoxyuridin zu inhibieren, ein Agens, welches selektiv die Skelettmuskel-Differenzierung verhindert (Pouliot et al., 1994).

Wie andere Cadherine ist auch M-Cadherin in der Lage, über seine cytoplasmatische Domäne mit den intracellulären Cateninen zu interagieren (Kuch et al., 1997). Beta-Catenin oder Plakoglobin können an die der Membran ferneren CBD der CPD binden und so, über α -Catenin, den M-Cadherin-Catenin Komplex an das Cytoskelett anbinden. Im Gegensatz dazu binden p120(ctn) und ARVCF an die Membran proximale Domäne (Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000).

1.2 Cadherine und Catenine

Cadherine bilden über ihre cytoplasmatische Domäne Komplexe mit den intrazellulären Cateninen (*Lat.* catena: Kette), welche in der Lage sind, diesen Cadherin-Catenin Komplex an das Cytoskelett anzubinden. Zusätzlich zur bereits beschriebenen homophilen Wechselwirkung der Cadherine, ist diese Anbindung des Komplexes an das Cytoskelett unerlässlich für die Ausbildung einer starken Zell-Zell Adhäsion. Um die Verbindung der Cadherine an Komponenten des Cytoskeletts zu ermöglichen, gehen die Zelladhäsionsmoleküle zwei verschiedene Komplexe ein: Entweder mit β -Catenin oder mit Plakoglobin (γ -Catenin), die sich in diesem Komplex dabei gegenseitig ausschließen (Ozawa et al., 1989; Hirano et al., 1992; Aberle et al., 1994; Butz and Kemler, 1994; Hinck et al., 1994; Näthke et al., 1994; Knudsen et al., 1995; Hertig et al., 1996; Kuch et al., 1997; Finnemann et al., 1997; Yap et al., 1998; Allport et al., 2000).

Beide klassischen Catenine, die an eine der Membran ferne Region der CPD binden (*catenin binding domain*: CBD), sind wiederum in der Lage, mit α -Catenin zu assoziieren. Alpha-Catenin interagiert einerseits mit Actin selbst, kann aber auch mit einer Vielzahl von Actin-bindenden Proteinen, darunter α -Actinin, Vinculin und ZO-1 wechselwirken (Knudsen et al., 1995; Rimm et al., 1995; Watabe-Uchida et al., 1998; Imamura et al., 1999).

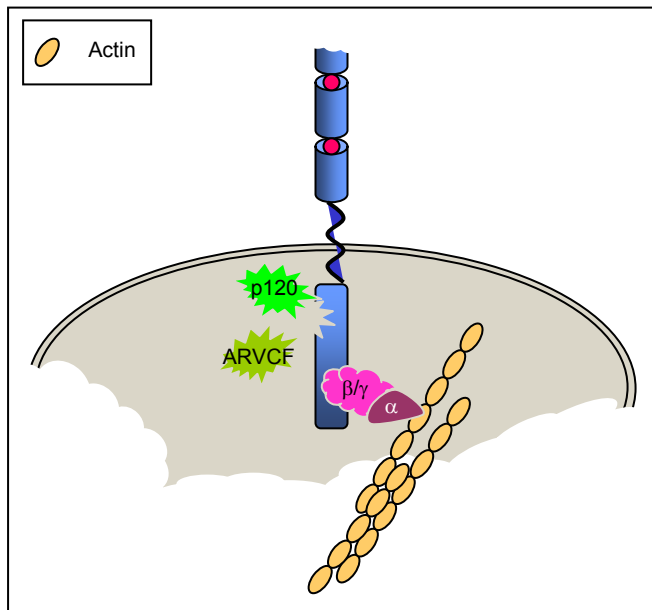


Abb. 1.2: Schematische Darstellung einiger möglicher Interaktionen an der cytoplasmatischen Domäne der Cadherine. (β/γ : β - bzw. γ -Catenin; α : α -Catenin).

Im Gegensatz zu β -Catenin oder Plakoglobin binden die Proteine p120(ctn) und ARVCF an die sog. juxtamembrane Domäne (JMD) der CPD. Auch diese beiden Moleküle scheinen sich bei ihrer Bindung an die Cadherine (beschrieben für E-Cadherin) gegenseitig auszuschließen (Mariner et al., 2000; Anastasiadis und Reynolds, 2000). Auf die Familie der *armadillo repeat* Proteine, insbesondere p120(ctn) und ARVCF, wird in Abschnitt 1.2.2 eingegangen.

1.2.1 *armadillo repeat* Proteine

Das *armadillo repeat* Proteinmotiv wurde ursprünglich im *Drosophila* Segmentpolaritätsgen *armadillo* identifiziert (Wieschaus und Riggemann, 1987; Peifer und Wieschaus, 1990; Peifer et al., 1994) und besteht aus einer imperfekten Wiederholung von 42 AS, die zusammen eine positiv geladene Furche bilden (Riggemann et al., 1989). Für β -Catenin konnte anhand von Kristall-Struktur-Analysen gezeigt werden, daß über diese Furche mit überwiegend positiv geladenen AS, vermutlich die Interaktion mit der sauren CBD der Cadherine stattfindet (Huber et al., 1997). Die Assoziation der *armadillo repeat* Proteine Plakoglobin (Sacco et al., 1995; Cowin und Burke, 1996), p120(ctn) (Daniel und Reynolds, 1995) oder mARVCF (Kaufmann et al., 2000) mit den Cadherinen findet ebenfalls über die *armadillo repeats* statt.

Hatzfeld und Nachtshiem haben eine Untergliederung der Gruppe der *armadillo repeat* Proteine vorgenommen, die in der gängigen Literatur weitgehend akzeptiert und übernommen worden ist (Abb. 1.3).

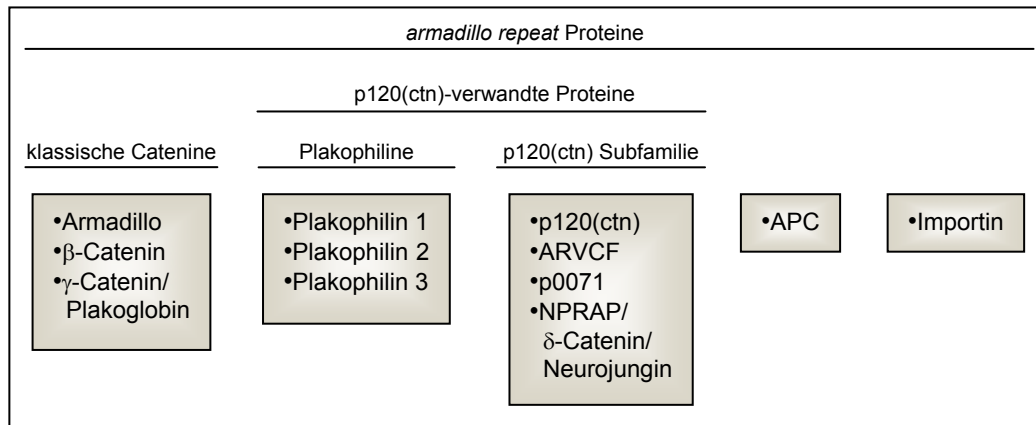


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Gruppierung der *armadillo repeat* Proteine in Unterfamilien. (Verändert nach Hatzfeld und Nachtshiem, 1996).

Mitglieder einer Untergruppe zeigen dabei höhere Sequenzhomologien und eine identische Anzahl und Organisation der *armadillo* Motive. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeiten werden für die jeweiligen Proteine auch funktionelle Gemeinsamkeiten postuliert (Hatzfeld und Nachtshiem, 1996). Als weiteres Kriterium zur Klassifizierung der *armadillo repeat* Proteine wird inzwischen auch das Vorhandensein von Splice-Varianten herangezogen.

1.2.2 p120(ctn)-verwandte Proteine

Mitglieder der Gruppe der p120(ctn)-verwandten Proteine zeigen Gemeinsamkeiten in der strukturellen Organisation ihrer *armadillo repeat* Region, was auf eine enge evolutive Verwandtschaft schließen lässt. Innerhalb der p120(ctn)-verwandten Proteine lassen sich zwei Subfamilien, Plakophiline und die p120(ctn) Subfamilie, ausmachen, die sich sowohl im Grad ihrer Ähnlichkeit zu p120(ctn), als auch der subzellulären Lokalisation der Proteine unterscheiden.

Die p120(ctn) Subfamilie umfaßt neben p120(ctn) selbst (Reynolds et al., 1989), die Proteine ARVCF (*armadillo repeat gene deleted in velo cardio facial syndrome*; Sirotkin et al., 1997), NPRAP/ δ -Catenin/Neurojungin (*neural plakophilin-related Armadillo protein*; Pfaffenholz und Franke, 1997; Zhou et al., 1997) und p0071

(Hatzfeld und Nachtshiem, 1996). Diese Moleküle weisen eine Identität von über 45% ihrer *armadillo repeat* Region auf und binden (möglicherweise mit Ausnahme von p0071) an die klassischen Cadherine in den *adherens junctions* (Lu et al., 1999; Paffenholz et al., 1999; Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000). Daneben zeigen alle Moleküle auch eine Lokalisation im Zellkern, was als Hinweis auf eine mögliche Funktion als Signalüberträger zwischen Zell *junctions* und Zellkern gewertet wird (Mertens et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Bonne et al., 1999; Van Hengel et al., 1999; Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000). Alle Mitglieder der p120(ctn) Subfamilie verfügen über 10 *armadillo repeats* mit Unterbrechungen dieser Struktur in *repeat* 4, 6 und 9. Diese Unterbrechungen stellen vermutlich sog. *looped-out* Strukturen da, wie sie anhand von Kristall-Struktur-Analysen bei β -Catenin identifiziert wurden (Huber et al., 1997). In einem solchen *loop* in *armadillo repeat* 6 weisen alle Proteine der Subfamilie ein Motiv auf, welches als NLS (*nuclear localisation signal*) beschrieben ist. Im N-Terminus weisen ARVCF, p120(ctn), p0071 und NPRAP/ δ -Catenin/Neurojungin ein hochkonserviertes Proteinmotiv, die *coiled-coil* Domäne auf, welches generell für die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen verantwortlich ist. Am C-terminalen Ende exprimieren ARVCF, NPRAP/ δ -Catenin/Neurojungin und p0071, nicht jedoch p120(ctn), die konservierte Protein-Sequenz DSWV, wobei es sich um ein PDZ-Bindemotiv handelt (Typl; Fanning und Anderson, 1998).

Im Gegensatz zur p120(ctn) Subfamilie werden die Plakophiline über ihren N-Terminus in die Desmosomen eingebunden, wo sie die Intermediär Filamente koordinieren (Hatzfeld et al., 1994; Heid et al., 1994; Mertens et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Smith und Fuchs, 1998; Bonne et al., 1999; Kowalczyk et al., 1999; Schmidt et al., 1999).

1.2.2.1 p120(ctn)

p120(ctn) wurde ursprünglich als Substrat der oncogenen Src Kinase identifiziert (Reynolds et al., 1989) und deshalb als p120CAS (für: *cadherin-associated Src substrate*) bezeichnet. Die Namen p120(ctn) (für: *catenin*; Reynolds et al., 1997), sowie p120 (ohne Zusatz) bezeichnen das selbe Protein.

Wie es für die Subfamilie charakteristisch ist, wird auch p120(ctn) in verschiedenen Isoformen exprimiert. N-Terminal führt dieses alternative Splicen zu 4 verschiedenen ATG Startcondons, wobei nur Isoform 1 für die *coiled-coil* Domäne codiert. In *armadillo repeat 6* verändert das 18 Basenpaare lange Exon C das putative NLS; im C-Terminus lokalisieren zwei weitere alternative Exons A und B (Keirsebilck et al., 1998). Dabei codiert Exon B, nahe dem C-Terminus von humanem p120(ctn), für ein funktionelles NES (*nuclear export signal*). Mutation zweier für dieses Proteinmotiv charakteristischer Leuzine zu Alaninen, oder die Behandlung von Zellen mit Leptomycin B, einem den Proteinexport inhibierendem Agens, führt zu einem erhöhten Level von kernständigem p120(ctn) (van Hengel et al., 1999).

Wie bereits erwähnt, zeigt p120(ctn) eine duale Lokalisation im Zellkern und an der Membran. Im Kern assoziiert es mit Kaiso, einem Transkriptionsfaktor der POZ/ZF (*Pox virus and zinc finger*) Superfamilie (Daniel und Reynolds, 1999). An der Membran stellt p120(ctn) einen Interaktionspartner der JMD der cytoplasmatischen Domäne der Cadherine dar (Reynolds et al., 1994; Daniel und Reynolds, 1995; Staddon et al., 1995; Shibamoto et al., 1995). Außerdem scheint p120(ctn) eine wichtige Rolle bei der Regulation der kleinen GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 zu spielen, die wiederum für die Etablierung von Cadherin-abhängigen Zell-Zell Kontakten notwendig sind (Braga et al., 1997). Dabei ist p120(ctn) in der Lage, RhoA zu inhibieren (Anastasiadis et al., 2000; Noren et al., 2000) und Rac und Cdc42 zu aktivieren (Noren et al., 2000; Gosheva et al., 2001).

Im Folgenden soll nun die mögliche Funktion von p120(ctn) im Verband mit den Cadherinen an der Plasmamembran erläutert werden.

Die Rolle von p120(ctn) bei der durch Cadherine vermittelten Zelladhäsion stellt sich je nach Zelltyp, untersuchtem Cadherin und der Art der Cadherin-Wechselwirkung (*cis* oder *trans*) sehr unterschiedlich dar.

In einigen Zelltypen scheint p120(ctn) als Inhibitor der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion zu fungieren, da sowohl eine Deletion der JMD der Cadherine, als auch die Expression einer p120(ctn)-Mutante zur Aktivierung der Zelladhäsion führt (Aono et al., 1999; Ohkubo and Ozawa, 1999). In anderen Zellen scheinen die JMD und p120(ctn) einen positiven Effekt auf die Zelladhäsion zu haben. In einem Cadherin-

defizienten Zellsystem verhinderte die Expression einer E-cadherin Mutante (nicht mehr in der Lage p120(ctn) zu binden), im Gegensatz zu wild-Typ E-Cadherin, die Ausbildung starker Zell-Zelladhäsion in Zellkultur (Thoreson et al., 2000). Anastasiadis und Reynolds (2000) postulieren, daß die Induktion der Zelladhäsion, wie sie durch die JMD bzw. p120(ctn) vermittelt wird, auf der Fähigkeit von p120(ctn) beruht, zum sog. Cadherin *clustering* beizutragen, dem Gruppieren von Cadherinen beispielsweise an *adherens junctions*.

Neuere Untersuchungen führen allerdings zu der Vermutung, daß zwar die JMD der Cadherine, nicht aber zwangsläufig p120(ctn), die Funktion der Cadherine vermittelt. Zwei verschiedene N-Cadherin Konstrukte wurden in Mausembryonen injiziert: Eines, bei dem die gesamte JMD deletiert wurde und ein Zweites, bei dem ein AAA-Triplett in der JMD durch die AS GGG ersetzt wurde. Obwohl beide Konstrukte nicht mehr in der Lage sind p120(ctn) zu binden, zeigte nur das Konstrukt ohne die gesamte JMD, Effekte auf die Cadherin-vermittelte Myotomformation im Embryo (Horikawa and Takeichi, 2001).

1.2.2.2 ARVCF

Humanes ARVCF (*armadillo repeat gene deleted in velo cardio facial syndrome*) wurde ursprünglich bei einer Suche nach Genen identifiziert, die sich auf dem chromosomalen Locus 22q11 befinden (Sirotkin et al., 1997), da dieser Bereich bei Patienten mit Velo-Cardio-Facial Syndrom bzw. DiGeorge Syndrom häufig deletiert ist (Desmaze et al., 1993; Kelly et al., 1993; Morrow et al., 1995). Humanes und murines ARVCF (mARVCF) zeigen den für die p120(ctn) Subfamilie typischen Aufbau mit 10 *armadillo repeats* (für mARVCF nicht eindeutig geklärt) und der N-terminalen *coiled-coil* Region (Abb. 1.4).

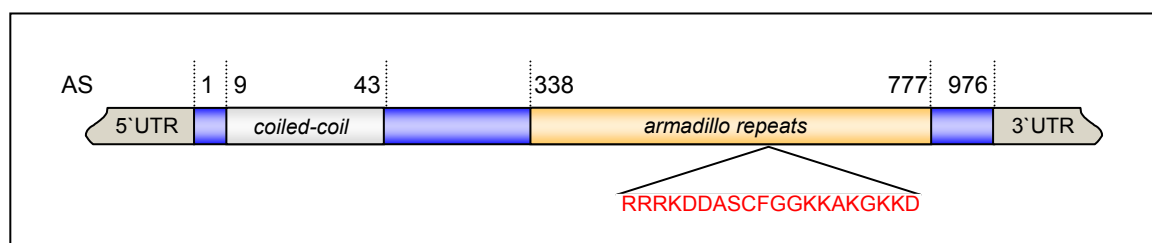


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des murinen ARVCF (Splice Variante FL-C11). Die Zahlen geben die AS an; die für das putative NLS codierenden AS sind in rot gekennzeichnet. (UTR: *untranslated region*).

Innerhalb der p120(ctn) Subfamilie zeigt ARVCF eine enge Verwandtschaft mit p120(ctn) selbst; neben einer Homologie von 56% der beiden *armadillo repeat* Regionen sind auch die Exon-Intron Grenzen beider Gene nahezu identisch (Keirsebilck et al., 1998), was auf eine sehr enge evolutive Verwandtschaft schließen läßt. Allerdings scheint der Expressionslevel beider Proteine unterschiedlich zu sein. Die Menge an exprimiertem ARVCF ist wesentlich geringer als die von p120(ctn) (Mariner et al., 2000), was mit Analysen der mRNA-Mengen von mARVCF übereinstimmt (Waibler, 1998).

Von humanem ARVCF sind verschiedene Splice-Varianten bekannt: Wie bei p120(ctn) kann die *coiled-coil* Domäne herausgespliced und ein alternatives Startcodon genutzt werden. Außerdem kann die putative NLS in *armadillo repeat 6* durch Insertion eines 18 Basenpaar langen Exons, vergleichbar mit Exon C in p120(ctn), modifiziert werden (Sirotkin et al., 1997). Das Protein scheint ubiquitär in Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Pankreas und Niere exprimiert zu werden. Weiterhin konnte mittels Southern blot Analysen gezeigt werden, daß ARVCF innerhalb der Spezies Hühnchen, *Drosophila*, Hamster, Maus und Schwein konserviert ist (Sirotkin et al., 1997).

Für humanes und murines ARVCF konnte sowohl eine Bindung an die JMD verschiedener Cadherine nachgewiesen werden, als auch die Lokalisation im Zellkern (Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000), wobei die Funktion von ARVCF bisher jedoch unklar ist.

1.3 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeit und Ziel der Arbeit

Murines ARVCF wurde beim Durchmustern einer cDNA Bank von i28 Mausmyoblasten (30 h zur Fusion induziert) mit Hilfe der cytoplasmatischen Domäne von M-Cadherin als Köder im Hefe-Zwei-Hybrid System identifiziert (Sterzel, 1997; Urbich, 1998). Die Interaktion zwischen dem *armadillo repeat* Protein und dem muskulären Cadherin wurde mittels Coimmunpräzipitation und dem MOM *recruitment assay in vivo*, und in *in vitro* GST-Interaktionsstudien verifiziert. Außerdem konnten die Domänen, die für eine solche Assoziation notwendig sind, charakterisiert werden (Kaufmann et al., 2000). Weiterhin wurden 2 N-terminale und 4 C-terminale Splice-Varianten des murinen ARVCF identifiziert und als Fragmente in den Vector pGEM®-T Easy cloniert (Schäfer, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die mARVCF Isoformen cloniert und hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und Interaktion mit den Cadherinen untersucht werden.

Im Hinblick auf die von p120(ctn) bekannten Daten bezüglich der dualen Lokalisation des Proteins im Zellkern und an der Plasmamembran (van Hengel et al., 1999) sollte ebenfalls untersucht werden, ob mARVCF einem regulierten Transport zwischen Kern und Membran unterliegt und welche Proteinmotive für einen möglichen Im- und Export des Moleküls verantwortlich sind.

Abschließend sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, in wieweit andere Proteine, die, wie mARVCF, ebenfalls als potentieller Interaktionspartner der CPD von M-Cadherin aus dem Hefe-Zwei-Hybrid *screen* (Sterzel, 1997; Urbich, 1998) hervorgegangen sind, mit mARVCF wechselwirken.

2. Material

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien in *p.a.*-Qualität von den folgenden Firmen bezogen:

Fa. Amersham-Pharmacia, Freiburg/Breisgau
 Fa. Roche, Mannheim (vormals Fa. Boehringer)
 Fa. Biorad, München
 Fa. Fluka Buchs Pharmacia LKB, Freiburg
 Fa. Merck Eurolab, Darmstadt
 Fa. Roth, Karlsruhe
 Fa. Serva Feinbiochemika, Heidelberg
 Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2 Lösungen und Puffer

Für das Ansetzen von Lösungen wurde Reinstwasser verwendet, das mit der Anlage „Milli-RO 17TS“ (Fa. Millipore, Eschborn) hergestellt wurde. Im folgenden wird dieses als H₂O bidest. (*Aqua bidestilata*) oder ddH₂O bezeichnet.

Zum Sterilisieren wurden hitzestabile Lösungen autoklaviert (20 min bei 121°C und 2,0 bar) und hitzeinstabile Lösungen sterilfiltriert (Sterilfilter: 0,22 µm Porenweite, Fa. Millipore).

Zur Sterilitätskontrolle wurden *Aliquots* von jedem selbst-hergestelltem Zellkulturmedium nach dem Sterilisieren mehrere Tage im Brutschrank inkubiert und dann mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht.

Agaroselösungen für ein x%iges Gel (100 mL)

X g Agarose
 ad 100 mL 0,5x TBE mit 0,2 µg/mL EtBr

Ampicillin-Lösung (10 mL)

1 g Ampicillin
 ad 10 mL H₂O bidest.
 in Aliquots zu 1 mL bei -20 °C lagern

Blocking-Puffer für Western blots

0,2 % TWEEN 20 (v/v)
 4 % Magermilchpulver
 in 1 x TBS

Blotting-Puffer für Western blots

25 mM Tris-HCl pH 8,8
 150 mM Glycin
 5/10 % Methanol

Coomassie-Färbelösung

30 % Methanol (v/v)
 10 % Essigsäure (v/v)
 0,125 % Coomassie Brilliantblau R 250 (w/v)

DEPC-H₂O

0,1 % Diethylpyrocarbonat (v/v)

ad 1 L H₂O bidest.

12 h nach DEPC-Zugabe autoklavieren

DMEM (1 L)

13,38 g DMEM-Trockenmedium

3,7 g NaHCO₃

pH 6,8 mit 1N HCl einstellen, sterilfiltrieren und aliquotiert bei 4°C lagern

DNA-Größenmarker

15 µL 1 Kb DNA-ladder

60 µL 6x DNA-Probenpuffer

225 µL H₂O bidest.

Lagerung bei 4°C

6x DNA-Probenpuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

30 % (v/v) Glycerin

Lagerung bei 4°C

Entwicklungspuffer für Western blots

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

100 mM Tris-HCl pH 9,5

Ethidiumbromid-Stammlösung (50000x) 10 mg/mL in 0,5x TBE

bei RT lichtgeschützt unter dem Abzug lagern

Ethidiumbromid-Färbelösung (1 L)

20 µL Ethidiumbromid-Stammlsg.

ad 1 L 0,5 x TBE

bei RT lichtgeschützt unter dem Abzug lagern

F10 (1 L)

9,8 g F10-Trockenmedium

1,2 g NaHCO₃

pH 6,8 mit 1N HCl einstellen, sterilfiltrieren und aliquotiert bei 4°C lagern

Gefriermedium

10 % DMSO

90 % F10 oder DMEM

Hoechst 33258-Stammlösung (10 mg/mL)

0,5 mg/mL Hoechst 33258

bei 4 °C lichtgeschützt lagern

Hoechst 33258-Gebrauchslösung (2 µg/mL)

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

Induktionsmedium

10 % Horse serum

90 % F10

Kanamycin-Lösung 10 mg/mL (10 mL)

100 mg Kanamycin
ad 10 mL H₂O bidest.
in Aliquots zu 1 mL bei -20 °C lagern

LB-Medium (1 L)

10 g Casein-Hydrolysat (Peptone)
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
ad 1 L H₂O bidest.
pH 7 mit NaOH einstellen

LB-Agar (1 L)

15 g
ad 1 L LB-Medium

3 M Na-Acetat pH 5,2

3 M Na-Acetat
in H₂O bidest. lösen und mit Essigsäure (96%) auf pH 5,2 einstellen

NBT/BCIP-Färbelösung

2,5 mL Entwicklungspuffer
50 µL NBT/BCIP-StammLösung, Fa. Roche, Mannheim

NENT-Puffer

100 mM NaCl
20 mM Tris-HCl pH 8
1 mM EDTA
0,5 % NP40
steril filtrieren und bei 4°C lagern

10x PBS

80 g NaCl
2 g KCl
14,42 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O bidest.
2 g KH₂PO₄
mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

1x PBS

137 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₂ x 2H₂O
1,5 mM KH₂PO₄
mit 1N HCl auf pH 7,4 einstellen; Lagerung bei RT

4% Paraformaldehydlösung

4 g Paraformaldehyd
100 mL 1x PBS
bei 60 °C inkubieren bis PFA gelöst ist; in Aliquots zu 50 mL bei -20 °C lagern

PAA-Sammelgel

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

RIPA-Puffer

0,5 %	Na-Desoxycholat
1 %	(v/v) NP40 (oder IGPAL)
0,1 %	SDS
1 mM	EDTA

In 1x PBS lösen und pro 50 mL 1 Tablette complete™ Protease Inhibitor cocktail, Fa. Roche, zugeben; Lagerung max. 1 Monat bei 4°C

1x SDS Laufpuffer

25 mM	Tris-HCl pH 8,8
250 mM	Glycin
0,1 %	SDS

STET-Lösung

50 mM	Tris-HCl pH 8
50 mM	EDTA
0,5 %	Triton X-100 (v/v)
8 %	Saccharose (w/v)

steril filtrieren und bei 4°C lagern

10x TBE-Puffer

890 mM	Tris-Base
890 mM	H ₃ BO ₃ (Borsäure)
25 mM	EDTA

1x TBS-Puffer

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

TBS-Tween

1 x	TBS + 0,2% (v/v) Tween 20
-----	---------------------------

TE Puffer

10 mM	Tris-HCl pH 7,5
1 mM	EDTA pH 8,0

TFB I-Puffer

100 mM	KCl
50 mM	MnCl ₂
30 mM	Kaliumacetat pH 5,8 (mit 2M Essigsäure einstellen)
10 mM	CaCl ₂
15 %	Glycerin

steril filtrieren und bei 4°C lagern

TFB II-Puffer

10 mM KCl
 10 mM MOPS
 75 mM CaCl₂
 15 % Glycerin

steril filtrieren und bei 4°C lagern

PAA-Trenngel 8%

1 mL 50% (w/v) PAA-StammLösung
 1,2 mL 1,88 M Tris-HCl pH 8,8
 0,25 mL 2,5% SDS
 3,5 mL H₂O bidest.
 30 µL 10% APS
 5 µL Temed

Tris-HCl 1M

121,1 g Tris-Base

in 700 mL H₂O bidest. lösen; pH mit konz. HCl einstellen; mit H₂O bidest. auf 1 L auffüllen

TWB-Puffer (100 mL)

20 mM Hepes pH 7,9
 60 mM NaCl
 6 mM MgCl₂
 8,2 % Glycerin (v/v)
 0,1 mM EDTA

steril filtrieren und bei 4°C lagern

Trypsinlösung (1 L)

8 g NaCl
 0,4 g KCl
 1 g Glucose
 0,58 g NaHCO₃
 1 g Trypsin (Trypsin 250, Fa. Difco)
 0,2 g EDTA

steril filtrieren und bei 4°C lagern; längere Lagerung bei -20°C

2.3 Enzyme

Alle Restriktionsendonucleasen und Nukleinsäure modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Gibco BRL, MBI Fermentas, Stratagene bzw. Amersham-Pharmacia bezogen. Die Lagerung der Enzyme erfolgt bei -20°C; die Enzyme werden unter den von den Herstellern angegebenen Reaktionsbedingungen, unter Verwendung der mitgelieferten Puffer, eingesetzt.

2.4 Bakterienstämme

Stamm	Referenz
E.coli BL21 (DE3) pLysS	Studier und Moffat., 1986

E.coli DH5 α	Bachmann, 1983
E.coli stbl2	Gibo BRL
E.coli XLlblue	Bullock et al., 1987

2.5 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
C2C12	Maus Myoblasten	Yaffe und Saxl, 1977
COS-7	Affen Nieren-Zellen (SV 40 transfiziert)	ATCC: CRL-1651
EJ28	Humane, invasive Blasencarcinom-Zellen	Gaetje et al., 1997
HeLa	Humane Cervixcarcinom-Zellen	ATCC: CCL-2.1
i28	postnatale Myoblasten Kulturen. Die Myoblasten wurden aus der Oberschenkelmuskulatur von 6 Wochen alten Balb/c-Mäusen isoliert und anschließend kloniert (Klon I 28).	Irintchev et al., 1997 a, b
MCF7	Humane Brustkrebszellen	ATCC: HTB-22
RT112	Humane, nicht invasive Blasencarcinom Zellen	Gaetje et al., 1997

2.6 Größenmarker

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

Protein	MW (Da)
α -Macroglobulin	180.000
β -Galactosidase	116.000
Fructose-6-Phosphatkinase	84.000
Pyruvatkinase	58.000
Fumarase	48.500
Lactat-Dehydrogenase	36.500
Triosephosphat-Isomerase	26.600

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

Fragmentgrößen [bp]

12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517/506, 396, 344, 298, 22, 201, 154, 134, 75

2.7 Oligonucleotide (*Primer*)

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Gibco BRL, Roth, Sigma-Genosys und MWG Biotech bezogen.

BiP-spezifische Oligonucleotide

Die erfolgreiche cDNA-Erststrangsynthese kann mit Hilfe BiP-spezifischer Oligonukleotide nachgewiesen werden. Diese Oligonukleotide amplifizieren in der PCR ein Fragment des Haushaltsgenes BiP (*binding protein*) in der Größe von 561 bp.

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5'→ 3')
BiP 5'	TACACTTGGTATTGAACTG
BiP 3'	GGTGGCTTTCCAGCCATTC

Oligo(dT)-Primer

Der Oligo(dT)-Primer wird in der Reversen Transkription für die cDNA-Erststrangsynthese verwendet und hybridisiert am poly(A)⁺-Ende jeder mRNA.

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5'→ 3')
Oligo(dT)-Primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATCCC

ARVCF-spezifische Oligonucleotide

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5'→ 3')
3'UTR as	GAGGTCGACTAGGCAGATGCAACAGCC
5'→3'	GCACTGCGCAACCTCTCCTAT
AKCT3	TGGG TGACT CAAGATGGCGGGCCCTC
ARVCF 10R	TTGCGAACATTCCGAACC
ARVCF 5' alt	GAT GAATTC CCAGAGGCACCCGAGGTAC
ARVCF 5'UTR Zoe	CTGAGATCCCCCGAAATAGG
ARVCF 6R	ACTCGGTCCAAGCTGCCC
ARVCF-Y-as-	ATGTAAGAGAAAGGTACAAATCC
ARVCF-Y-s	GTGAGTAACAGCAAGCAAGTG
C11-49AA	GATGAATTCCTCCCCCTGCTTGTGGC
EcoRI C11 s	GAT GAATTC CCACGCTGGCGGGACCC
EcoRI Q41 neu	GAT GAATTC GAGGACTGCAATGTGC
Ex 18 as	TCTCAATAGTTCTTTCTC
Ex 19 as	GGATACTGGCACACAGGTGG
Ex 19 s	GTGTATGGGCAAGGTGTCTAC
Ex 20 s	GGCCCTGGCCCAGCTGTTTG
Ex B as	GCATGCAAGCTAGACCCAGG
Ex B s	CCCGATCCTGGCAGGAAG
NES mut. as	CCTAGCAACAAACGCCTGGGCCAGG

NES mut. s	CTGGCCCAGGCGTTTGTGCTAGGGATCG
NLS mut. as	ATTTGCGCTCTGGCCACCAAAGCAGCTGGCGT CATCCTTGCTGTTTCGCTGGGAGG
NLS mut. s	AACCAGCAAGGATGACGCCAGCTGCTTTGGTG GCCAGAGCGCAAATGGGAAGAAGG
NLS neu -as-	CGCGGCCGCCACCTCAGCCGCAGGGTG
NLS neu -s-	GCGGCTGAGGTGGCGGCCGCGGCCTGTGGG
R80	ATTGGCTTTACAGGGTCC
Teil NLS -as-	GCCACTGCCGCCGCAATACCCTCGTTC
Teil NLS -s-	GCGGCGGCAGTGGCGCAGCTGCTGGGG
UP6	TGCAGAGGGATGGCTGGACGA
YFP ARVCFf.I. -as-	TGG GTCGAC GATGGCGGGCCCTC
YFP ARVCFf.I. -s-	GAT GAATTC TATGGAGGACTGCAATGTGC

Cadherin-spezifische Oligonucleotide

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5'→3')
CPD:MOM=>GST as	AAACTGTGGGAAGGAATTC
Ecad CPD GST s	CCC GATCC GGAGGAGAACGGTGG
MOM-N-cad -as-	GAT GAATTC CCGTCGTCACCACCGCCG
MOM-N-cad -s-	GGG GATCC AAACGGCGGGATAAAGAGCG
Ncad CPD GST s	CCC GATCC TGAAACGGCGGGATAAAGAGCG

2.8 Plasmide

Plasmid	Herkunft/Referenz
pGEX 5X1	Fa. Pharmacia
pUC 19	Fa. MBI Fermentas
pGEM®-T Easy	Fa. Promega
pEGFP-C1, -C2, -C3	Fa. Clontech
MOM 70 E-cad	M. Rüdiger, Abt. Prof. Jockusch, TU Braunschweig
pcDNA3.1+/-	Fa. Invitrogen
pcDNA3.1/His A, B, C	Fa. Invitrogen

2.9 Zugriffsnummern für Nucleotidsequenzen (*accession number*)

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

Bezeichnung	Organismus	Zugriffsnummer
ARVCF	murin	AJ243418
ARVCF	human	U51269
Beta-Catenin	murin	M90364
BiP	murin	AJ002387
E-Cadherin	murin	X06115
M-Cadherin	murin	M74541
mSLIM3	murin	U77040
N-Cadherin	murin	AB008811
p120(ctn)	murin	z17804

2.10 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper		WB	IP	IF	Herkunft/Referenz
Maus- α -PAN-cadherin	mono.			1:100	Fa. Sigma
Maus- α -A-Cam	mono.			1:100	Fa. Sigma
Maus- α -E-cadherin 5H9	mono.			1:40	Fa. Monosan
Ratte- α -E-cadherin DECM	mono.				Vestberger und Kemler, 1985
Kaninchen- α -M-Cadherin	poly.	1:40	unverd.	1:40	Rose et al., 1994
Meerschwein- α -ARVCF	poly.		unverd.		W. W. Franke, DKFZ, Heidelberg
Maus- α -Xpress	mono.	1:5000	unverd.	1:100	Fa. Invitrogen
Maus- α -c-myc (clone 9E10)	mono.	1:100		1:100	Fa. Sigma
Maus- α -p120(ctn)	mono.	1:1000		1:100	Fa. Transduction Laboratories
Maus- α - β -catenin	mono.	1:500		1:100	Fa. Transduction Laboratories
Maus- α -GFP	mono.	1:1000			Fa. Clontech
Maus- α -Birkenprofilin	mono.			1:50	M. Rüdiger, Abt. Prof. Jockusch, TU Braunschweig

WB= Western blot; IP= Immunpräzipitation; IF= Immunfluoreszenz

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Herkunft/Referenz
Ziege- α -Kaninchen IgG (H+L)	1:15.000 WB	Fa. Jackson
Alkalische Phosphatase-konjugiert		(Dianova)
Ziege- α -Maus IgG (H+L)	1:15.000 WB	Fa. Jackson
Alkalische Phosphatase-konjugiert		(Dianova)
Ziege- α -Kaninchen IgG (H+L)	1:15.000 WB	Fa. Sigma
Peroxidase-konjugiert		
Ziege- α -Maus IgG (H+L)	1:15.000 WB	Fa. Sigma

Peroxidase-konjugiert		
Ziege- α -Maus IgG (H+L) Alexa Fluor™594 (rot)	1:400 IF	Fa. Molecular Probes
Ziege- α -Maus IgG (H+L) Alexa Fluor™488 (grün)	1:400 IF	Fa. Molecular Probes
Ziege- α -Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor™594 (rot)	1:400 IF	Fa. Molecular Probes
Ziege- α -Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor™488 (grün)	1:400 IF	Fa. Molecular Probes
Ziege- α -Meerschwein IgG (H+L) Alexa Fluor™568 (rot)	1:400 IF	Fa. Molecular Probes
Cy3™-gebundenes F(ab') ₂ Fragment Ziege- α -Maus IgG (H+L)	1:800 IF	Fa. Sigma
Cy3™-gebundenes F(ab') ₂ Fragment Ziege- α -Kaninchen IgG (H+L)	1:800 IF	Fa. Sigma

WB= Western blot; IF= Immunfluoreszenz

2.11 Kits und Transfektionsreagenzien

CONCERT™ High Purity Plasmid Midiprep System (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe)
 CONCERT™ High Purity Plasmid Miniprep System (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe)
 CONCERT™ Rapid Gel Extraction System (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe)
 Effectene™ Transfection Reagent (Fa. QIAGEN, Hilden)
 PolyFect® Transfection Reagent (Fa. QIAGEN, Hilden)
 QIAquick® PCR Purification Kit (Fa. QIAGEN, Hilden)
 TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Fa. Promega)

2.12 Geräte

Gerät	Bezeichnung/Hersteller
Autoklav	Bioklav, Fa. Schütt
Brutschränke	Cytoperm, Fa. Heraeus
Elektrophorese-Kammern	Gelelektrophoresesystem HE 33, Fa. Hoefer Biometra-Multigel, Fa. Biometra
Geltrockner	Fa. Biometra
Heizblöcke	DRI-Block DB3, Fa. Techne
Inkubationsschüttelschrank	Fa. Heraeus
Magnetrührer	Ika-Combimag RCO
Mikroskope	Axiophot, Fa. Zeiss

	Axiovert 135, Fa. Zeiss
Netzgeräte	Biometra P22, Fa. Braun MultiDrive XL, Fa. Pharmacia LKB
PCR-Cycler	PTC-100 Programmable Thermal Cotroller, Fa. MJ Research Mini Cycler™, Fa. MJ Research
pH-Meter	Mikroprozessor pH Meter pH 537, Fa. WTW
Photodokumentationssystem	Cybertech Image Dokumentation System, Fa. Cybertech
Pipettierhilfe	Fa. Hirschmann
Röntgenentwicklermaschine	Curix 60, Fa. Agfa-Gevaert
Schüttelgerät	Swip, Fa. Edmund Bühler
Schüttelwasserbad, heizbar	CERTOMAT WR, Fa. Braun
Schwenkgerät	Fa. Heidolph
Spektrometer	Ultraspec Plus Spectrophotometer, Fa. Pharmacia LKB
Vortex-Gerät	Fa. Bender und Hobein, Zürich
Waagen	Laborwaage LC 4200, Fa. Sartorius Laborwaage LC 420, Fa. Sartorius Analysenwaage BA 61, Fa. Sartorius
Wasserbäder	MGW, Lauda C20
Zentrifugen	Biofuge 13, Fa. Heraeus Biofuge 15 R, Fa. Heraeus Biofuge 28 RS, Fa. Heraeus Megafuge 1.0R, Fa. Heraeus Varifuge 20RS, Fa. Heraeus DIGIFUGE, Fa. Heraeus Sorvall Ultrazentrifuge OTD65B, Fa. DuPont

2.13 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser, 22 mm	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Einmalspritzen	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Einweghandschuhe	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Kunststoffwaren	Fa. Greiner, Solingen
Nitrozellulosefilter Hybond C extra®	Fa. Amersham, Buckinghamshire
Objektträger	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Papiertücher	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Parafilm „M“	Fa. American National Can., Neenah

Pasteurpipetten	Fa. Brand, Wertheim
Petrischalen, 25 mm, 60 mm	Fa. Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Reaktionsgefäße 1500 µL	Fa. Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße 500 µL	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Röntgenfilm Biomax MS	Fa. Kodak (Fa. Amersham)
Röntgenfilm X Omat blue	Fa. Kodak (Fa. Amersham)
Sterilfilter	Fa. Fisher Scientific, Nidderau
Whatman 3MM®	Fa. Amersham, Buckinghamshire

3. Methoden

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

3.1 Fällung von Nucleinsäuren

Die Fällung von Nucleinsäuren erfolgt nach Sambrook et al., 1989.

3.2 Reinigung von Nucleinsäuren

Sephadex-G50-Säulenchromatographie

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

P.C.I.-Extraktion

Mit Hilfe der P.C.I. (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol)-Extraktion können Nucleinsäuren von Proteinen (u.a. DNasen und RNasen) getrennt werden. Die P.C.I.-Extraktion erfolgt nach Salzmann und Weissbach, 1967.

3.3 Photometrische Bestimmung von Nucleinsäure-Konzentrationen

Bei der photometrischen Bestimmung von Nucleinsäure-Konzentrationen macht man sich folgende Tatsachen zunutze:

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

Für die Absorption gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

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

I = Intensität der Wellenstrahlung nach Durchlaufen der Schichtdicke d

I_0 = Intensität des eingestrahlenen Lichtes

d = Schichtdicke

k = Absorptionskoeffizient (je nach Art und Konzentration der Moleküle in Lösung)

Nucleinsäuren besitzen ein Absorptionsspektrum, dessen Maximum bei 260 nm liegt. Ihr Absorptionsspektrum unterscheidet sich beispielsweise von dem von Proteinen, so daß Verunreinigungen durch Überlagerung der Spektren festgestellt werden können. Für die Messung werden 50 oder 100 µL einer geeigneten Verdünnung eingesetzt. Nach der Messung der Extinktion kann die Konzentration der Nucleinsäure-Lösung mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Nucleinsäure-Konzentration} = \frac{\text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Formfaktor}}{1.000}$$

Der Formfaktor für DNA beträgt 50, für RNA 40.

3.4 Photometrische Bestimmung der Protein-Konzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach Bradford, 1976. Ca. 5 μL einer Protein-Lösung werden mit 200 μL BIO-RAD Protein-Assay Reagenz (Fa. Biorad) und 800 μL ddH₂O vermischt, ca. 5 min inkubiert und anschließend bei 595 nm spektralphotometrisch gemessen. Die Protein-Konzentration lässt sich dann wie folgt berechnen:

$$\text{Protein-Konzentration} = \frac{Y \times 19,88 \mu\text{g}/\mu\text{L}}{\text{Eingesetzte Protein-Lösung in } \mu\text{L}}$$

Y= Extinktion bei 595 nm

3.5 Präparation von Plasmid-DNA

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

Schnellpräparation von Plasmid-DNA

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

3.6 Gelelektrophorese (Maniatis et al., 1982)

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, die die Auftrennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Größe ermöglicht. Die Gelelektrophorese kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden. Da Nucleinsäuren aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Gerüsts bei allen pH-Werten eine negative Gesamtladung aufweisen, wandern sie während der Elektrophorese zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist bei konstanter Feldstärke, Agarosekonzentration und Gelstärke umgekehrt proportional der Molekülgröße. Um die absolute Größe der Nucleinsäuren bestimmen zu können, wird neben diesen ein definierter Größenstandard im Gel aufgetrennt. Gleiches gilt für die SDS-Gelelektrophorese, bei der ein definierter Größenstandard mitläuft, um die absolute Größe der Proteine bestimmen zu können.

3.6.1 Native Gelelektrophorese

Die Agarosekonzentration des Gels richtet sich nach der Größe der zu trennenden Moleküle (Sambrook et al., 1989):

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

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

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

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses Natrium-dodecylsulfat (SDS) und Denaturierungsreagenzien wie z.B. Harnstoff, entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an die Proteine an und kompensiert die positive Ladung so, daß alle Proteine in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, wodurch diese sich zu gestreckten Polypeptidketten entfalten. Einzelne Proteinmoleküle werden aus ihren Assoziationen mit anderen Proteinen oder Lipiden freigesetzt. Je nach Proteingröße läßt sich die Porengröße des Gels variieren, indem unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid eingesetzt werden. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert und wandern von dort in das Trenngel ein. Die beiden Gelschichten unterscheiden sich in ihrem pH-Wert.

Gießen des SDS-PAA-Proteingels

Zwischen zwei mit einem Gummiband abgedichtete Glasplatten wird zunächst eine Trenngelschicht gegossen, die zur Ausbildung einer scharfen Trennlinie mit ca. 500 µL ddH₂O überschichtet wird. Nach der Polymerisierung des Trenngels (ca. 30 min) wird das Wasser entfernt und eine Sammelgelschicht bis an den Glasrand gegossen. Um die Geltaschen auszubilden, wird ein Kamm in die noch flüssige Sammelgelschicht geschoben.

Auftragen und Auftrennen der Proben

Vor dem Auftragen werden die Proteinextrakte mit 4x Roti®-Load1 (Fa. Roth) versetzt und 3 bis 5 min bei 95°C inkubiert. Die Gelapparatur (Fa. Biometra) wird mit 1 x SDS-Puffer gefüllt. Um einen gleichmäßigen Stromfluß zu garantieren, werden die entstehenden Luftblasen zwischen den Gelplatten entfernt. Die vorbereiteten Proben werden in die Geltaschen überführt und bei einer Stromstärke von 70 V aufgetrennt.

3.7 Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau (Weber und Osborn, 1969)

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

3.8 Autoradiographie (Fluorographie)

Gele mit radioaktiv markierten Proben werden zunächst für ca. 15 min in Entfärbelösung fixiert. Anschließend werden sie auf Whatman-Papier (Fa. Amersham) überführt, mit

Haushaltsfolie bedeckt und auf einem Geltdrockner unter Vakuum bei ca. 80°C für min 1 h getrocknet. Es wird ein Röntgenfilm aufgelegt, der nach geeigneter Expositionszeit entwickelt wird.

3.9 Herstellung kompetenter Bakterienzellen (Hanahan, 1985)

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

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

Faktor 1000= Umrechnungsfaktor von ng in µg

Faktor 10= aufgrund 100 µL ausplattierter Bakteriensuspension

Die Transformationseffizienz sollte mindestens 1×10^6 Transformanden/µg DNA betragen.

3.10 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen

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

3.11 Anlegen eines Glycerolstockes

826 µL einer frischen Übernachtskultur werden mit 174 µL einer 87%igen sterilen Glycerin-Lösung in einem sterilen Schraubdeckelgefäß gemischt und bei -80°C gelagert. Zum Animpfen einer Kultur aus einem Glycerolstock wird etwas tiefgefrorenes Material mit einer sterilen Pipette entnommen, in Medium überführt und ü/N bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

3.12 Enzymkatalysierte Modifikationen von DNA

Restriktionsspaltung (Nathans und Smith, 1975)

Restriktionsendonukleasen spalten Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungssequenzen. Man unterscheidet Restriktionsenzyme

vom Typ I, II und III. Restriktionsenzyme vom Typ I und III sind für die Molekularbiologie von geringer Bedeutung. Im Allgemeinen werden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, bei denen die Erkennungsstelle auf der DNA auch der Schnittstelle entspricht. Bei einer Spaltung der DNA mit einer Restriktionsendonuklease dieses Typs entstehen entweder stumpfe (*blunt ends*) oder kohäsive (*sticky ends*) Enden.

Die Reaktion wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die eingesetzte wäßrige DNA-Lösung sollte max 1/3 des gesamten Reaktionsvolumens einnehmen. Pro µg DNA werden mindestens 2 U Enzym eingesetzt, wobei die Enzymmenge aufgrund der inhibierenden Wirkung des Glycerins, 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten sollte. Um für die unterschiedlichen Enzyme optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen, werden die von den Herstellern mitgelieferten 10x Reaktionspuffer verwendet. Die Reaktionsansätze werden in der Regel bei 37°C für min 1 h inkubiert.

Dephosphorylierung

Das Einbringen eines DNA-Fragments in einen Vektor, der zwei gleiche Enden aufweist, kann durch die Religation der Vektors erschwert werden. Durch die hydrolytische Abspaltung der 5'-terminalen Phosphatgruppe des Vektors mittels alkalischer Kälberdarm-Phosphatase (CIAP, Fa. MBI Fermentas) kann dessen Religation verhindert werden. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgt mit 1 U des Enzyms für 30 min bei 37°C im zugehörigen Reaktionspuffer. Nach Abschluß der Reaktion wird die Phosphatase durch Gelelektrophorese von der DNA getrennt.

Phosphorylierung

Zum Klonieren von PCR Produkten ist es notwendig, diese vorher zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung erfolgt mit Hilfe der Polynucleotidkinase (PNK, Fa. MBI Fermentas) unter Einsatz von ATP (nicht dATP !!!) nach Herstellerangaben.

Auffüll-Reaktion

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

Ligation von DNA-Doppelsträngen

Die T4-DNA-Ligase katalysiert ATP-abhängig die Verbindung von 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat- gruppen zu Phosphodiesterbindungen. Die Ligation wird in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 µL durchgeführt. Die Menge an linearisiertem Vektor beträgt 50 bis 100 ng. Das zu klonierende DNA-Fragment wird in 2-5fachem (*sticky ends*) bzw. 10fachem (*blunt ends*) molarem Überschuß zugegeben.

Ligationsansatz: x µL linearisierter Vektor
 x µL linearisiertes *insert*
 4 µL 5 x Ligasepuffer incl. ATP (Fa. MBI Fermentas)
 1 µL T4-DNA-Ligase 1 U/µL (Fa. MBI Fermentas)
 ad 20 µL ddH₂O

3.13 Synthese einzelsträngiger cDNA (Reverse Transkription)

Mit Hilfe der Reversen Transkription ist es möglich, Gesamt-RNA in cDNA umzuschreiben. Durch den Einsatz eines oligo(dT)-*Primers* wird nur polyadenylierte RNA in cDNA übersetzt.

- Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration werden 20 µg Gesamt-RNA entnommen und mit DEPC-H₂O auf 12,5 µL aufgefüllt.

- Anschließend werden 3 μL oligo(dT)-*Primer* (5 pmol/ μL) zugegeben. Während der Inkubation bei 70°C, 10 min wird der Ansatz 4 x kurz gevortext und zum Schluß für ca. 5 min auf Eis inkubiert.
- Zugabe von:
 - 6 μL 5 x Reverse-Transkriptase-Puffer, auf 37°C vorgewärmt
 - 3 μL 0,1 M DTT
 - 1,5 μL dNTP-Mix (je 10 mM)
 - und Inkubation bei 37°C, 2 min.
- Zugabe von 2 μL MMLV-Reverse-Transkriptase (200 U/ μL). Inkubation bei 37°C, 1 h und anschließend 5 min bei 95°C.

3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren, das die Amplifizierung definierter Nucleinsäure-Bereiche ermöglicht. Für die Reaktion werden hitzebeständige Polymerasen eingesetzt. Die Synthese erfolgt in drei Reaktionsschritten, die zyklisch wiederholt werden:

1. Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA
2. Hybridisierung der Oligonucleotide (*Primer*)
3. Synthese des Doppelstrangs

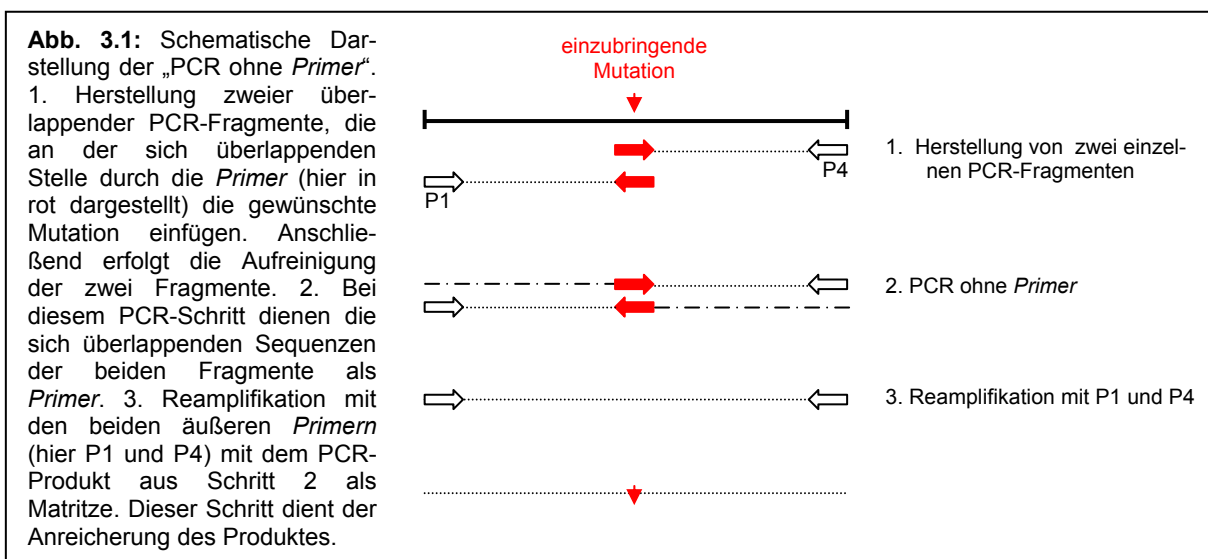
Reaktionsansatz für 50 μL Gesamtvolumen:

5 μL	10 x PCR-Puffer
2 μL	MgCl ₂
4 μL	5'- <i>Primer</i> (5 pmol/ μL)
4 μL	3'- <i>Primer</i> (5 pmol/ μL)
1 μL	dNTP-Mix (je 10 mM)
0,2 μL	Polymerase (5 U/ μL)
1 μL	Matrizen-DNA (1 bis 100 ng)
ad 50 μL dd H ₂ O	

Alle Parameter der PCR müssen für jede Reaktion optimiert werden.

„PCR ohne *Primer*“

Die sog. PCR ohne *Primer* wurde im Rahmen dieser Arbeit u.a. zur Herstellung von Punktmutanten herangezogen. Die Technik wird in Abb. 3.1 erläutert.



3.15 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen durch Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der Ultrazentrifugation ist es möglich, die Gesamt-RNA in Kultur gehaltener Zellen zu isolieren. Die erhaltene RNA kann dann zur cDNA-Synthese eingesetzt werden. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen durch Ultrazentrifugation erfolgt nach Chirgwin, 1979.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen durch TRIZOL® Reagent (Fa. Gibco BRL)

- Alle möglichen Schritte werden unter einem Abzug getätigt.
- 3 mL TRIZOL® Reagent auf die Zellen in Kulturschale geben (95 mm Ø), mehrmals auf- und abpipettieren und 5 min bei RT inkubieren.
- 600 µL Chloroform zugeben, 15 sec kräftig schütteln und anschließend 2-3 min bei RT inkubieren.
- 15 min lang bei 2-8°C und $\leq 12.000 \times g$ zentrifugieren.
- Nach Zentrifugation zeigen sich drei verschiedene Phasen: obere: wässrig, farblos, ca. 1,8 mL; mittlere: sehr dünn, oft kaum sichtbar; untere: enthält Phenol und Chloroform.
- Die obere Phase in ein sauberes Reaktionsgefäß überführen, mit 1,5 mL Isopropanol mischen und 10 min bei RT inkubieren.
- 10 min lang bei 2-8°C und $\leq 12.000 \times g$ zentrifugieren, Überstand verwerfen, 3 mL 75% EtOH zugeben und vortexen.
- 5 min lang bei 2-8°C und $\leq 7.500 \times g$ zentrifugieren, Überstand abnehmen und die RNA 5-10 min trocknen lassen.
- Durch Zugabe von DEPC-H₂O resuspendieren und 10 min bei 55-60°C inkubieren.

3.16 Arbeiten mit Zellkulturen

Technische Voraussetzungen für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen

- Die Arbeiten mit Zellkulturen werden unter einer sterilen Werkbank (Fa. Heraeus) mit vertikaler Luftströmung durchgeführt.
- Die Arbeitsfläche der Sterilbank und die benutzten Gerätschaften werden vor Beginn und nach Beendigung der Arbeit mit 70%igem Ethanol desinfiziert; die Hände mit Sterillium (Fa. Bode). Glaspipetten, Pasteurpipetten, Kulturflaschen und Lösungen werden autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen werden sterilfiltriert.
- Pipetten werden vor dem Autoklavieren mit Watte gestopft.
- Pipetten und Glasgefäße, die in der Zellkultur Verwendung finden, werden von solchen des mikrobiologischen Arbeitsbereiches getrennt aufbewahrt.
- Um Kontaminationen zu vermeiden, werden Kulturschalen, Mediumflaschen und Pipettendosen nur unter der Sterilbank geöffnet. Hände und Arme sollten sich nicht direkt über den geöffneten Gefäßen befinden.
- Die Brutschränke müssen in regelmäßigen Zeitabständen gereinigt werden.
- Um CO₂-Druck, Luftfeuchtigkeit und Temperatur innerhalb des Brutschrankes konstant zu halten, wird dieser regelmäßig auf Veränderungen hin untersucht.
- Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen werden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.
- Alle Medien, Zusätze und Lösungen, die in der Zellkultur eingesetzt werden, müssen einer Sterilitätskontrolle unterzogen werden. Dazu wird ein Aliquot aus jeder Flasche in einer Kulturschale 3 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend auf Kontaminationen untersucht.

3.17 Kulturbedingungen eukaryotische Zellen

Zelllinie	Wachstumsmedium	Fusionsmedium
C2C12	DMEM + 10% FCS	DMEM + 5% HS
COS-7	DMEM + 10% FCS	-
EJ28	DMEM + 10% FCS	-
HeLa	DMEM + 10% FCS	-
i28	F10 + 20% FCS	DMEM + 10% HS
MCF7	DMEM + 10% FCS	-
RT112	DMEM + 10% FCS	-

Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Der Mediumwechsel erfolgt, je nach Zustand der Zellen, spätestens alle 3 Tage.

3.18 Lagerung von Zellen

Zellen können mehrere Jahre in einem speziellen Gefrier-Medium in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert werden.

3.19 Passagieren von Zellen (Lindl und Bauer, 1989)

Die verwendeten Zellen sind kontaktinhibiert. Sobald in der Kulturschale eine Zelldichte erreicht ist, bei der sich die Zellen gegenseitig berühren, stellen sie ihr Wachstum ein, d.h. die Proliferationsrate nimmt stark ab, was zum Absterben der Zellkultur führt. Diese Tatsache macht es notwendig, die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% zu passagieren.

- Das alte Medium wird mit Pasteurpipetten abgenommen.
- Die Zellen werden mit 1x PBS gewaschen, da bereits geringe Spuren von Calcium die Wirkung der anschließenden Trypsin-Behandlung negativ beeinflussen können.
- Die Zellen werden mit 1 mL Trypsin überschichtet und im Brutschrank für ca. 3-5 min inkubiert. Danach wird die Zellkulturschale mehrmals geklopft, um das Ablösen der Zellen vom Schalen-Boden zu erleichtern.
- Unter dem Mikroskop wird anschließend kontrolliert, ob sich die Zellen abgerundet und von ihrer Unterlage gelöst haben. Ist dies der Fall, wird die Zellkulturschale mit 9 mL Nährmedium aufgefüllt. Um sicherzustellen, daß sich die Zellen im Medium gleichmäßig verteilen, wird die Zellsuspension mit einer Pipette mehrmals auf- und abpipettiert.
- Die Zellen werden in einem geeigneten Verdünnungsverhältnis auf die vorbereiteten Kulturschalen gegeben und unter leichtem Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt.

3.20 Induzieren von Zellen zur Fusion

Um die Fusion der Myoblasten-Zellkultur zu Myotuben zu induzieren ist es notwendig, das Wachstumsmedium gegen Fusionsmedium auszuwechseln. Dazu werden die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit einem geeigneten Volumen Fusionsmedium inkubiert.

3.21 Auftauen von Zellen

Da das im Gefriermedium enthaltene DMSO ein Zellgift ist, ist es notwendig, dieses so schnell wie möglich zu entfernen, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden.

- Die Zellsuspension wird aufgetaut und in 5 mL Wachstumsmedium aufgenommen.
- Zentrifugation bei 1.200 rpm, 3 min.
- Das Zellpellet wird in 10 mL Medium vorsichtig resuspendiert und die Suspension auf Kulturschalen verteilt.

3.22 Einfrieren von Zellen

- Die Zellen werden wie zum Passagieren trypsinisiert, in ca. 5 mL Medium aufgenommen und bei 1.200 rpm 3 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in Gefriermedium resuspendiert.
- Lagerung bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff

3.23 Immunfluoreszenz

Vorbehandlung von Deckgläschen

- Die Deckgläschen werden in einer Lösung aus:
25 mL EtOH_{abs.}
750 μL 10%ige Essigsäure
75 μL Bind Silan
für 30 min unter Schütteln inkubiert.
- Danach werden die Deckgläschen 3 x in EtOH_{abs.} gewaschen.
- Die Deckgläschen werden an der Luft getrocknet, in Alufolie verpackt und autoklaviert.

Fixieren von Zellen auf Deckgläschen

Fixierung mit Methanol oder Aceton

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

Fixierung mit Paraformaldehyd

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

Indirekte Immunfluoreszenz

Mit der Methode der Immunfluoreszenz kann die Lokalisierung eines Antigens von *in vitro* kultivierten Zellen oder Geweben nachgewiesen werden.

Man verwendet einen primären Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist und spezifisch an das Antigen bindet. Durch Zugabe eines sekundären Antikörpers, der an den primären bindet und der kovalent mit einem Markermolekül (Fluoreszenzfarbstoff) gekoppelt

ist, können spezifische Moleküle in der Zelle durch Fluoreszenz-Mikroskopie aufgezeigt werden.

- Die Permeabilisation der auf Deckgläschen fixierten Zellen erfolgt 10 min mit 0,2% Triton X-100 in 1x PBS bei RT. Anschließend werden die Zellen 3 x 5 min in 1x PBS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 100 µL des primären Antikörpers 1 h inkubiert.
- Die Zellen werden 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen und anschließend 100 µL des sekundären Antikörpers auf die Zellen gegeben und 45 min inkubiert.
- Die Zellen werden 3 x 5 min mit 1 x PBS gewaschen und in einem Tropfen Fluoromount G (Fa. Southern Biotechnology Associates, Inc.) eingebettet. Bei einer Kernfärbung wird beim letzten Waschschrift das PBS durch die Hoechst33258-Lösung ersetzt.

Da der sekundäre Antikörper unter Lichteinwirkung ausbleicht, erfolgt die Inkubation in einer dunklen Kammer. Die Inkubation erfolgt bei RT. Primärer und sekundärer Antikörper werden in PBS + 10% FCS verdünnt.

3.24 Herstellung von Ganzzellextrakten

- Zellen einer 70-80% konfluent bewachsenen Zellkulturschale werden mit 1x PBS gewaschen.
- Gewaschene Zellen mit 500 µL RIPA-Puffer (Kulturschale 95 mm Ø) überschichten, 10 min inkubieren, mit einem „rubber policeman“ abschaben und in ein Eppendorf-Gefäß überführen.
- Zentrifugation 1 min 13.000 rpm. Der Überstand wird zu weiteren Analysen eingesetzt.
- Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.25 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine Methode, um Proteinkomplexe selektiv aus Zellen zu isolieren und anschließend mittels Western Blot zu analysieren. Hierbei findet zunächst ein Vorpräzipitationsschritt statt, durch den unerwünschte Proteinwechselwirkungen mit der eingesetzten Sepharose vermindert werden.

Vorbehandlung von Protein-Sepharose (Fa. Pharmacia)

- Sepharose gut aufschütteln, 500 µL entnehmen und 5 min bei 500 rpm zentrifugieren.
- Sepharose mit RIPA-Puffer waschen, Überstand abnehmen 500 µL RIPA-Puffer zugeben. Lagerung bei 4°C.

Vorpräzipitation und Immunpräzipitation

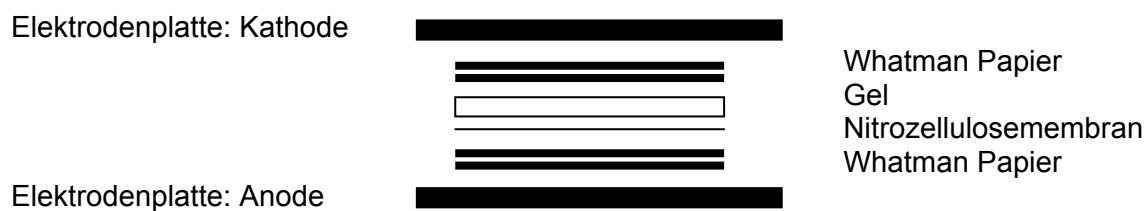
- Ein geeignetes Volumen Zellysat wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt, das 20-40 µL Protein-Sepharose-Lösung enthält.
- Die Probe wird min 30 min unter Rotation bei 4°C inkubiert.
- Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min. Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführen, mit dem geeigneten Vol Antikörper versetzen und min 1 h unter Rotation bei 4°C inkubiert.
- Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 min – Überstand verwerfen.
- Anschließend wird die Sepharose mit dem gebundenen Antigen-Antikörper-Komplex 3 x mit RIPA-Puffer gewaschen.
- Sepharose mit dem geeigneten Vol Ladepuffer versetzen, 5 min bei 95°C inkubieren und anschließend bei 13.000 rpm, 1 min zentrifugieren.

- Die Proben können bei -80°C aufbewahrt, oder gleich auf einem PAA-Gel aufgetrennt werden.

3.26 Western blot

Bei dieser Methode findet der Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Trägermembran mittels eines elektrischen Feldes statt (*blotten*). Das ursprünglich im PAA-Gel erhaltene Trennmuster der Proteinmoleküle bleibt nach dem Transfer erhalten, so daß man eine genaue Kopie des Gels erhält. Nach dem Blotten kann die Membran mit Antikörpern behandelt werden, wodurch eine Identifikation spezifischer Proteine möglich ist. Bei der angewandten Methode handelt es sich um einen Elektro-Schnell-Blot, der mit der Blotkammer von Biometra durchgeführt wird.

- Vor dem Blotten werden Blottingpapier und Nitrozellulosemembran (Hybond™ ECL™-Nitrozellulose Membran, Fa. Amersham) auf Gelgröße zurechtgeschnitten und mit Transferpuffer befeuchtet.
- Anschließend werden Whatman Papier, Membran und Gel in der unten aufgeführten Reihenfolge luftblasenfrei übereinander gelegt.
- Die Blotkammer wird geschlossen und die Spannung angelegt.
- Die Transferzeit der Proteine ist abhängig vom Molekulargewicht und beträgt unter Standardbedingungen 1 h bei 5 mA/cm^2 .



3.27 Proteinnachweis durch Antikörper

ECL™-Nachweis

ECL™ Western Blot (Fa. Amersham) ist eine Methode zum Nachweis immobilisierter Antigene. Diese Antigene können aufgezeigt werden, indem sie über einen sekundären Antikörper detektiert werden. Der Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die ein eingesetztes Agens, das Luminol, umsetzt. Das dabei emittierte Licht wird mittels eines Röntgenfilms nachgewiesen

- Die Nitrozellulosemembran wird nach dem Blotten zunächst 1 h bei RT in einem Blockingpuffer inkubiert, um noch offene Proteinbindungen auf der Membran abzusättigen. So können unspezifische Kreuzreaktionen vermieden werden.
- Anschließend wird die Membran 2 x mit TBS+0,2% Tween 20 (TBS Tween) gewaschen.
- Die auf der Membran immobilisierten Proteine läßt man jetzt mit dem primären Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist, reagieren. Die Inkubation erfolgt, sofern vom Hersteller nicht anders angegeben, 1 h bei RT unter leichtem Schwenken.
- Die Membran wird erneut 3 x 15 min mit TBS Tween gewaschen.
- Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgt für 45 min.
- Um den sekundären Antikörper vollständig zu entfernen, wird die Membran 3-mal mindestens 10 min in TBS Tween gewaschen.

- Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wird die Membran mit einem Gemisch aus ECL-Detektions-Lösung I und II (je 500 µL) gleichmäßig überschichtet und 1 min im Dunkeln inkubiert. Danach läßt man die Detektions-Lösung gut von der Membran abtropfen, schlägt sie luftblasenfrei in Haushaltsfolie ein und legt einen Röntgenfilm auf.
- Die Expositionszeit beträgt zwischen 10 s und 1 h. Nach etwa 1 h ist die Lichtemittierende Reaktion abgeklungen.

Alkalische Phosphatase-Nachweis

- Die Behandlung der Membran nach dem Blotten erfolgt wie zum Nachweis mittels ECL™.
- Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wird die Membran mit 2,5 mL Detektions-Lösung plus 50 µL NBT/BCIP (Fa. Roche) lichtgeschützt inkubiert.
- Die Farbreaktion wird durch Waschen der Membran in Wasser abgestoppt.

3.28 *In vitro* GST-binding assay („Pull down“-Experimente)

Diese Experimente werden unternommen, um die direkte Bindung zweier Proteine aneinander aufzuzeigen. Das eine Protein wird dazu als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und über eine Affinitätsmatrix (Glutathion-Sepharose 4B beads, Fa. Pharmacia) aufgereinigt. Das andere Protein wird in einem *in vitro*- Transkriptions- und Translations-System (TNT®, Fa. PROMEGA) synthetisiert und dabei mit ³⁵S-Methionin (Fa. Amersham) radioaktiv markiert. Nach der Reaktion der beiden potentiellen Interaktionspartner wird der Reaktionsansatz mittels SDS-PAGE separiert. Die GST-Fusionsproteine können anschließend durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden; die *in vitro* translatierten und ³⁵S-markierten Proteine durch Autoradiographie.

3.28.1 Expression rekombinanter Proteine in Bakterien

Voraussetzung für die Expression der eukaryontischen Gene in *E.coli* ist die Klonierung der entsprechenden cDNA in den Vektor pGEX im *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS.

- 20 mL LB-amp werden angeimpft und ü/N bei 37°C und 220 rpm inkubiert.
- Zugabe von 180 mL LB-amp und erneute Inkubation bei 37°C und 220 rpm für 1 h.
- Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,2 mM im Medium, induziert den *lac*-Promotor des Vektors. Dazu ist eine Inkubation bei 37°C für weitere 3 h notwendig.
- Alle weiteren Schritte erfolgen bei 4°C und mit vorgekühlten Lösungen.
- Nach Abschluß der Inkubation werden die Bakterien bei 4.000 rpm für 15 min abzentrifugiert und das Pellet in 5 mL NENT-Puffer (+ 1 mM DTT) resuspendiert.
- Der Zellaufschluß erfolgt durch dreimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 3 µL Benzonase (Reinheitsgrad II, Fa. Merck) für ca. 5 min.
- Die unlöslichen Bestandteile werden durch Zentrifugation bei 8.000 rpm für 30 min entfernt.
- Der Überstand (Proteinextrakt) wird mit 10% Glycerol versetzt, zu je 1 mL aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.28.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Vorbereiten der Glutathion-Sepharose 4B beads (Fa. Pharmacia)

- 1,33 mL *beads* in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführen und 5 min bei 500 rpm zentrifugieren.

- Überstand abnehmen und das Pellet mit 5 mL NENT-Puffer waschen.
- Nach Zugabe von 1 mL NENT-Puffer erfolgt die Lagerung bei 4°C.

Aufreinigung

- Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wird ein geeignetes Volumen aliquotierter Bakterienextrakt mit 20 µL einer Affinitätsmatrix (Glutathion-Sepharose 4B beads, Fa. Pharmacia) für 30 min bei RT inkubiert.
- Die immobilisierten Fusionsproteine werden bei 800 rpm für 5 min sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.
- Die pelletierte Sepharosematrix wird 3 x mit je 1 mL NENT-Puffer (ohne DTT) gewaschen.
- Das gewaschene Pellet wird in einem geeigneten Vol Proben-Puffer aufgenommen, 5 min bei 95°C inkubiert und zur Kontrolle der Expression bzw. Aufreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt.
- Das SDS-Gel wird anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt.

Eine Kontrolle der Proteinexpression und optische Bestimmung der Proteinmengen ist notwendig, um in der Interaktionsstudie jeweils gleiche Mengen an Fusionsprotein einzusetzen.

3.28.3 *In vitro* Transkription und Translation

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* Transkriptions- und Translations-System (TNT®, Fa. PROMEGA) erfolgen Transkription und Translation in einem entsprechend aufbereiteten Zellextrakt (Kaninchen-Retikulozyten-Lysat). Dieses hat gegenüber anderen kommerziell erhältlichen Translationssystemen (z.B. Weizenkeim-System, *E.coli* S30-Extrakt) den Vorteil, daß die Synthese großer Proteine (>60 kD) möglich ist. Außerdem wird eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen durchgeführt, wie z.B. Phosphorylierungen (Pollard et al., 1990).

Voraussetzung für die zellfreie Synthese eines Proteins ist die Subklonierung der entsprechenden cDNA in einen Expressionsvektor. In dieser Arbeit wurde dafür, neben dem von der Firma PROMEGA mitgelieferten pPoly(A)-*luc* (für die Expression von Luziferase), der Vektor pcDNA 3.1 HisA, B, C bzw. pcDNA3.1+/- (Fa. Invitrogen) verwendet.

Die Reaktion wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Kontrolle der Translationsprodukte werden 2 µL des Ansatzes in Probenpuffer aufgenommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht.

3.28.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des Glutathion-S-Transferase-Systems

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

- Zunächst wird ein geeignetes Vol Bakterien-Extrakt aufgetaut, mit 20 µL *beads* 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei 800 rpm 5 min zentrifugiert.
- Um unspezifische Proteinbindungsstellen des GST-Fusionsproteins abzusättigen, erfolgt die Inkubation des Proteinextraktes mit 1 mL NENT-Puffer + 20 % Milchpulver für 15 min bei RT.

- Nach Zentrifugation bei 800 rpm für 5 min wird das Pellet 2 x mit NENT und 1 x mit TWB (+1 mM DTT) gewaschen.
- Nach Abnahme des Überstandes wird ca. 50-100 μ L TWB (+1 mM DTT) zugegeben und mit 3-5 μ L Translat vermischt. Inkubation min 1,5 h bei RT.
- Zentrifugation 5 min bei ca. 1000 rpm. Anschließend wird das Pellet 5 x mit NENT gewaschen.
- Das Pellet wird in einem geeigneten Volumen Probenpuffer aufgenommen (Inkubation 5 min bei 95°C; zentrifugieren 1 min bei 13.000 rpm), die darin enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die ³⁵S-markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

4. Ergebnisse

Die Herstellung aller im Rahmen dieser Arbeit klonierten Konstrukte ist in Kap. 4.4 dokumentiert und aus diesem Grund im Ergebnisteil nicht einzeln aufgeführt.

4.1 Überprüfung der Funktionalität von putativem NLS und NES

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, weisen alle Proteine der p120(ctn) Subfamilie in einem sog. *loop-out* in *armadillo repeat 6* ein Motiv auf, welches als NLS (*nuclear localisation signal*) charakterisiert ist. Für humanes ARVCF (Sirotkin et al., 1997) wurde dieses Motiv als bipartite Robbins und Dingwald *nuclear-targeting* Domäne (Robbins et al., 1991) von AS 607 bis 623 beschrieben (RRRDDASCFCGGKKAKE). Durch Heraussplices des alternativen Exons 10 mit einer Länge von 18 Basenpaaren (nt: 2142-2160) kann das konventionelle NLS zu einem längeren Motiv verändert werden (RRRDDASCFCGGKKAKGKK). Beim murinen ARVCF (mARVCF) konnte trotz gezielter Suche ein vergleichbares Exon 10 nicht identifiziert werden (Schäfer, 2000). Durch computergestützte Sequenzanalysen der murinen ARVCF cDNA konnte ein, mit dem humanen fast identisches, bipartites NLS zwischen AS 609 und 628 ausgemacht werden (RRRKDDASCFCGGKKAKGKKD). Weiterhin konnten durch Vergleich mit bekannten Proteinmotiven potentielle *nuclear export signals* (NES) in der Sequenz des murinen ARVCF identifiziert werden.

Um die Lokalisation von murinem ARVCF bzw. den Einfluß der identifizierten putativen NLS und NES Motive auf die subcelluläre Lokalisation des Proteins zu überprüfen, wurden die Affenieren Zelllinie COS-7 und die humane Mammacarcinom Linie MCF7 verwendet. mARVCF *full length* C11 (FL-C11) wurde in den Vector pEGFP-C2 kloniert und in beide Zelllinien transfiziert. 24 h nach Transfection wurden die Zellen mit einer 4%igen PFA-Lösung fixiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Sowohl in epithelialen MCF7 Zellen als auch in COS-7 Zellen lokalisiert EGFP-FL-C11 an der Membran, in COS-7 Zellen

vornehmlich an Zell-Zell Kontaktstellen (Abb. 4.2Aa und Ba), wohingegen die Kerne beider Zelllinien frei von ectopisch exprimiertem mARVCF sind.

Für verschiedene Mitglieder der *armadillo repeat* Proteinfamilie ist bekannt, daß sie eine duale Lokalisation im Zellkern und an der Plasmamembran aufweisen (Karnovsky und Klymkowsky, 1995; Huber et al., 1996; Inomata et al., 1996; Mertens et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Bonne et al., 1999), was auf einen aktiven Im- und Export Mechanismus dieser Proteine schließen läßt. In p120(ctn) codiert eines der alternativ gespleichten Exons für ein funktionelles NES. Mutation zweier für dieses Proteinmotiv charakteristischer Leuzine zu Alaninen, oder die Behandlung von Zellen mit Leptomycin B (LMB), einem den Proteinexport inhibierendem Agens (Kudo et al., 1999), führt zu einem erhöhten Level von kernständigem p120(ctn) (van Hengel et al., 1999). Dabei scheint der zelluläre Kontext bzw. die Expression von endogenem E-Cadherin in den Zellen von Bedeutung zu sein (van Hengel et al., 1999), weshalb für die hier dargestellten Experimente sowohl E-Cadherin exprimierende epitheliale Zellen eingesetzt wurden (MCF7), als auch Zellen, die einen eher fibroblastoiden Phänotyp aufweisen (COS-7).

Aufgrund der Untersuchungen an p120(ctn) war es von Interesse, eine potentielle Sensitivität von mARVCF gegenüber LMB zu überprüfen. Dazu wurden MCF7 und COS-7 Zellen mit EGFP-FL-C11 bzw. EGFP-C11 (Kaufmann, 2000) transfiziert und für 18 h mit 5 ng/mL Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Wie in Abb. 4.2Ad und Bb zu sehen, kann durch LMB-Behandlung mARVCF im Kern zurückgehalten werden. In COS-7 Zellen ist dieser Effekt stärker als in den epithelialen, E-Cadherin exprimierenden, MCF7 Zellen.

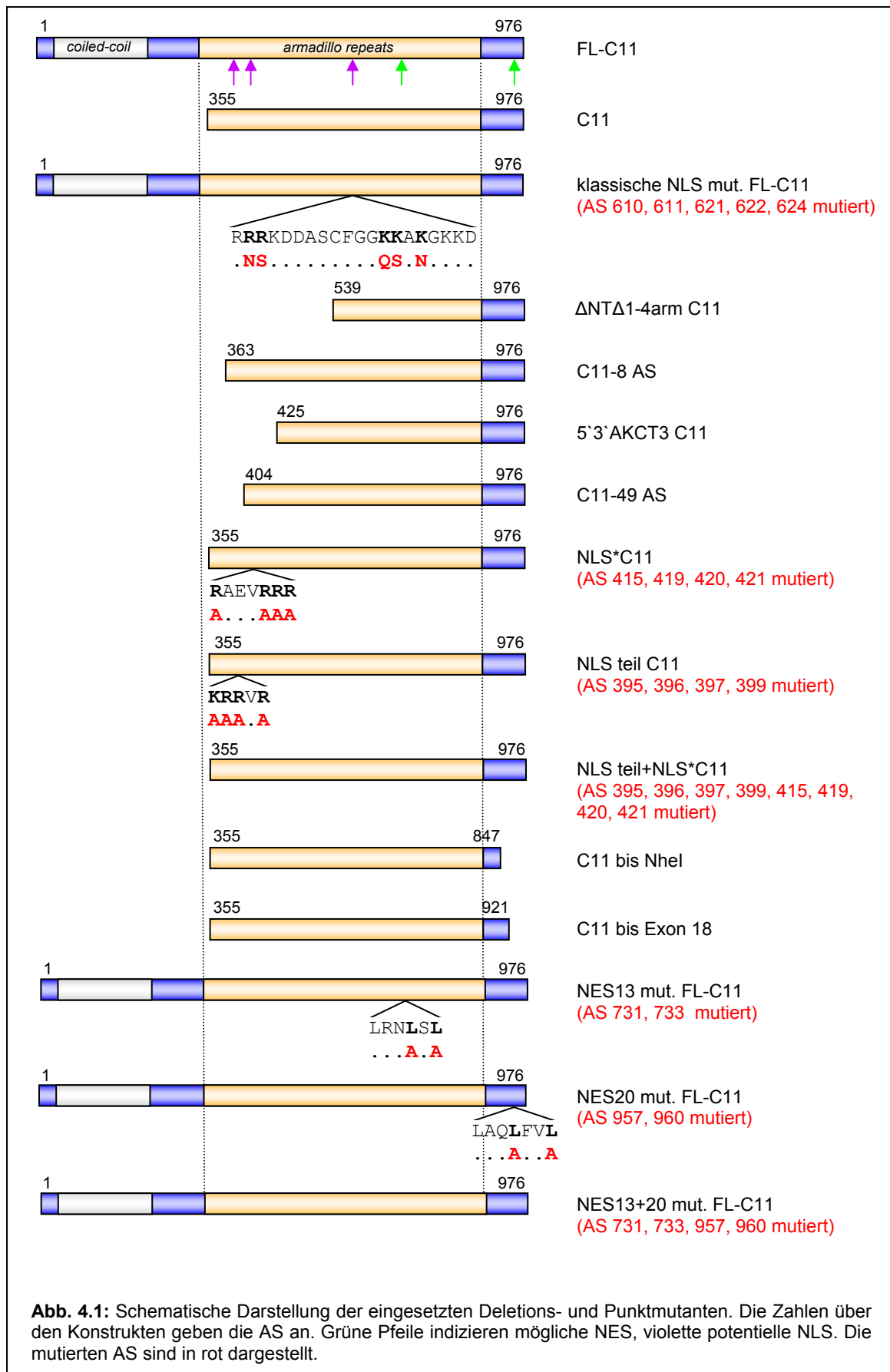
Aufgrund dieser Ergebnisse kann für mARVCF von einem aktiven Mechanismus ausgegangen werden, der sowohl den Import des Proteins in den Zellkern, als auch einen effektiven Export bedingt.

Mit Hilfe von Deletions- und Punktmutanten sollte nun die potentielle Beteiligung der NLS und NES Motive des murinen ARVCF an den identifizierten Im- und Exportmechanismen überprüft werden. Abb. 4.1 zeigt schematisch die zu diesem Zweck eingesetzten mARVCF Konstrukte. Die Clonierung aller Konstrukte erfolgte in den Vector pEGFP-C2 oder -C3 und ist in Kap. 4.4 aufgeführt.

4.1.1 NES (*nuclear export signal*)

Durch computergestützte Analyse der mARVCF cDNA Sequenz konnten zwei potentielle NES identifiziert werden, die in Exon 13 bzw. Exon 20 des murinen ARVCF lokalisieren (Abb. 4.1).

Um zunächst die Funktion des NES in Exon 20 zu untersuchen, wurden die Konstrukte C11 bis NheI (AS 355-847) und C11 bis Exon 18 (AS 355-921) im Vector pEGFP-C2 in COS-7 und MCF7 Zellen transfiziert und die Lokalisation der Deletionsmutanten fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Beide Konstrukte verfügen über das NES in Exon 13, sind jedoch um das NES in Exon 20 deletiert. Da beide Konstrukte deutlich im Zellkern lokalisieren, konnte zunächst von einem funktionellen NES in Exon 20 ausgegangen werden. Um eine eindeutige Aussage über die Funktionalität dieses Exportsignals treffen zu können, wurden in mARVCF FL-C11 die Leuzine an Position 957 und 960 durch Alanine ersetzt. Nach Expression des Konstruktes NES 20 mut. FL-C11 im EGFP-Vector in COS-7 und MCF7 Zellen, zeigte sich jedoch lediglich eine inhomogene Lokalisation an der Membran und im Kern (Abb. 4.2Bc). Mutation des zweiten NES in Exon 13 (Konstrukt NES 13 mut. FL-C11) führte ebenfalls zu einer inhomogenen Lokalisation der Punktmutante sowohl an der Plasmamembran, als auch im Cytoplasma oder im Zellkern (Abb. 4.2Bd). Erst die Mutation beider NES Sequenzen in Exon 13 und Exon 20 führte zu einer einheitlichen Lokalisation des Konstruktes NES13+20 mut. FL-C11. Durch den Austausch aller vier Leuzine durch Alanine konnte mARVCF FL-C11 vollständig im Zellkern zurückgehalten werden (Abb. 4.2Be).



Die durchgeführten Punktmutationen des NES in Exon 20 und 13 sind in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

4.1.2 NLS (*nuclear localisation signal*)

Wie bereits erwähnt, verfügt mARVCF in einer sog. *loop-out* Struktur in der *armadillo repeat* Region über ein bipartites NLS, welches an dieser Stelle charakteristisch für die Gruppe der p120(ctn) verwandten Proteine ist. Die endogene Lokalisation von ARVCF u.a. im Zellkern (Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000) und die Möglichkeit, mARVCF durch die Behandlung mit LMB im Kern zurückzuhalten (Abb. 4.2Ad und Be), legen die Vermutung eines aktiven Importes des Proteins in den Zellkern nahe. Um die mögliche Rolle des NLS zwischen AS 609 und 628 bei diesem Prozeß zu untersuchen, wurde eine Punktmutante von mARVCF FL-C11 angefertigt, bei der die, für die Importfunktion wichtigen basischen AS mutiert wurden (Abb. 4.1). Nach Clonierung in den Vector pEGFP-C2 wurde das Konstrukt in COS-7 bzw. MCF7 transfiziert und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Um zu überprüfen, ob der Kernimport des Konstruktes durch die Mutation verhindert werden kann, wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, mit LMB behandelt. Es konnte gezeigt werden, daß die Mutation der indizierten AS keinen Einfluß auf die Lokalisation von mARVCF hat, da dieses Konstrukt, wie der wild-Typ (Abb. 4.2A und B) in der Lage ist, an der Plasmamembran der Zellen zu lokalisieren und nach LMB-Behandlung im Zellkern zurückgehalten werden kann. Somit scheint der Import von mARVCF, wie der von p120(ctn) (Mariner et al., 2000) und der Plakophiline (Schmidt et al., 1997; Klymkowsky, 1999) unabhängig von dieser klassischen bipartiten Robbins und Dingwald *nuclear-targeting* Domäne (Robbins et al., 1991) zu sein.

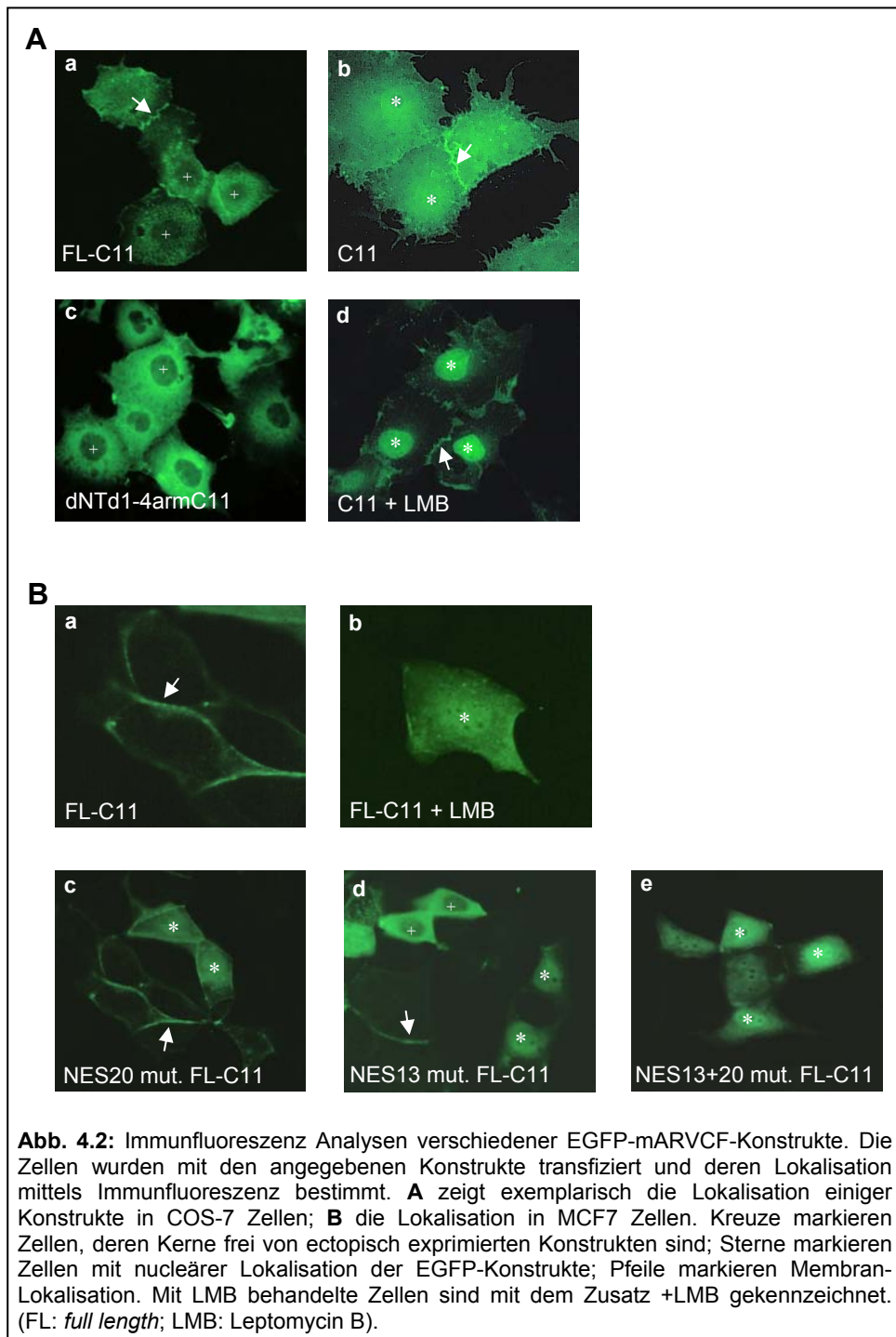
Um die AS-Sequenz in mARVCF zu ermitteln, die möglicherweise als NLS fungiert und somit einen Import des Proteins in den Zellkern vermittelt, wurden verschiedene Deletions- und Punktmutanten angefertigt (Abb. 4.1). Die von U. Kaufmann clonierte Deletionsmutante $\Delta\text{NT}\Delta\text{1-4arm}$ (AS 539-976) lokalisiert als EGFP-Fusion in COS-7 Zellen deutlich im Cytoplasma (Abb. 4.2Ac); da die für eine Interaktion mit den Cadherinen wichtigen *armadillo repeats* 1-4 deletiert sind, ist das Konstrukt nicht in der Lage, mit endogenem Cadherin in den COS-7 Zellen zu interagieren. Eine Translokation des Konstruktes in den Zellkern blieb jedoch ebenfalls aus (Abb.

4.2Ac). Im Gegensatz dazu zeigte das Konstrukt C11-8AS (AS 363-976) im pEGFPC2-Vector nach Transfection in COS-7 Zellen eine deutliche Kernlokalisierung, vergleichbar mit der Lokalisation von mARVCF nach LMB Behandlung (Abb. 4.2Ad und Be); das EGFP-Fusionsprotein 5'3'AKCT3 C11 lokalisierte hingegen nicht im Kern. Somit konnte die für einen Kernimport relevante Region von mARVCF auf die AS 363-404 eingegrenzt werden. Nach computergestützter Analyse der AS 363-404, die die so unterschiedlich lokalisierenden Konstrukte nicht gemeinsam haben, konnten zwei *cluster* basischer AS ausgemacht werden, die möglicherweise als NLS fungieren können (NLS* und NLS teil; vgl. Abb. 4.1). Abb. 4.1 zeigt eine schematische Übersicht über die unterschiedlichen putativen NLS in ARVCF.

Die Punktmutation von basischen AS sowohl der NLS* als auch der NLS teil (siehe Abb. 4.1) und die Deletion der NLS teil (Konstrukt C11-49AS; AS 404-976) bewirkte eine inhomogene Lokalisation der Konstrukte, vergleichbar der in Abb. 4.2Bd gezeigten Lokalisation. Dies führte zur Vermutung, daß beide basische Sequenzen für den Import vom mARVCF in den Zellkern benötigt werden. Die Existenz von zwei verschiedenen NLS-Sequenzen in einem Protein, die beide zusammen für einen effektiven Kernimport eines Moleküls benötigt werden, ist aus der Literatur bekannt (Haffar et al., 2000).

Dadurch erschien es sinnvoll, ein Konstrukt anzufertigen, bei dem sowohl NLS* als auch NLS teil durch Punktmutation der basischen AS verändert sind. Nach Transfection des Konstruktes NLS teil+NLS* im Vector pEGFP-C2 in COS-7 Zellen konnte jedoch nur die gleiche inhomogene Lokalisation des Konstruktes an der Plasmamembran, im Cytoplasma und im Zellkern ausgemacht werden.

Abb. 4.2 zeigt exemplarisch die Lokalisation einiger oben aufgeführter Konstrukte.



Zusammenfassend lässt sich festhalten, daß mARVCF einem aktiven Ex- und Import Mechanismus zwischen Zellkern und Cytoplasma bzw. Membran unterliegt.

Der Proteinexport aus dem Zellkern kann durch LMB, einem den CRM1-vermittelten Export inhibierenden Agens, in COS-7 und MCF7 Zellen vermindert werden. Dieser

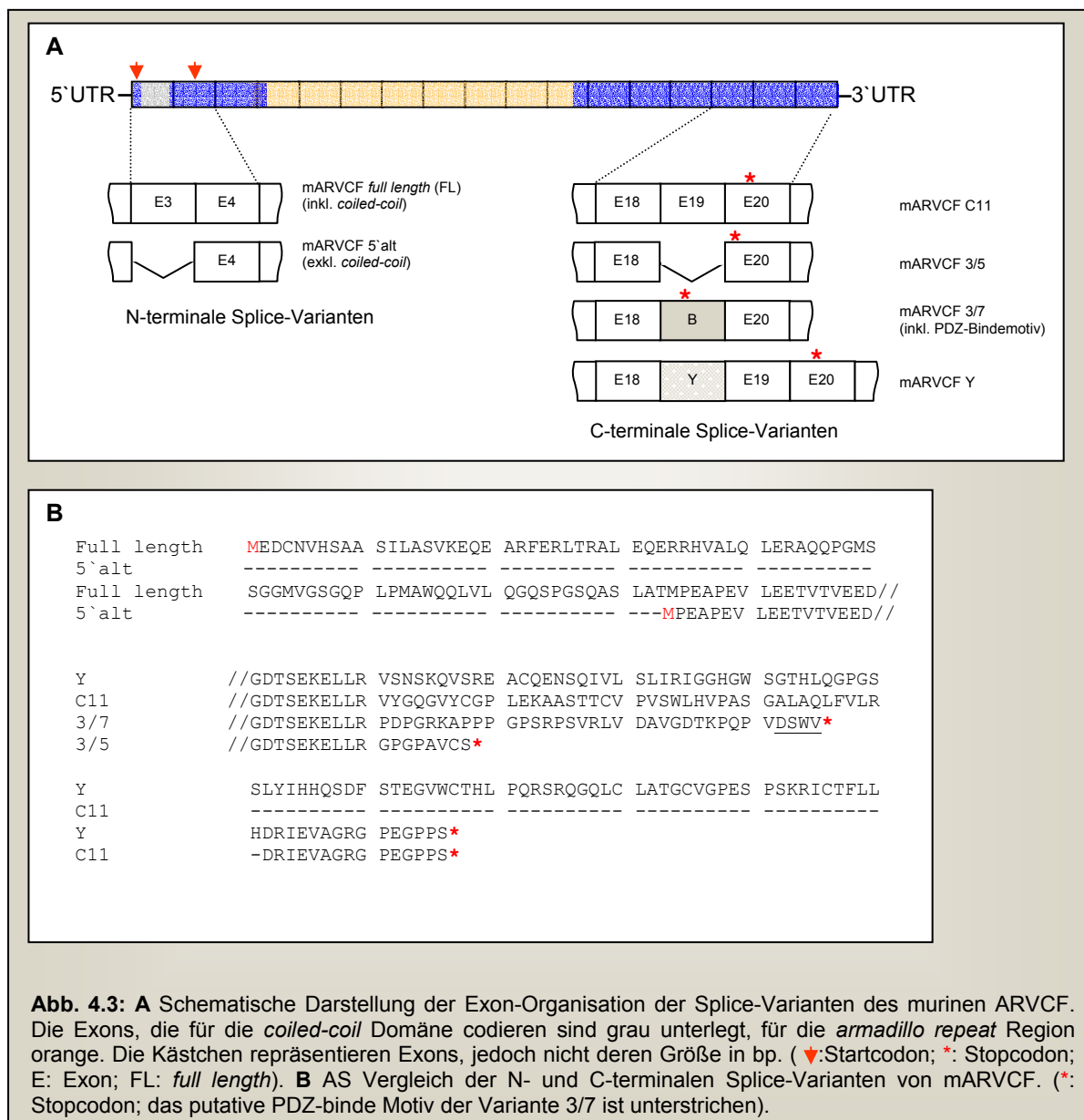
Export scheint durch zwei NES-Sequenzen in Exon 13 und Exon 20 vermittelt zu werden und kann durch deren Mutation blockiert werden.

Der Import von mARVCF in den Nucleus erfolgt, wie bei der Gruppe der p120(ctn) verwandten Proteine üblich, nicht (oder nicht ausschließlich) mittels einer konservierten bipartiten Robbins und Dingwald *nuclear-targeting* Domäne (Robbins et al., 1991). Zwei *cluster* basischer AS zwischen AS 395 und 421 sind nach Mutation zwar in der Lage, die Lokalisation vom mARVCF zu verändern, blockieren einen Import von mARVCF jedoch nicht. Somit konnte trotz der Herstellung zahlreicher Punkt- und Deletionsmutanten des murinen ARVCF die für den Kernimport des Moleküls verantwortliche Proteinsequenz nicht identifiziert werden.

4.2 Clonierung und Charakterisierung der mARVCF Splice-Varianten

4.2.1 Expression muriner ARVCF mRNA

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine der in unserer Arbeitsgruppe (A. Schäfer, 2000) identifizierten Splice-Varianten präferentiell exprimiert wird. Abb. 4.3 zeigt schematisch die Exon-Organisation und einen AS Vergleich der Splice-Varianten. Die Exon-Numerierung wurde vom humanen ARVCF (Sirotkin et al., 1997) und dem Vergleich mit dem humanen genomischen Clon AC005663 abgeleitet. Aus diesem Grund folgt in der murinen Sequenz Exon 11 auf Exon 9, da ein dem humanen Exon 10 vergleichbares murines Exon bislang nicht identifiziert wurde.



Zwei verschiedene N-Termini wurden identifiziert. Beim alternativen 5'-Ende von mARVCF (5'alt) ist Exon 3 herausgespliced. Somit verfügt diese Variante weder über die *coiled-coil* Domäne der *full length*-Version (FL), noch über das Startcodon in Exon 3. Das erste Methionin im Leseraster in Exon 4 dient dieser Isoform als Translationsstart. Im C-Terminus konnten zusätzlich zur bereits bekannten Variante C11, drei weitere Isoformen ausgemacht werden. In Variante 3/5 ist Exon 19 herausgespliced. Dadurch kommt es zu einem veränderten offenen Leserahmen zwischen Exon 18 und 20 und somit zur Generation eines früheren Stopcodons in dieser Splice-Variante. In Isoform 3/7 ist Exon 19 durch das 120 nt lange Exon B ersetzt. Dieses alternative Exon liefert zum einen das Stopcodon dieser Variante und zum anderen das PDZ-Bindemotiv DSWV. Der längste offene Leserahmen von mARVCF wird durch Isoform Y codiert, bei der das 273 nt lange Exon Y zwischen Exon 18 und 19 im Leseraster eingefügt wird (vgl. Abb. 4.3).

Um die relativen Mengen der N- und C-terminalen Varianten zu ermitteln wurden RT-PCR Analysen durchgeführt, bei denen cDNA von i28 Mausmyoblasten (30 h zur Fusion induziert), CMT-Zellen (murine Colocarzinom Zellen) und murines Herzgewebe als Matritze dienten. Zur Diskriminierung der beiden N-terminalen Isoformen wurden *Primer* aus dem 5'-UTR und Exon 6 gewählt (ARVCF 5'UTR Zoe/R80); die dabei entstehenden Fragmente unterscheiden sich um 231 bp. Wie in Abbildung 4.4A zu erkennen, ist die Variante *full length* (FL), die die *coiled-coil* Domäne mit einschließt, in i28, CMT Zellen und Herzgewebe gegenüber der Variante 5'alt stark überrepräsentiert. Mit dem *Primer*paar UP6 (Exon 15) und AKCT3 (Exon 20) sollten die vier C-terminalen Splice-Varianten C11, 3/5, 3/7 und Y relativ zueinander quantifiziert werden (Abb. 4.4B). In murinem Herzgewebe und CMT Zellen zeigt sich, daß die Varianten Y und 3/5 geringer amplifiziert werden können als Varianten C11 bzw. 3/7. In i28 Zellen scheint die mARVCF Isoform 3/5 etwas stärker exprimiert zu werden als in den beiden anderen untersuchten Zelllinien bzw. Geweben; die Splice-Form Y ist in den Mausmyoblasten im Vergleich zu den drei anderen Formen kaum nachweisbar. Da sich die Isoformen C11 und 3/7 auf cDNA Ebene um nur 28 Nukleotide unterscheiden, war es mit der in Abb. 4.4B dargestellten RT-PCR nicht möglich, die beiden Splice-Produkte zu diskriminieren.

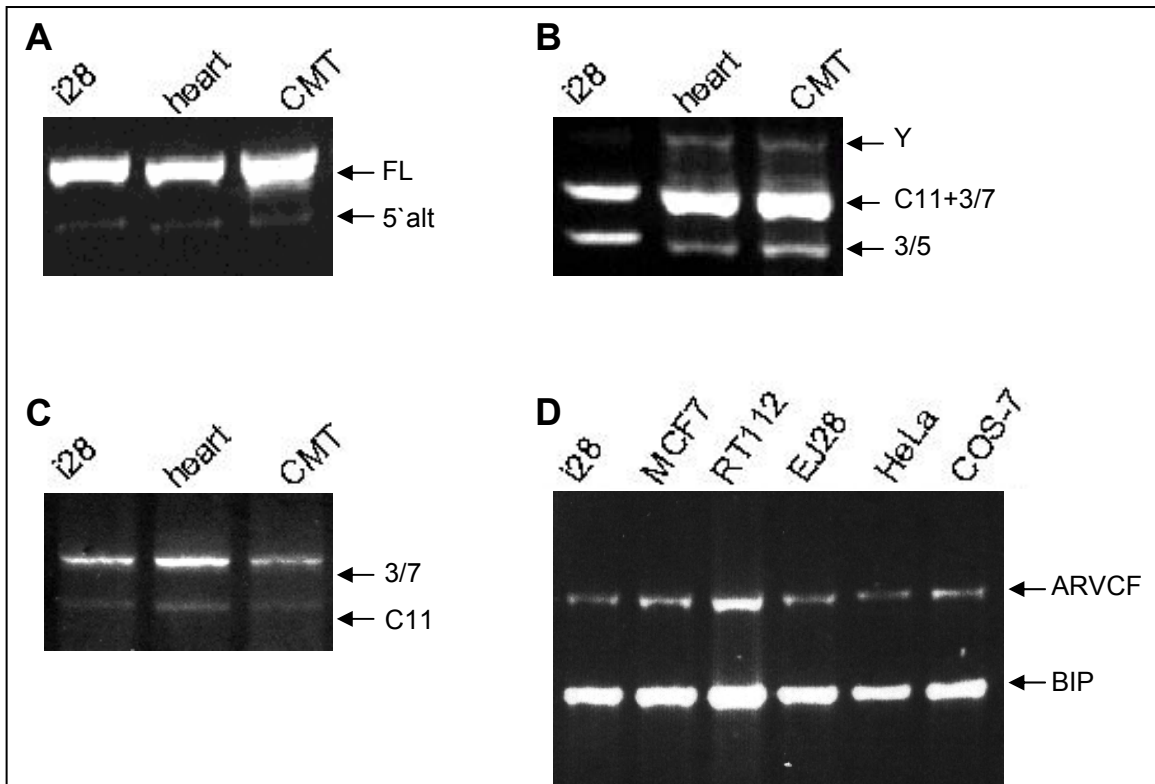


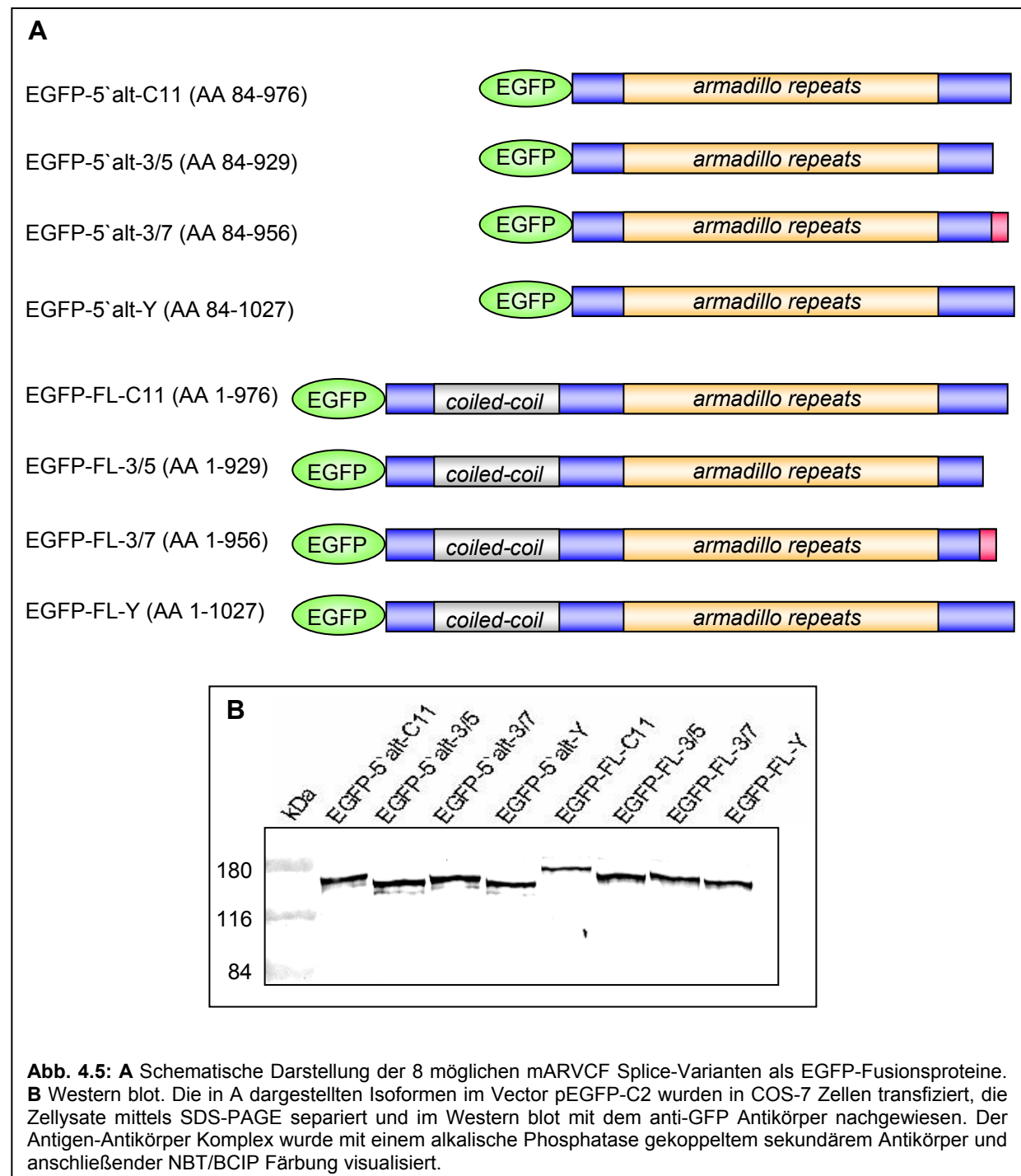
Abb. 4.4: RT-PCR Analysen. mRNA aus i28 Maus Myoblasten (i28), Mausherz (*heart*) und Maus Colocarzinomzellen (CMT) wurde isoliert und als Matritze für die Analysen in **A** bis **C** eingesetzt. **A** um die beiden N-terminalen mARVCF Splicevarianten (FL: *full length*; 5'alt: 5'alternatives Ende) zu diskriminieren wurde ein *sense Primer* aus dem 5'UTR und ein *antisense Primer* aus Exon 6 eingesetzt. **B** alle vier oben angegebenen C-terminalen Splicevarianten von mARVCF wurden mit einem *sense Primer* aus Exon 15 und einem *antisense Primer* aus Exon 20 amplifiziert. **C** um die Varianten 3/7 und C11 mittels RT-PCR in einem Agarosegel unterscheiden zu können, wurde eine PCR mit drei verschiedenen *Primern* durchgeführt: einem *sense Primer* aus Exon 15 und je einem *antisense Primer* aus Exon B und Exon 19. **D** RT-PCR mit mRNA aus den angegebenen Zelllinien mit einem *Primerpaar* spezifisch für ARVCF in der *armadillo repeat* Region und einem zweiten *Primerpaar* spezifisch für das Haushaltsgen BIP (*binding protein*).

Um trotzdem eine Aussage über die relativen Mengen der vorhandene mRNAs treffen zu können, wurde eine weitere PCR mit drei verschiedenen *Primern* durchgeführt. Ein *sense Primer*, spezifisch für Exon 15 (UP6) wurde zusammen mit den *antisense Primern* Ex B as (spezifisch für das 3'-Ende von Exon B) und Ex 19 as (spezifisch für das 5'-Ende von Exon 19) eingesetzt. Die dabei entstehenden PCR-Produkte der Isoformen C11 und 3/7 unterscheiden sich dadurch um 47 Nukleotide, was in einem Agarosegel sichtbar gemacht werden kann. Der Exon 19 spezifische *Primer* ist dabei auch in der Lage, die Isoform Y zu amplifizieren, was jedoch durch deren geringes Vorhandensein nicht ins Gewicht fällt und die Ergebnisse nicht beeinträchtigt. Abb. 4.4C zeigt, daß sowohl im Herzgewebe, als auch in i28 und CMT Zellen die mRNA bzw. cDNA der Splice-Variante 3/7, die dem humanen ARVCF

entspricht und als einzige Variante für das putative PDZ-Bindemotiv DSWV codiert (vgl. Abb 4.3), stärker vertreten ist als die, der Variante C11.

4.2.2 Clonierung und Expression der mARVCF Splice-Varianten

Um die Splice-Produkte des murinen ARVCF weiter analysieren zu können und eine Aussage über deren subcelluläre Lokalisation zu treffen, war es notwendig, die Fragmente der Isoformen in voller Länge zu clonieren und mit einem *tag* zu versehen.



Wie für p120(ctn) (Keirsebilck et al., 1998), liegt auch für mARVCF keine Information darüber vor, in welcher Kombination die N- und C-terminalen Splice-Varianten endogen exprimiert werden. Die im Vector pGEM®-T Easy vorliegenden Fragmente der mARVCF Splice-Varianten wurden wie unter Kap. 4.4 aufgeführt in den Vector pEGFP-C2 cloniert. Zur Kontrolle der Expression der in den Vector pEGFP-C2 clonierten putativen 8 Varianten, wurden diese in COS-7 Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Proteinextrakte mittels SDS-PAGE separiert (20 µg pro Spur) und im Western blot mit dem monoclonalen anti-GFP Antikörper (Fa. Clontech) nachgewiesen. Abbildung 4.5B zeigt, dass alle Konstrukte in vergleichbaren Mengen exprimiert werden und die korrekten Größen aufweisen (zuzüglich des EGFP-tags von etwa 27 kDa).

4.2.3 Einfluß des zellulären Kontexts auf die Lokalisation der mARVCF Splice-Varianten

Von U. Kaufmann konnte gezeigt werden, daß der mARVCF Clon C11 (AS 355-976) mit der cytoplasmatischen Domäne von M- und E-Cadherin interagieren kann. Außerdem colokalisiert der Clon C11 mit N-Cadherin in Ratten Cardiomyocyten (Kaufmann et al., 2000). Durch Coimmunpräzipitationen konnte für humanes ARVCF ebenfalls eine Assoziation mit E-Cadherin nachgewiesen werden (Mariner et al., 2000). Durch GST-Interaktionsstudien wurde gezeigt, daß die *armadillo repeat* Region von mARVCF für diese Anbindung an die Cadherine verantwortlich ist (Kaufmann et al., 2000). Im Hinblick darauf war es von Interesse, den möglichen Einfluß der durch alternatives Splicen veränderten N- und C-Termini von mARVCF auf dessen Lokalisation und Interaktion mit den Cadherinen zu untersuchen. Die acht verschiedenen mARVCF Isoformen wurden als EGFP-Konstrukte in sechs verschiedene Zelllinien transfiziert, die sich u.a. hinsichtlich ihres Cadherin-Besatzes unterscheiden. Zuvor wurde mittels RT-PCR sicher gestellt, daß alle verwendeten Zelllinien endogen ARVCF mRNA exprimieren. Dazu wurde mit den *Primern* UP3 und 10R die nicht bzw. am wenigsten durch alternatives Splicen modifizierte *armadillo repeat* Region amplifiziert (992 bp); als endogene Kontrolle wurde in der gleichen PCR jeweils das Haushaltsgen BiP (*binding protein*) amplifiziert. Abb. 4.4D zeigt, daß alle Zelllinien, die in den weiteren Experimenten Verwendung fanden, mRNA exprimieren, die für ARVCF codiert.

24 h nach Transfection der EGFP-Varianten wurden die Zellen mit PFA fixiert und das jeweilige endogene Cadherin mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt. In i28 Mausmyoblasten, aus denen die mARVCF Isoformen ursprünglich isoliert wurden, zeigten alle Splice-Formen eine Colokalisation mit endogenem M-Cadherin an der Plasmamembran bzw. den Zell-Zell Kontaktstellen. Die Zellkerne sind frei von ectopisch exprimiertem mARVCF (Abb. 4.6 A, Ai, Am).

Um die subcelluläre Lokalisation der mARVCF Isoformen in Zellen mit endogenem E-Cadherin zu untersuchen, wurden die nicht-invasiven Zelllinien MCF7 (Mammakarzinom Zellen) und RT112 (Blasenkarzinom Zellen) mit den EGFP-Konstrukten transfiziert. In beiden Zelllinien colokalisierten alle EGFP-Splice-Varianten eindeutig mit E-Cadherin an der Plasmamembran (Abb. 4.6B, Bi, Bm und C, Ci, Cm). Diese Daten legen die Vermutung nahe, daß alle Isoformen in der Lage sind sowohl mit M-, als auch E-Cadherin zu assoziieren.

Im Gegensatz zu MCF7 und RT112 Zellen exprimieren die invasiven Blasenkarzinom Zellen EJ28 kein E-Cadherin sondern N-Cadherin (Abb. 4.6Di). Nach Transfection der EGFP-Isoformen konnte in dieser Zelllinie keine der Varianten eindeutig an der Membran detektiert werden (Abb. 4.6D), obwohl endogenes N-Cadherin dort lokalisiert (Abb. 4.6Di). Alle alternativen mARVCF Formen zeigten vielmehr eine diffuse Verteilung über das gesamte Cytoplasma. Transfection von ebenfalls N-Cadherin positiven (Abb. 4.6Ei), E-Cadherin negativen HeLa Zellen (Cervixcarcinom Zellen) führte demgegenüber zu einer komplett anderen Lokalisation von mARVCF. Alle Isoformen colokalisieren deutlich mit endogenem N-Cadherin an den Stellen des Zell-Zell Kontaktes (Abb. 4.6E, Em).

Abschließend wurde die Affennieren Zelllinie COS-7, die über ein endogenes, mit dem anti-pan-Cadherin Antikörper zu detektierendes Cadherin verfügt (Abb. 4.6Fi), mit den EGFP-Konstrukten transfiziert. Alle mARVCF Varianten colokalisierten klar mit endogenem Cadherin an Zell-Zell Kontaktstellen (Abb. 4.6F, Fm).

Als Kontrolle wurden alle sechs Zelllinien mit dem leeren pEGFP-C2-Vector transfiziert (Abb. 6A-F-co). Die in Abb. 4.6 dargestellten Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen repräsentativ die Ergebnisse mit FL-3/7. Alle weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

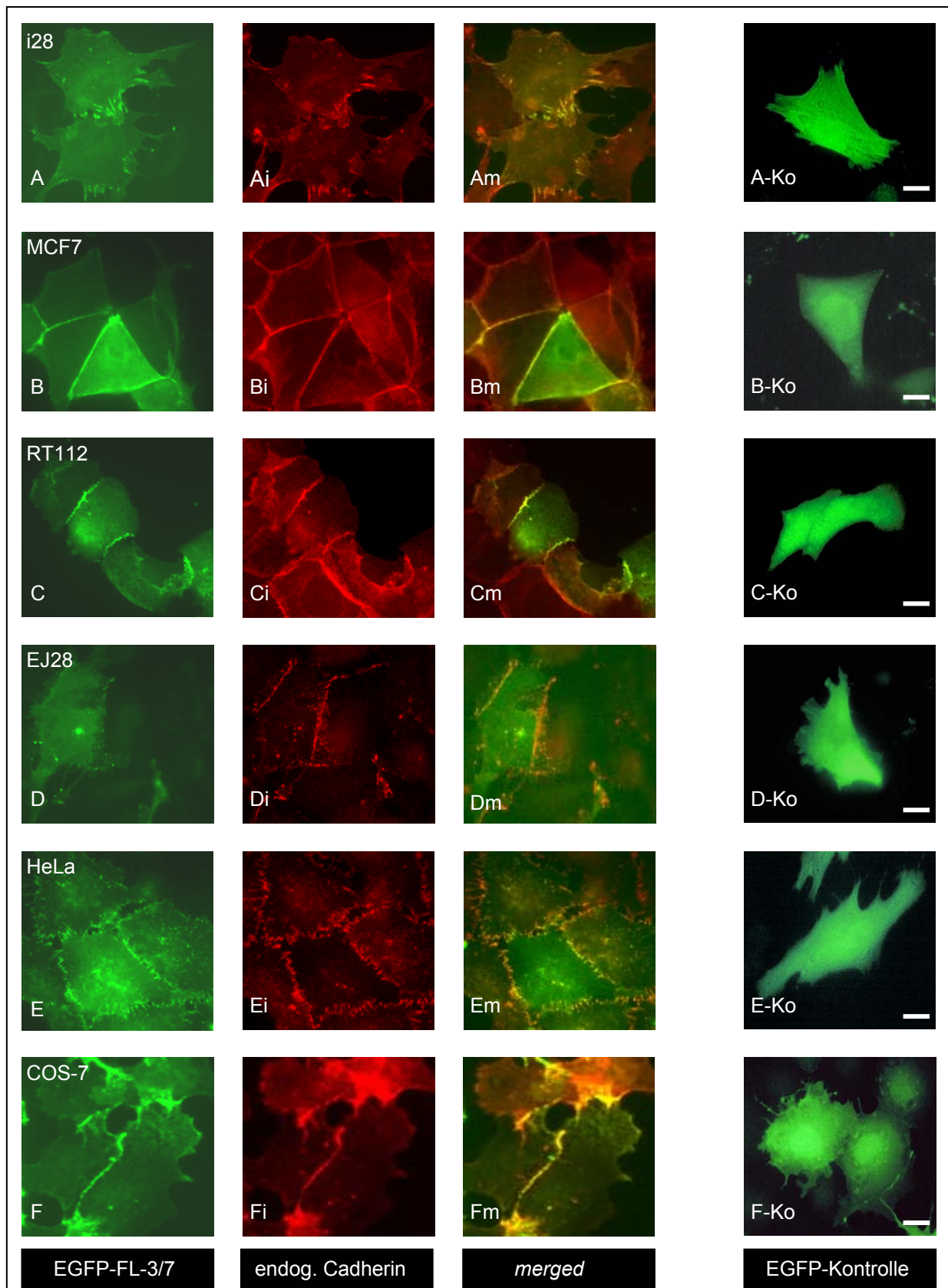


Abb. 4.6: Immunfluoreszenz Analysen. Exemplarisch für die subzelluläre Lokalisation aller mARVCF Splicevarianten ist hier die Lokalisation der Variante FL-3/7 in den oben angezeigten Zelllinien angegeben (**A-F**). In **Ai bis Fi** ist das jeweilige endogene Cadherin angefärbt; **Am bis Fm** zeigt die überlagerten Bilder aus **A-F** und **Ai-Fi**. In **A-Ko bis F-Ko** wurden die angegebenen Zelllinien als Kontrolle mit dem leeren pEGFP-C2 Vector transfiziert. Balken: 10 μm.

Es läßt sich also sagen, daß die durch alternatives Splicen modifizierten N- und C-Termini von mARVCF keinen Einfluß auf dessen subzelluläre Lokalisation bzw. Colokalisation mit den Cadherinen haben. Allerdings scheint der zelluläre Kontext, in dem eine Assoziation von mARVCF mit N-Cadherin stattfindet, einen erheblichen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit beider Proteine zu haben.

4.2.4 Unterschiedliche Interaktion von mARVCF mit E-, M- und N-Cadherin

Um festzustellen, ob mARVCF generell direkt an die cytoplasmatischen Domäne aller drei Cadherine binden kann, wurden *in vitro* GST-Interaktionsstudien durchgeführt. Die zwei prominentesten mARVCF Splice-Varianten FL-C11 und FL-3/7 wurden in den Vector pcDNA3.1 cloniert und als Matritze zur *in vitro* Transkription und Translation mit 35 S-Methionin eingesetzt (Abb. 4.7 Spur 1 und 2). Die cytoplasmatischen Domänen von E-, M- und N-Cadherin wurden in den Vector pGEX 5X1 cloniert und als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert. Die korrekte Expression wurde durch die Aufreinigung der Fusionsproteine, Separation mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau Färbung kontrolliert.

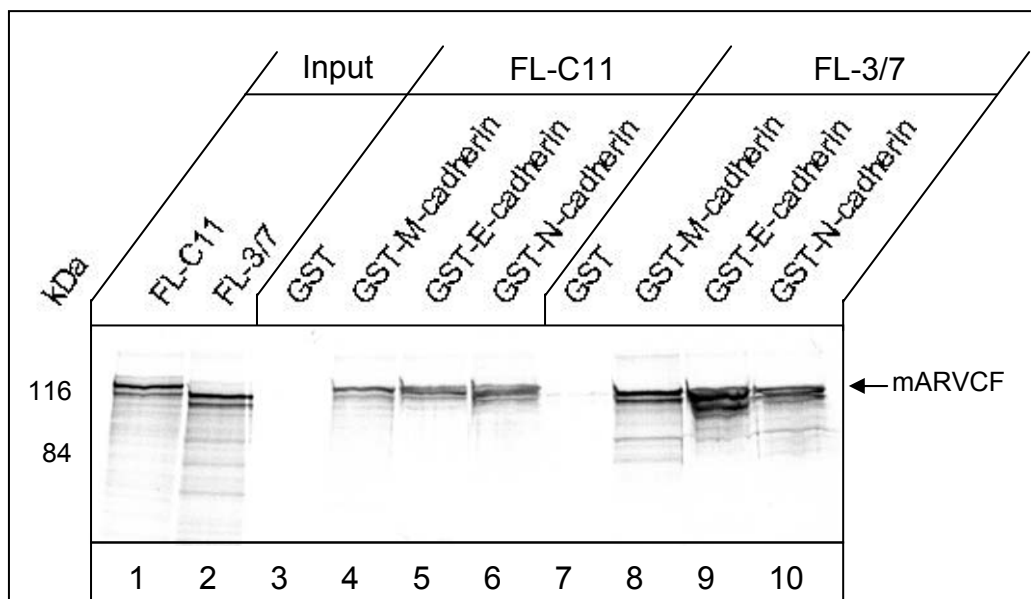


Abb. 4.7: *In vitro* GST-Interaktionsstudie. Die radioaktiv markierten mARVCF Splicevarianten FL-C11 (Spur 1) und FL-3/7 (Spur 2) wurden mit der CPD von M-Cadherin (Spur 4 und 8), E-Cadherin (Spur 5 und 9) oder N-Cadherin (Spur 6 und 10) als GST-Fusionsproteine inkubiert. Als Negativkontrolle wurde FL-C11 (Spur 3) und FL-3/7 (Spur 7) mit unfusioniertem GST inkubiert. (FL: *full length*, GST: Glutathion-S-Transferase).

Nach Inkubation der *in vitro* translatierten mit den bakteriell exprimierten Proteinen konnte gezeigt werden, daß beide mARVCF Isoformen in der Lage sind, in gleichem Maß an die cytoplasmatischen Domänen aller drei Cadherine zu binden (Abb. 4.7 Spur 4-6 und 8-10). Als Kontrolle wurden die ³⁵S-markierten Varianten FL-C11 (Abb. 4.7 Spur 3) und FL-3/7 (Abb. 4.7 Spur 7) mit unfusioniertem GST inkubiert. Somit gelang der Nachweis, daß mARVCF in der Lage ist, direkt mit der CPD von N-Cadherin zu assoziieren und damit, daß die in Abb. 4.6 gezeigte, unterschiedliche Lokalisation von mARVCF in N-Cadherin exprimierenden Zellen nicht durch eine generelle Bindungsunfähigkeit der beiden Proteine bedingt ist.

Um das Bindeverhalten der mARVCF Splice-Varianten an die CPD der Cadherine in verschiedenen Zelllinien weiter zu untersuchen, wurde das MOM (*mitochondrial outer membrane recruitment assay*) eingesetzt. Dieses System bietet die Möglichkeit, die Interaktion zwischen zwei Proteinen direkt in Säugerzellen zu testen (Waibler, 1998; Kaufmann et al., 2000). Dazu wird der eine potentielle Interaktionspartner (in diesem Fall die CPD der Cadherine) in den MOM-Vector cloniert, wodurch ein Birkenprofilin (BP) *getagtes* Fusionsprotein entsteht, welches durch den N-terminalen TOM70-Anker das gesamte Fusionsprotein in die äußere Mitochondrienmembran dirigiert. Zeigt nach Cotransfection des potentiellen Interaktionspartners (in diesem Fall die mARVCF Splice-Varianten) dieser das gleiche mitochondriale Verteilungsmuster, kann von einer Interaktion der beiden Proteine ausgegangen werden.

Wie in Abb. 4.8 exemplarisch für FL-C11 und MOM-M-Cadherin dargestellt, waren alle 8 mARVCF Isoformen vergleichbar in der Lage, an MOM-M-Cadherin und MOM-E-Cadherin in allen 6 untersuchten Zelllinien zu binden. In MCF7 Zellen wurde jedoch die Membran-assoziierte Lokalisation der mARVCF Splice-Varianten durch die Cotransfection der MOM-Konstrukte nicht komplett aufgehoben (Abb. 4.8B, Bi), wie dies in den anderen Zelllinien der Fall ist. Dies läßt eine starke Bindung von mARVCF an das endogene, in der Membran verankerte, E-Cadherin vermuten und eine Konkurrenz mit den ectopischen MOM-Konstrukten. Um die Spezifität der gezeigten Interaktionen zu verifizieren, wurden alle drei MOM-Konstrukte in alle 6 Zelllinien mit dem leeren pEGFP-C2-Vector cotransfiziert (exemplarisch in Abb. 4.8Ko, Koi für MOM-M-Cadherin und FL-C11 in COS-7 Zellen dargestellt).

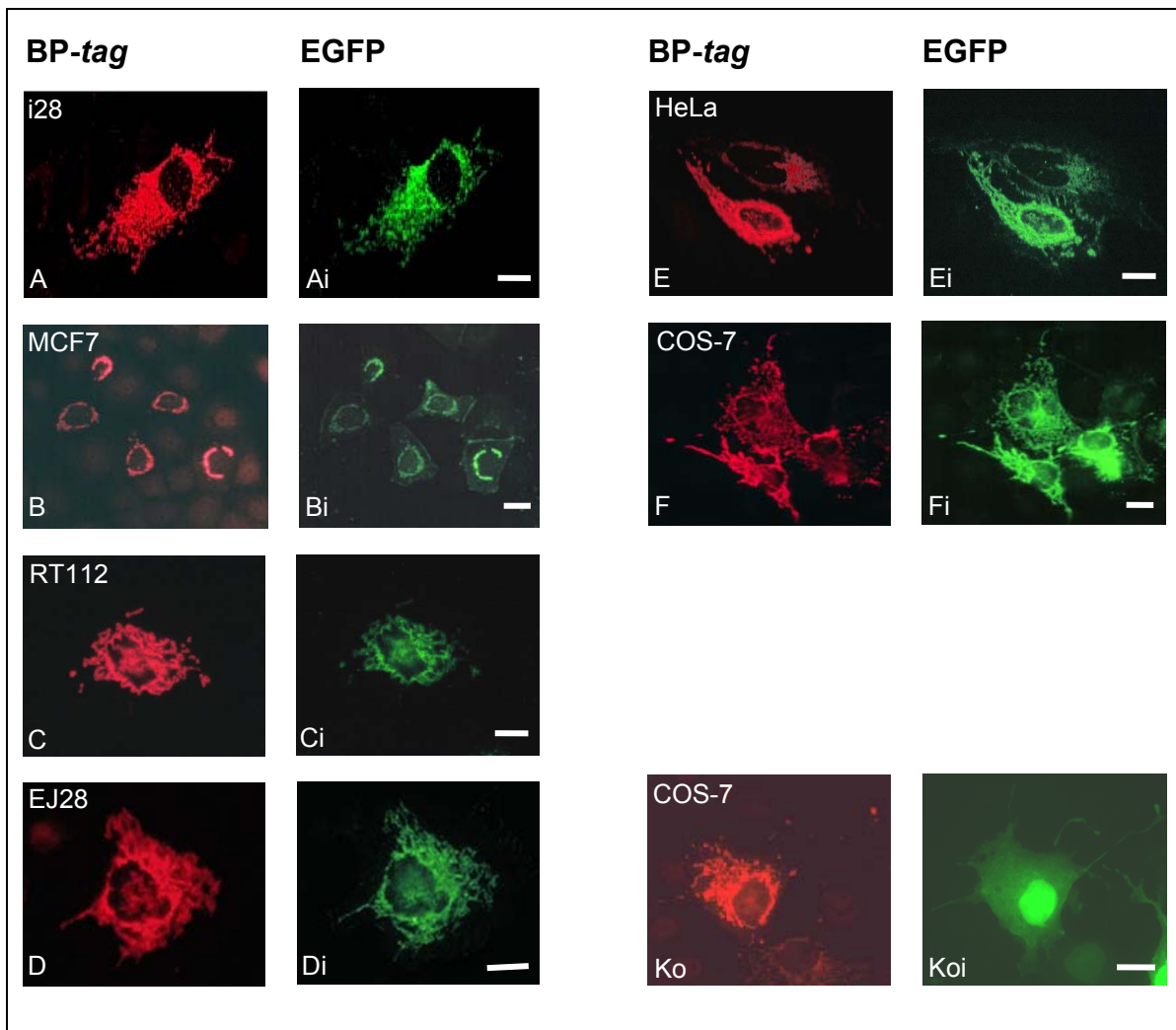
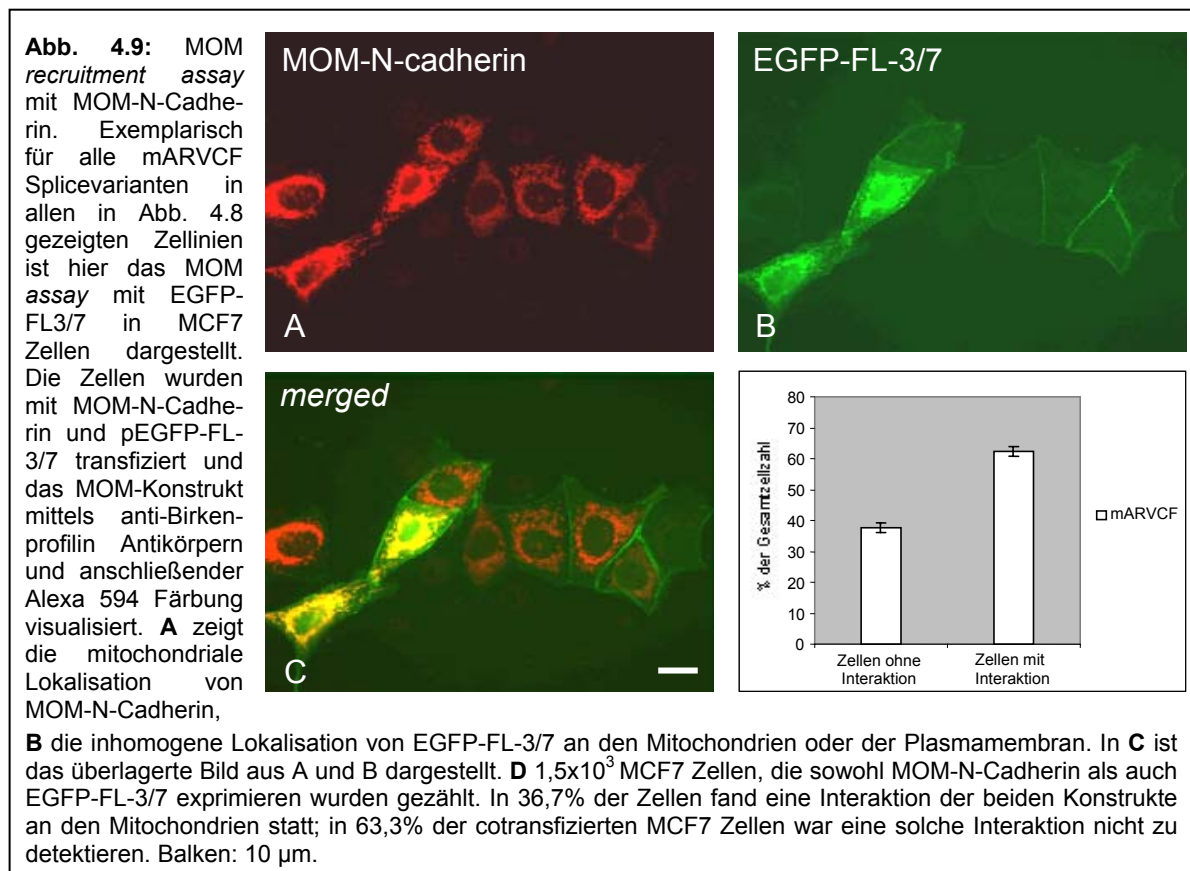


Abb. 4.8: MOM recruitment assay. Exemplarisch für alle mARVCF Splice-Varianten im MOM assay mit MOM-M- und MOM-E-Cadherin sind hier Immunfluoreszenz Analysen mit EGFP-FL-C11 und MOM-M-Cadherin dargestellt. Die angegebenen Zelllinien wurden mit MOM-M-Cadherin und pEGFP-FL-C11 transfiziert und das MOM-Konstrukt durch anti-Birkenprofilin Antikörpern (BP) und anschließender Alexa 594 Färbung visualisiert. **A bis F** zeigen dabei die mitochondriale Lokalisation von MOM-M-Cadherin und **Ai bis Fi** die Lokalisation von EGFP-FL-C11 an den Mitochondrien. Als Kontrolle wurden die Zelllinien mit dem jeweiligen MOM-Konstrukt und dem leeren pEGFP-C2 Vector transfiziert. In **Ko** und **Koi** ist dies am Beispiel von MOM-M-Cadherin in COS-7 Zellen gezeigt. Balken: 10 μ m.

Der murine ARVCF Clon C11 colokalisiert mit N-Cadherin in Cardionmyocyten, was eine Assoziation beider Proteine nahe legt (Kaufmann et al., 2000). In den hier beschriebenen Experimenten ist mARVCF zwar in der Lage *in vitro* an die CPD von N-Cadherin zu binden, wie an die der anderen untersuchten Cadherine, zeigt sich aber hinsichtlich der subcellulären Lokalisation in N-Cadherin-positiven Zellen uneinheitlich. Auf Grund dessen war es von Interesse, das Bindeverhalten der beiden Proteine in den verschiedenen Zelllinien mit Hilfe des MOM-Systems zu untersuchen.

Nach Cotransfection von MOM-N-Cadherin und den 8 verschiedenen mARVCF Splice-Varianten in die 6 unterschiedlichen Zelllinien zeigte sich, daß prinzipiell eine Interaktion der beiden Moleküle in allen untersuchten Zelllinien (auch in EJ28 Zellen) möglich ist. Aber im Gegensatz zu den mit den cytoplasmatischen Domänen von M- oder E-Cadherin erzielten Ergebnissen, findet eine solche Bindung nicht in jeder cotransfizierten Zelle statt, obwohl beide Konstrukte exprimiert werden. So zeigen selbst direkt benachbarte Zellen, die jeweils über beide Konstrukte verfügen, ein komplett unterschiedliches Bindeverhalten. Für alle Splice-Varianten und untersuchten Zelllinien repräsentative Ergebnisse sind in Abb. 4.9 exemplarisch mit FL-3/7 in MCF7 Zellen dargestellt. Um einen Überblick über das Verhältnis von Zellen zu erhalten, die positiv bzw. negativ für eine solche Assoziation sind, wurden $1,5 \times 10^3$ MCF7 Zellen ausgezählt, die sowohl das MOM-N-Cadherin als auch EGFP-FL-3/7 exprimieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.9D dargestellt und zeigen, daß 36,7% der cotransfizierten MCF7 Zellen eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen aufweisen, während 63,3% der Zellen, die beide Konstrukte exprimieren, negativ für eine solche Interaktion sind.



Die Ergebnisse der Analyse der subzellulären Lokalisation aller mARVCF Splice-Varianten in den 6 verschiedenen Zelllinien und die der MOM *recruitment assays* mit MOM-E-, -M- und -N-Cadherin in allen Linien sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt.

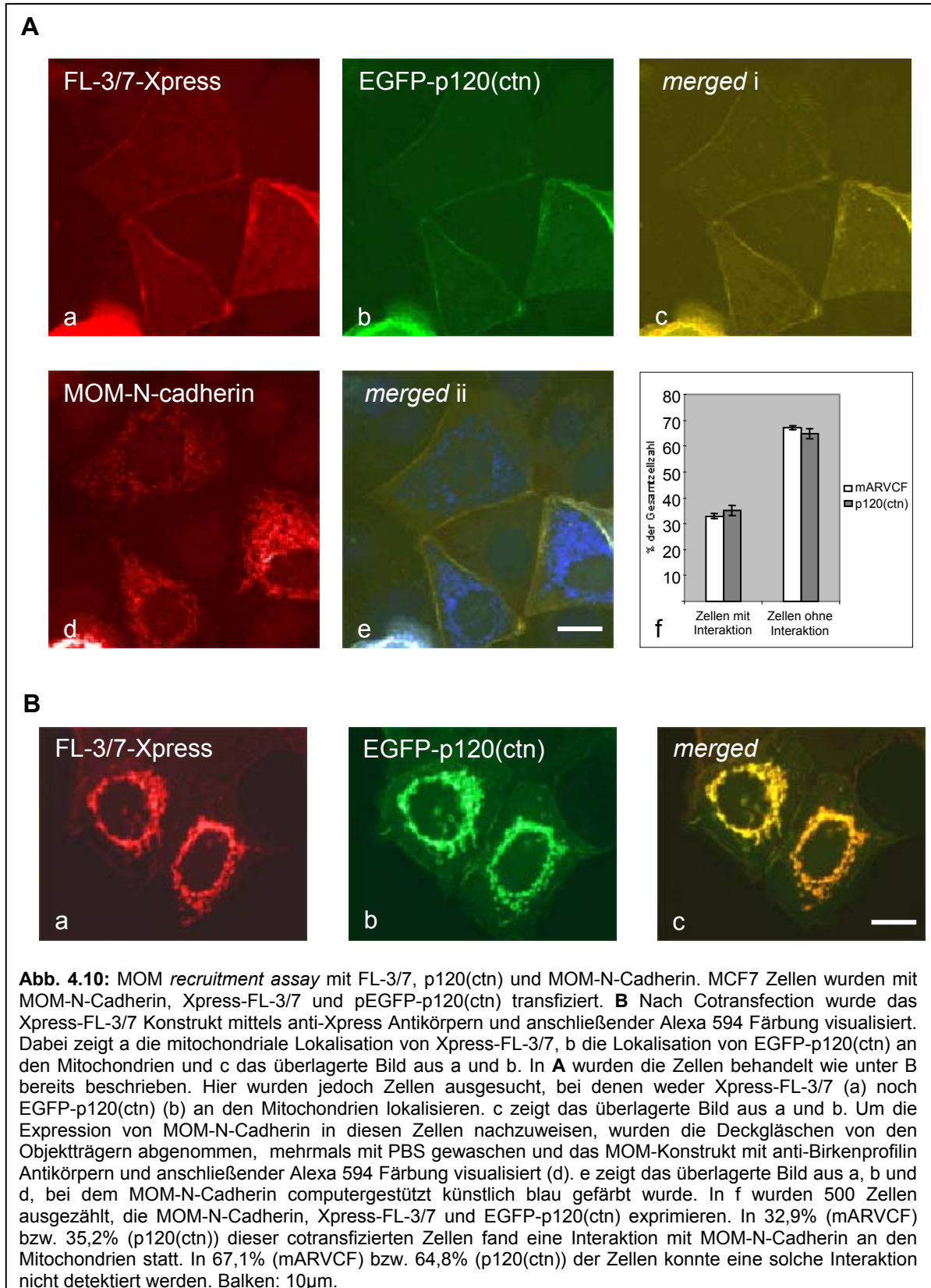
	MOM-Cadherin Interaktion			subzelluläre Lokalisation					
	M	E	N	i28	MCF7	RT112	EJ28	HeLa	COS-7
FL-C11	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m
FL-3/5	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m
FL-3/7	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m
FL-Y	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m
5'alt-C11	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m
5'alt-3/5	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m
5'alt-3/7	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m
5'alt-Y	+	+	+/-	m	m	m	c	m	m

Tab. 4.1: Zusammenfassung der subzellulären Lokalisation der mARVCF Splicevarianten und der verschiedenen MOM *recruitment assays*. (+: Interaktion im MOM assay; +/-: Interaktion im MOM assay in nur einigen Zellen; c: Cytoplasma; m: Membran; E: E-Cadherin; M: M-Cadherin; N: N-Cadherin; FL: *full length*).

mARVCF gehört zur p120(ctn) Subfamilie und weist eine hohe Homologie zu p120(ctn) auf. Beide Proteine binden an die juxtamembran Domäne (JMD) der Cadherine (Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000) und scheinen sich zumindest im Komplex mit E-Cadherin gegenseitig auszuschließen (Mariner et al., 2000). Aufgrund dessen sollte untersucht werden, ob das Unvermögen von 63,3% der cotransfizierten MCF7 Zellen eine Bindung zwischen mARVCF und N-Cadherin zu zeigen, auf einer Kompetition zwischen beiden *armadillo repeat* Proteinen beruht. Dazu wurde die p120(ctn) Isoform 1A, die die größte Homologie zu mARVCF FL-3/7 aufweist, als EGFP-Konstrukt (Nonnenmacher, 2001) im MOM *recruitment assay* eingesetzt.

MCF7 Zellen wurden mit MOM-N-Cadherin, Xpress-FL-3/7 und pEGFP-p1201A transfiziert. 24 h nach Transfection wurde das Xpress-FL-3/7 Konstrukt mittels anti-Xpress Antikörpern und Alexa 594 als sek. Antikörper in der Immunfluoreszenz angefärbt und Aufnahmen von Zellen gemacht, bei denen sowohl mARVCF (Abb. 4.10Aa), als auch p120(ctn) (Abb. 4.10Ab) an der Membran lokalisierten und somit nicht mit MOM-N-Cadherin assoziierten. Um die Expression des MOM-Konstruktes in diesen Zellen zu bestätigen, wurden die Deckgläschen vom Objektträger abgenommen, einige Male mit 1xPBS gewaschen und in einer erneuten Immunfluoreszenz mit dem anti-BP Antikörper und Alexa 594 als sek. Antikörper das

MOM-Konstrukt detektiert. Die positiven MOM-N-Cadherin Färbungen sind in Abb. 4.10Ad dargestellt und beweisen, daß die Bindung von p120(ctn) und mARVCF an endogenes, Membran-gebundenes E-Cadherin trotz Überexpression des MOM-Konstruktes in der selben Zelle stattfindet.



Außerdem wurden Zellen detektiert, bei denen sowohl Xpress-mARVCF (Abb. 4.10Ba) als auch EGFP-p120(ctn) (Abb. 4.10Bb) an das mitochondrial lokalisierte MOM-N-Cadherin einer Zelle binden können.

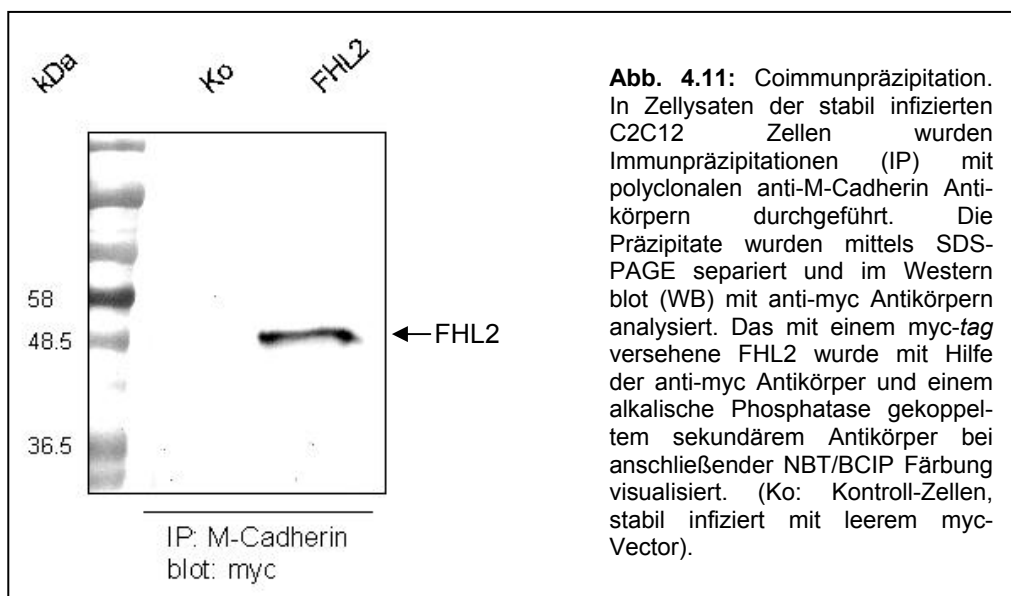
Diese Daten zeigen, daß das in Abb. 4.9 dargestellte inhomogene Bindeverhalten von mARVCF an die cytoplasmatische Domäne von N-Cadherin nicht durch eine Konkurrenz mit dem nahe verwandten Protein p120(ctn) bedingt ist. Zusätzlich wurde in den 3fach transfizierten Zellen wieder das Verhältnis von Zellen, positiv oder negativ für eine Assoziation von mARVCF bzw. p120(ctn) und MOM-N-Cadherin bestimmt. In diesen 3fach Transfectanden zeigten 32,9% der Zellen eine Interaktion zwischen mARVCF und MOM-N-Cadherin und 35,2% eine Interaktion zwischen p120(ctn) und der CPD von N-Cadherin (Abb. 4.10Af). Daraus wird ersichtlich, daß die Assoziation von mARVCF mit MOM-N-Cadherin durch die zusätzliche Transfection mit p120(ctn) nicht signifikant beeinflusst wird.

4.3 Assoziation von mARVCF und dem LIM-only Protein FHL2

4.3.1 Identifizierung von FHL2 als potentielltem Interaktionspartner der CPD von M-Cadherin

Murines ARVCF wurde beim Durchmusterung einer cDNA Bank von i28 Mausmyoblasten (30 h zur Fusion induziert) mit Hilfe der cytoplasmatischen Domäne von M-Cadherin als Köder im Hefe-Zwei-Hybrid System identifiziert (Sterzel, 1997; Urbich, 1998). Im gleichen Experiment wurde auch mSLIM3 (DRAL; FHL2) als potentieller Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domäne von M-Cadherin identifiziert. Das LIM-only Protein FHL2 (*Down-regulated in Rhabdomyosarcoma Lim protein*) besitzt 4½ LIM-Domänen; es zeigt eine starke Expression in Herz- und Skelettmuskel, ist aber in malignen Rhabdomyosarcoma Zellen herunterreguliert (Genini et al., 1997). Zur Verifizierung der in der Hefe gewonnenen Daten wurden in der Arbeitsgruppe *in vitro* GST-Interaktionsstudien durchgeführt, die eine Bindung zwischen FHL2 und der CPD von M-Cadherin jedoch nicht bestätigen konnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Coimmunpräzipitation mit anti-M-Cadherin Antikörpern in C2C12 Mausmyoblasten durchgeführt, die stabil mit myc-getagtem FHL2 bzw. dem leeren myc-Vector infiziert wurden (freundliche Gabe von V. Wixler, Universität Erlangen/Nürnberg). Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE separiert und im Western blot mit Hilfe des anti-c-myc Antikörpers analysiert. Wie in Abb. 4.11 zu erkennen, kann FHL2 mit anti-M-Cadherin Antikörpern copräzipitiert werden. Als Kontrolle dienten die mit dem Leervektor infizierten C2C12 Zellen.



4.3.2 mARVCF bindet direkt an FHL2

Die Tatsache, dass keine direkte Interaktion zwischen M-Cadherin und FHL2 *in vitro* nachgewiesen werden konnte, beide Proteine aber zusammen in einem Komplex copräzipitiert werden können, lässt einen, beide Proteine verbindenden, Faktor vermuten. Von B. Martin konnte gezeigt werden, dass FHL2 sowohl an β -Catenin als auch an dessen Homologe Plakoglobin und *Drosophila* Armadillo binden kann. Die Assoziation von FHL2 mit dem *armadillo repeat* Protein β -Catenin findet dabei vermutlich jedoch nicht an der Plasmamembran statt, sondern mit dem freien *pool* von β -Catenin im Cytoplasma bzw. dem Zellkern (Martin et al., 2002). Somit scheint β -Catenin als Mediator zwischen dem Cadherin und FHL2 nicht in Frage zu kommen.

Da mARVCF aus dem gleichen Hefe-Zwei-Hybrid *screen* als Interaktionspartner der CPD von M-Cadherin hervorgegangen ist und wie β -Catenin zu den *armadillo repeat* Proteinen gehört, wurde nun die Möglichkeit einer direkten Interaktion zwischen beiden Proteinen untersucht. Dazu wurden die zwei prominentesten mARVCF Splice-Varianten, FL-3/7 und FL-C11, im Vector pcDNA3.1 als Matrize zur *in vitro* Transkription und Translation mit ^{35}S -Methionin eingesetzt. FHL2 wurde als GST-Fusionsprotein aus Bakterien aufgereinigt. (Alle in dieser Arbeit eingesetzten FHL2-Konstrukte wurden von B. Martin zur Verfügung gestellt). Abb. 4.12 zeigt, dass beide mARVCF Isoformen an FHL2 binden können; als Kontrolle wurden beide Translate mit unfusioniertem GST inkubiert (Abb. 4.12 Spur 3 und 5).

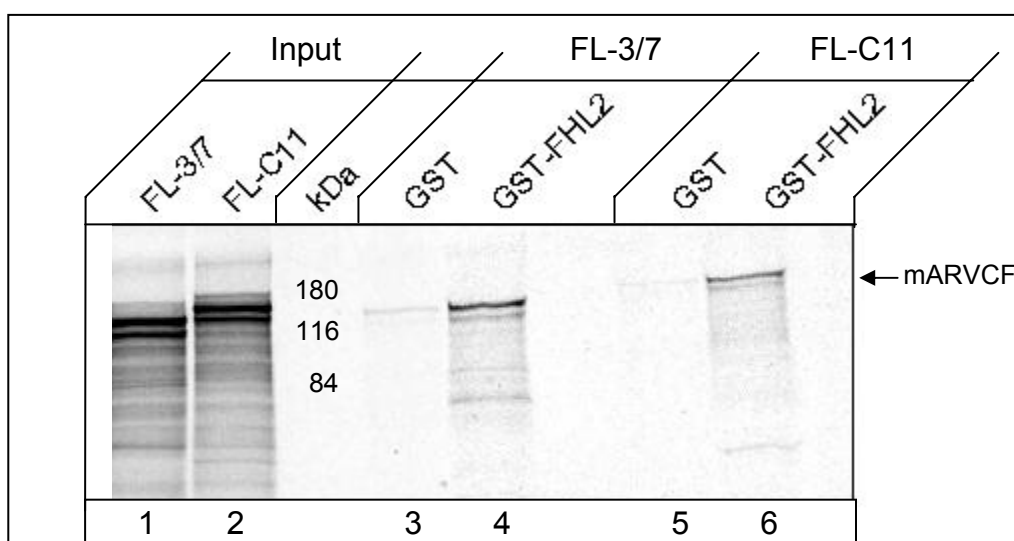
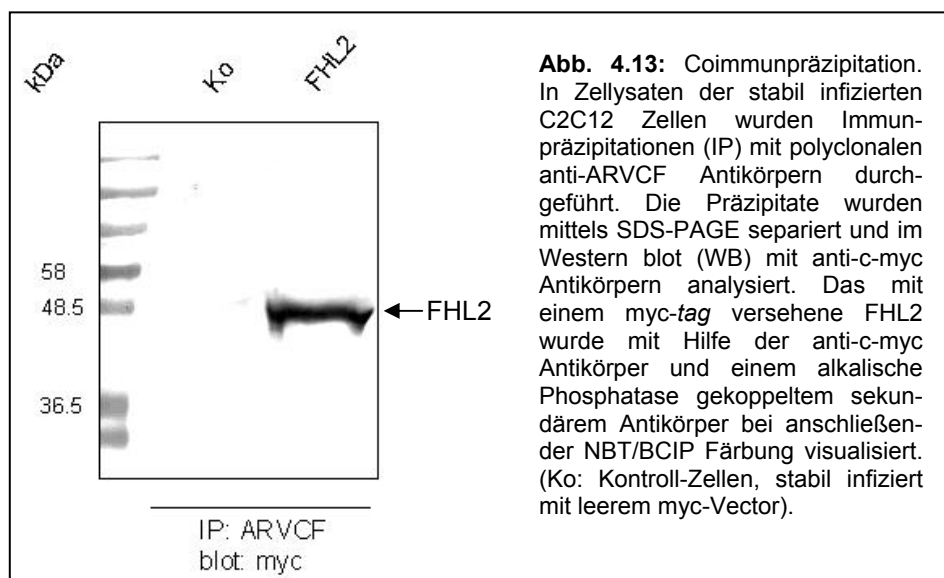


Abb. 4.12: *In vitro* GST-Interaktionsstudie. Die radioaktiv markierten mARVCF Splice-Varianten FL-3/7 (Spur 1) und FL-C11 (Spur 2) wurden mit FHL2 als GST-Fusionsproteine inkubiert (Spur 4 und 6). Als Negativkontrolle wurde FL-3/7 (Spur 3) und FL-C11 (Spur 5) mit unfusioniertem GST inkubiert. (FL: *full length*, GST: Glutathion-S-Transferase).

In Coimmunpräzipitations Analysen aus den stabilen C2C12 Mausmyoblasten mit Antikörper gegen ARVCF konnte die Assoziation beider Proteine ebenfalls bestätigt werden (Abb. 4.13). Zellysate von FHL2 stabil exprimierenden C2C12 Zellen wurden mit dem polyclonalen anti-ARVCF Antikörper (freundliche Gabe von W. W. Franke, DKFZ, Heidelberg) inkubiert, mittels SDS-PAGE separiert und mit Hilfe des anti-c-myc Antikörpers analysiert. Als Kontrolle dienten auch hier die mit dem leeren myc-Vector infizierten Zellen.

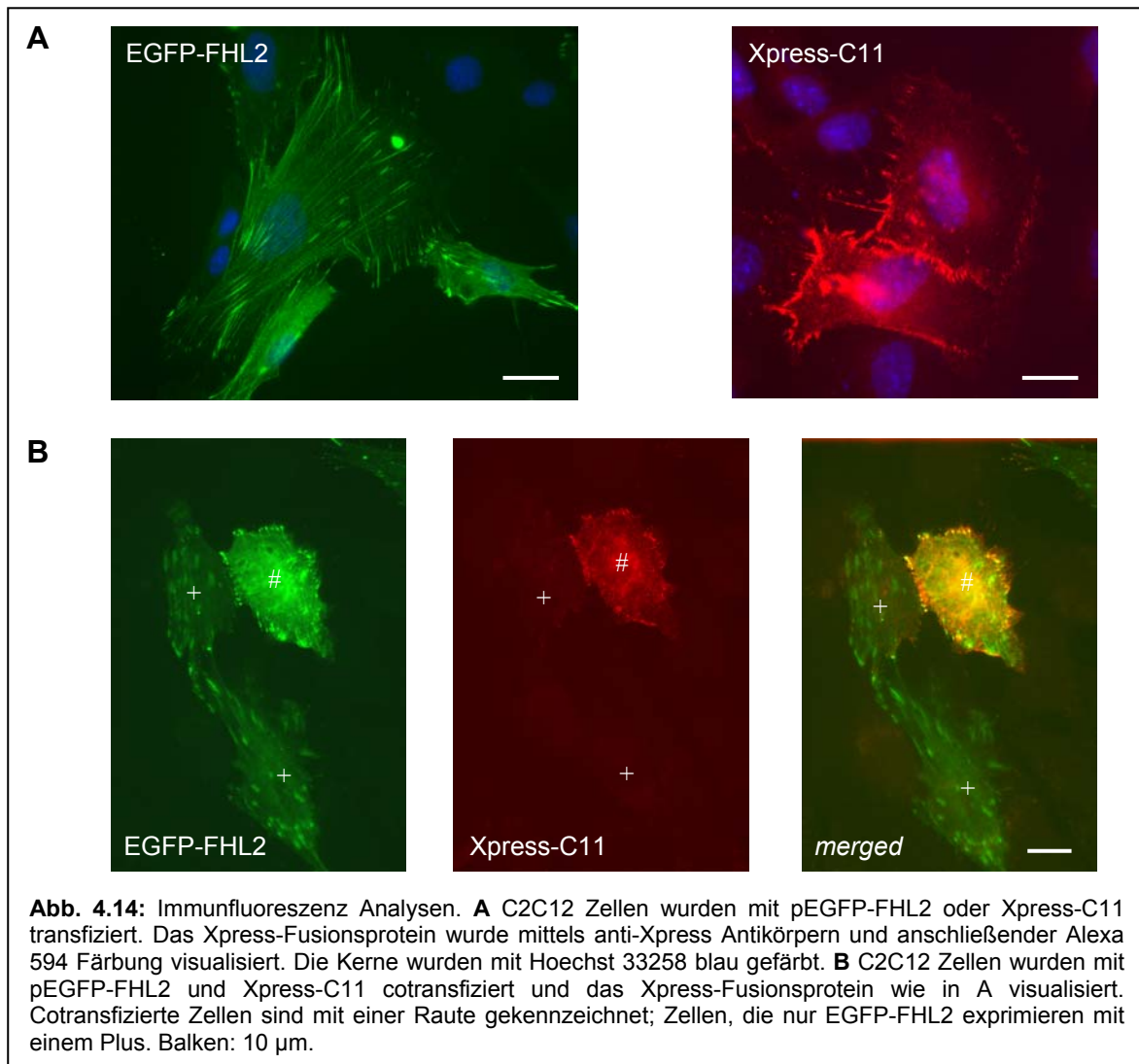
Diese Ergebnisse charakterisieren das LIM-Protein FHL2 als neuen Interaktionspartner von mARVCF.



4.3.3 mARVCF transloziert FHL2 aus den Fokalkontakten zum Cadherin-Catenin Komplex an der Plasmamembran

Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist mARVCF ein Interaktionspartner der Cadherine und lokalisiert als solcher an den Zell-Zell Kontaktstellen. Demgegenüber wurde FHL2 als Bindepartner der Integrine identifiziert und colocalisiert mit diesen in den Fokalkontakten (Wixler et al., 2000). Aufgrund dieser unterschiedlichen subcellulären Lokalisation der beiden Proteine war es sehr unerwartet, beide in einem Komplex vorzufinden. Um diesen Punkt weiter zu untersuchen, wurden C2C12 Mausmyoblasten mit Xpress-C11 (Kaufmann, 2000), pEGFP-FHL2 oder beiden Konstrukten zusammen transfiziert. Wie in Abb. 4.14A zu erkennen, zeigt das mARVCF Konstrukt auch in C2C12 Zellen die erwartete Lokalisation an den Zell-Zell

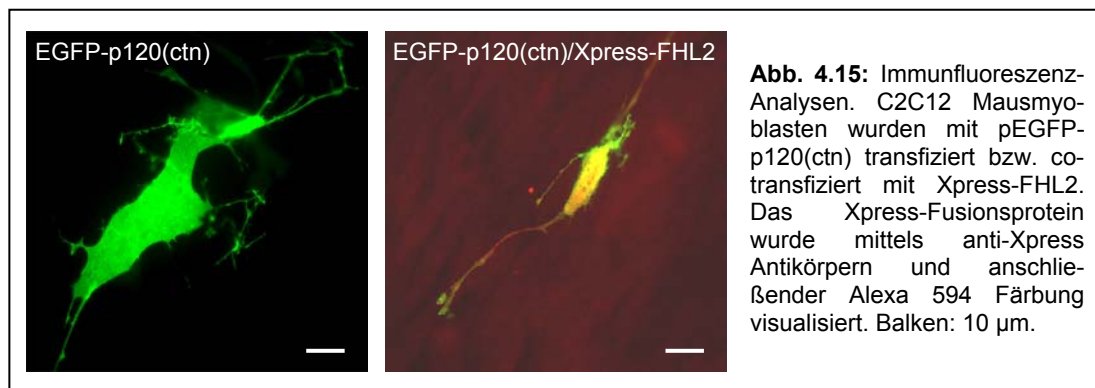
Kontaktstellen, wohingegen EGFP-FHL2 deutlich in den Fokalkontakten lokalisiert ist (Abb. 4.14A).



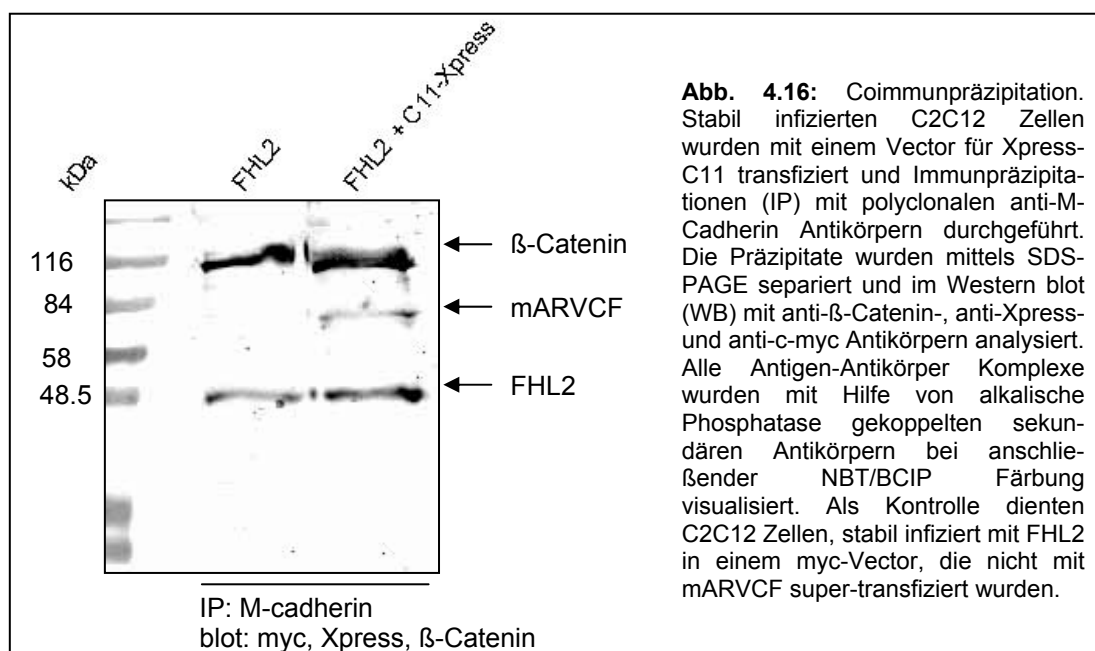
Nach Cotransfection beider Konstrukte änderte sich die Lokalisation von FHL2 vollständig; war das Protein zuvor noch in den Fokalkontakten lokalisiert, konnte es nun zusammen mit mARVCF an den Zell-Zell Kontakten detektiert werden (Abb. 4.14B). (Die gleichen Ergebnisse können mit Xpress-3/7 erzielt werden). Somit scheint mARVCF in der Lage zu sein, durch die Interaktion mit FHL2, das LIM-Protein an die Membran zu translozieren und in den Cadherin-Catenin Komplex an der Plasmamembran bzw. den Zell *junctions* einzubinden.

Im Gegensatz dazu konnte das mit ARVCF nah verwandte p120(ctn) eine Translokation von FHL2 aus den Fokalkontakten zur Plasmamembran nicht bewirken (Abb. 4.15). Nach Transfection von pEGFP-p120(ctn) (Nonnenmacher, 2001) in

C2C12 Zellen, zeigten diese den in der Literatur beschriebenen dendritischen Phänotyp nach ectopischer Überexpression von p120(ctn) in nicht-epithelialen Zellen (Reynolds et al., 1996). Durch diese massive morphologische Umgestaltung der Zellen geht die Lokalisation von FHL2 in den Fokalkontakten verloren; FHL2 lokalisiert überwiegend im Cytoplasma. Nach Cotransfection von pEGFP-p120(ctn) mit FHL2 als Xpress-Fusionskonstrukt konnte somit keine Translokation von FHL2 an die Zell-Zell Kontakte beobachtet werden.

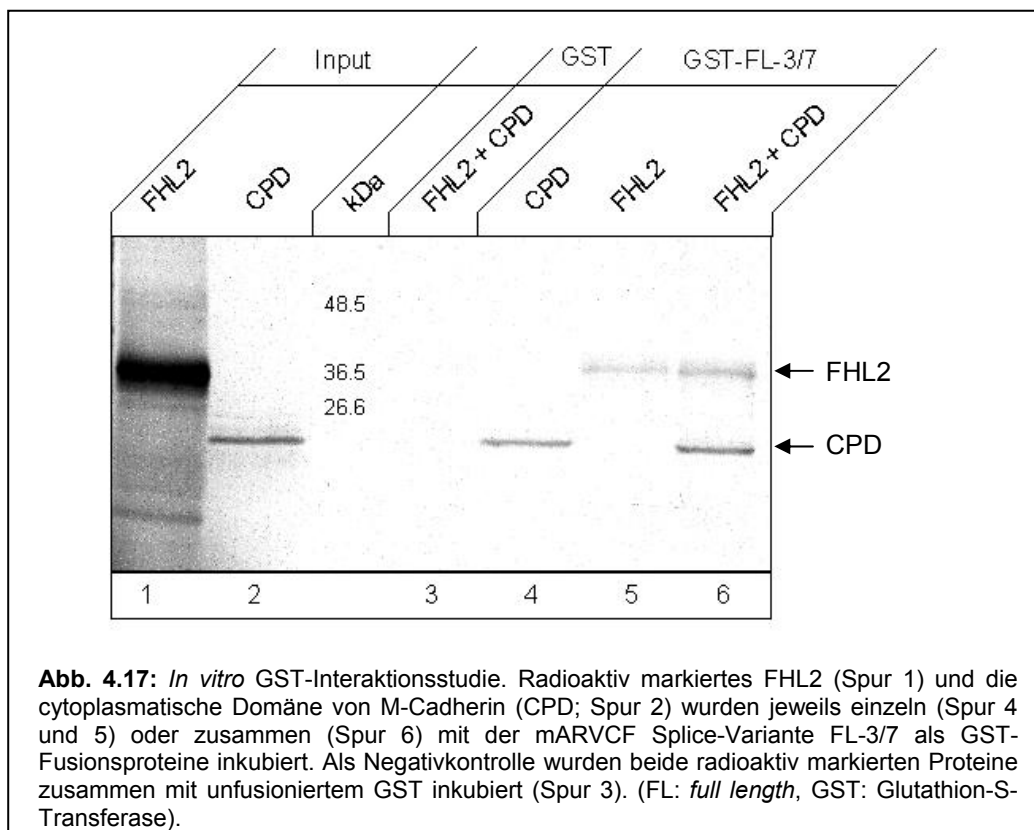


Um den Aspekt von FHL2 als neue Komponente des Cadherin-Catenin Komplexes weiter zu untersuchen, wurden Coimmunpräzitationen mit anti-M-Cadherin Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden die myc-FHL2 stabil exprimierenden C2C12 Zellen transient mit Xpress-C11 transfiziert und die Extrakte mit anti-M-Cadherin Antikörpern inkubiert. Nach Separation mittels SDS-PAGE wurden die Präzipitate mit



Hilfe von anti- β -Catenin-, anti-Xpress- und anti-c-myc Antikörpern im Western blot analysiert (Abb. 4.16). Hierdurch wurde gezeigt, daß FHL2 zusammen mit β -Catenin, mARVCF und M-Cadherin in einem Komplex vorliegt.

Da, wie eingangs erwähnt, eine Interaktion von M-Cadherin und FHL2 in *in vitro* GST-Interaktionsstudien nicht nachgewiesen werden konnte, war es nun von Interesse, die Möglichkeit eines ternären Komplexes aus M-Cadherin, FHL2 und mARVCF *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden FHL2 und die CPD von M-Cadherin (Kaufmann et al., 2000) in den Expressionsvector pcDNA3.1 cloniert und als Matritze zur *in vitro* Transkription und Translation mit 35 S-Methionin eingesetzt (Abb. 4.17 Spur 1 und 2). Die mARVCF Isoform FL-3/7 wurde als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert und die korrekte Expression mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau Färbung bestätigt. Wie in Abb. 4.17 dargestellt, ist GST-FL-3/7 in der Lage, an die CPD von M-Cadherin (Abb. 4.17 Spur 4), FHL2 (Abb. 4.17 Spur 5) oder beide zusammen, in einem ternären Komplex zu binden (Abb. 4.17 Spur 6). Die Spezifität dieser Interaktion wurde durch Inkubation der beiden *in vitro* Translate mit unfusioniertem GST überprüft (Abb. 4.17 Spur 3). Die gleichen Ergebnisse sind mit der Isoform FL-C11 zu erzielen.



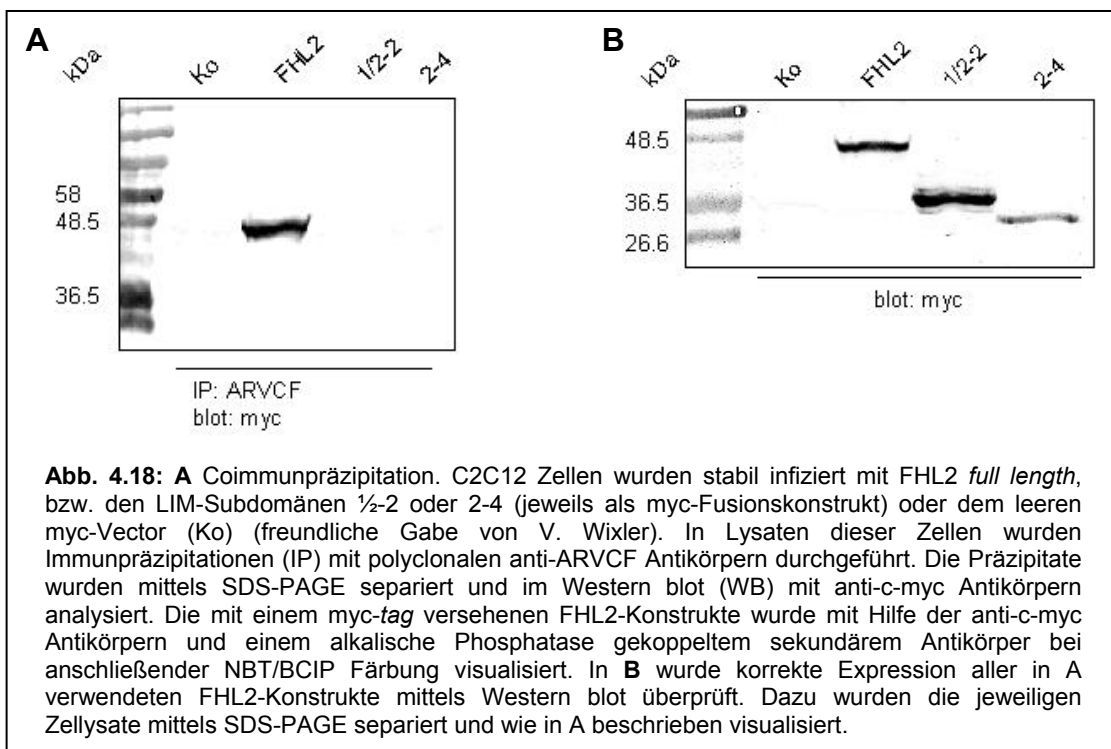
Es läßt sich somit zeigen, daß mARVCF in der Lage ist, FHL2 in den Cadherin-Catenin Komplex einzubinden, indem das *armadillo repeat* Protein gleichzeitig mit der CPD von M-Cadherin und dem LIM-*only* Protein assoziieren kann.

4.3.4 Charakterisierung der mARVCF Bindungsdomäne in FHL2

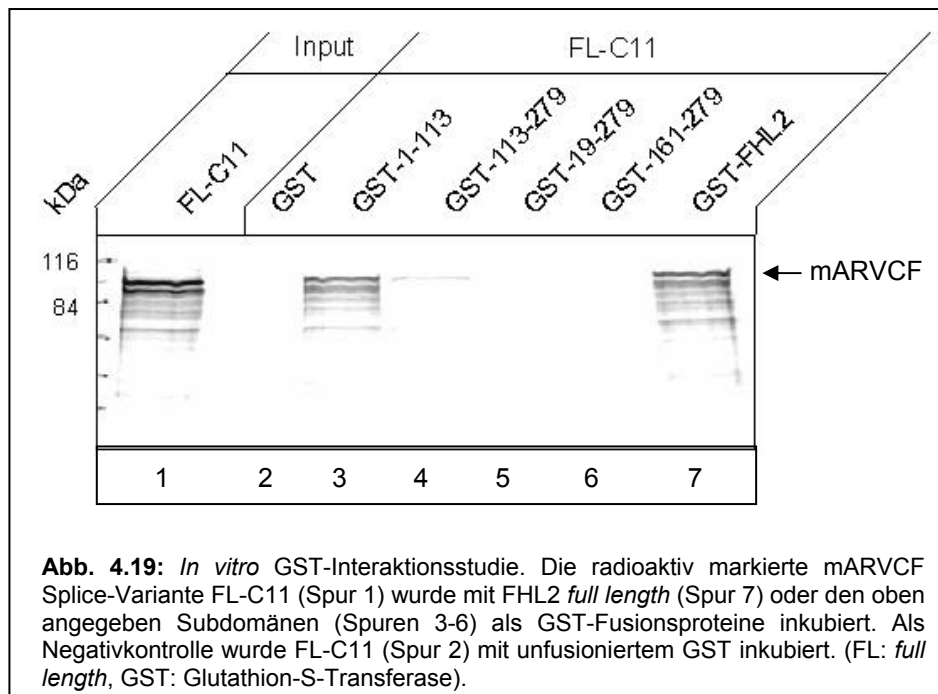
Um einen Einblick zu erhalten, welche Region von FHL2 für die Assoziation mit mARVCF verantwortlich ist, wurden *in vivo* und *in vitro* Interaktionsstudien durchgeführt.

C2C12 Mausmyoblasten, stabil mit den in Abb. 4.18 angezeigten FHL2 Subdomänen infiziert (V. Wixler), wurden zu Coimmunpräzitation Analysen herangezogen. Die verschiedenen Zellysate wurden über Nacht mit dem polyklonalen anti-ARVCF Antikörper inkubiert, durch SDS-PAGE separiert und mittels anti-c-myc Antikörper im Western blot analysiert. Als Kontrollen dienten wieder die mit dem leeren myc-Vector stabil infizierten Zellen. Wie in Abb. 4.18A gezeigt, kann nur *full length* FHL2, und keine der LIM-Subdomänen allein, zusammen mit endogenem mARVCF copräzipitiert werden.

Die korrekte Expression aller FHL2-Konstrukte in den stabilen Linien wurde durch Western *blotting* der entsprechenden Zellysate mit dem anti-c-myc Antikörper überprüft (pro Spur wurden 20 µg Gesamtprotein eingesetzt) (Abb. 4.18B).



Um die mARVCF Bindungsstelle in FHL2 auch *in vitro* zu charakterisieren, wurden zusätzlich GST-Interaktionsstudien durchgeführt. Die Isoform FL-C11 wurde als Matritze zur *in vitro* Transkription und Translation mit ^{35}S -Methionin eingesetzt (Abb. 4.19 Spur 1) und die verschiedenen FHL2 Deletionen als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert. Die Kontrolle der GST-Fusionen erfolgte wie bereits beschrieben. Wie aus Abb. 4.19 zu erkennen, ist, im Gegensatz zur Analyse mittels Coimmunpräzipitation, *in vitro* zusätzlich zur Assoziation mit *full length* FHL2 (Abb. 4.19 Spur 7) auch eine Interaktion von mARVCF mit AS 1-113 von FHL2 möglich (Abb. 4.19 Spur 3); dies entspricht den LIM-Domänen $\frac{1}{2}$ -1, zuzüglich 13 AS von LIM-Domäne 2.



Zusammenfassend wurde mit diesen Untersuchungen FHL2 als neuer, bis dahin unbekannter Interaktionspartner des *armadillo repeat* Proteins mARVCF identifiziert. Eine Assoziation beider Proteine findet im Komplex mit M-Cadherin an der Membran statt und bewirkt eine Translokation des LIM-Proteins aus den Fokalkontakten zum Cadherin-Catenin Komplex an die Stellen des Zell-Zell Kontaktes.

4.4 Clonierungen

Konstrukname	Clonierungsstrategie/Referenz
pEGFP-FL-C11	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> EcoRIQ41neu und ARVCF 6R mit Clon C11Q41 als Matritze (C. Urbich), Restriktionsspaltung mit EcoRI/NotI • Ligation in EcoRI/NotI geöffnetes pEGFP-FL-C11 (mit Mutation; U. Kaufmann)
pEGFP-FL-3/7	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> EcoRIC11s und AKCT3 mit einem RT-PCR Fragment in pGEM®-T Easy codierend für Splice-Variante 3/7 (A. Schäfer, 2000) als Matritze, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffnet (pEGFP-C113/7) • Ligation des BamHI-Fragments von pEGFP-C113/7 in pEGFP-FL-C11 ohne BamHI-Fragment
pEGFP-FL-3/5	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> EcoRIC11s und AKCT3 mit einem RT-PCR Fragment in pGEM®-T Easy codierend für Splice-Variante 3/5 (A. Schäfer, 2000) als Matritze, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffnet (pEGFP-C113/5) • Ligation des BamHI-Fragments von pEGFP-C113/5 in pEGFP-FL-C11 ohne BamHI-Fragment
pEGFP-FL-Y	<ul style="list-style-type: none"> • pEGFP-C11Y BamHI-Fragment ligiert in pEGFP-FL-C11 ohne BamHI-Fragment
pEGFP-5'alt-C11	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> ARVCF 5'alt und AKCT3 mit pEGFP-FL-C11 als Matritze, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffnet
pEGFP-5'alt -3/7	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> ARVCF 5'alt und AKCT3 mit pEGFP-FL-3/7 als Matritze, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffnet

pEGFP-5`alt -3/5	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> ARVCF 5`alt und AKCT3 mit pEGFP-FL-3/5 als Matritze, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffnet
pEGFP-5`alt -Y	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> ARVCF-Y-s und ARVCF-Y-as, Phosphorylierung • PCR mit <i>Primer</i> EcoRIC11s und Ex 18 as, EcoRI Spaltung, Phosphorylierung • PCR mit <i>Primer</i> Ex 19 s und AKCT3, Sall Spaltung, Phosphorylierung • Ligation aller drei Fragmente in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffnet (pEGFP-C11Y) • Ligation des BamHI-Fragments von pEGFP-C11Y in pEGFP-5`alt-C11 ohne BamHI-Fragment
pEGFP-C11	U. Kaufmann, 2000
pEGFP-klassische NLS mut. FL-C11	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> EcoRIC11s und NLS mut. as und PCR mit <i>Primer</i> NLS mut. as und AKCT3 jeweils mit pEGFP-FL-C11 als Matritze • Einsatz beider PCR-Fragmente in „PCR ohne <i>Primer</i>“, Reamplifikation mit EcoRIC11s und AKCT3 , Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in EcoRI/Sall geöffneten pEGFP-C2 • Ligation des BamHI-Fragments dieses Konstruktes in pEGFP-FL-C11 ohne BamHI-Fragment
pEGFP- Δ NT Δ 1-4arm C11	U. Kaufmann, 2000
pEGFP-C11-8AS	<ul style="list-style-type: none"> • Ligation des BamHI-Fragment von pEGFP-C11 in pEGFP-arm (U. Kaufmann) ohne BamHI-Fragment
pEGFP-5`3`AKCT3C11	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> 5`->3` und AKCT3, Restriktionsspaltung mit Sall • pEGFP-C3 EcoRI gespalten, Auffüll-Reaktion, Restriktionsspaltung mit Sall • Ligation des Inserts in pEGFP-C3 <i>blunt</i>/Sall

pEGFP-C11-49AS	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> C11-49AA und AKCT3, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffnet
pEGFP-NLS*C11	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> NLS neu -s- und AKCT3 und PCR mit <i>Primer</i> NLS neu -as- und ARVCF 5'alt jeweils mit pEGFP-FL-C11 als Matritze • Einsatz beider PCR-Fragmente in „PCR ohne <i>Primer</i>“, Reamplifikation mit EcoRIC11s und AKCT3 , Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in EcoRI/Sall geöffneten pEGFP-C2
pEGFP-C11 bis NheI	<ul style="list-style-type: none"> • pEGFP-C11 mit NheI gespalten, Auffüll-Reaktion, Restriktionsspaltung mit EcoRI • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/SmaI geöffnet
pEGFP-C11 bis Exon 18	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> EcoRIC11s und Ex 18 as mit pEGFP-FL-C11 als Matritze, Restriktionsspaltung mit EcoRI, Phosphorylierung • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/SmaI geöffnet
pEGFP-NES13 mut. FL-C11	<ul style="list-style-type: none"> • Ligation des BamHI-Fragments von pEGFP-NES13mut. 5'alt (M. Frye) in pEGFP-FL-C11 ohne BamHI-Fragment
pEGFP-NES20 mut. FL-C11	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> EcoRIC11s und NES mut. as und mit <i>Primer</i> NES mut. s und 3'UTRas • Einsatz beider PCR-Fragmente in „PCR ohne <i>Primer</i>“, Reamplifikation mit EcoRIC11s und AKCT3 , Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pEGFP-C2 EcoRI/Sall geöffneten • Ligation des BamHI-Fragments von pEGFP-NES20mut. C11 in pEGFP-FL-C11 ohne BamHI-Fragment
pEGFP-NES13+20 mut. FL-C11	<ul style="list-style-type: none"> • Restriktionsspaltung von pEGFP-NES20 mut.C11 mit NheI (Vector) • Restriktionsspaltung von pEGFP-NES13 mut. 5'alt (M. Frye) (Insert) • Ligation von Insert in Vector (pEGFP-NES13+20 mut.

	<p>5`alt)</p> <ul style="list-style-type: none"> • BamHI-Fragment von pEGFP-NES13+20 mut. 5`alt als Insert • pEGFP-FL-C11 ohne BamHI-Fragment als Vector
pcDNA-FL-C11	<ul style="list-style-type: none"> • Restriktionsspaltung von FL-C11 in YFP-C1 mit EcoRI/Sall • Ligation in pcDNA3.1+ EcoRI/XhoI geöffnet
pcDNA-FL-3/7	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> YFP ARVCFf.l. -s- und YFP ARVCFf.l. -as-, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall • Ligation in pcDNA3.1+ EcoRI/XhoI geöffnet
Xpress-C11	U. Kaufmann, 2000
Xpress-3/7	S. Hasan, Projektpraktikum
Xpress-FL-3/7	S. Hasan, Projektpraktikum
pEGFP-p120 1A	F. Nonnenmacher, 2001
GST-CPD-E-cad	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> Ecad CPD GST s und CPD:MOM=>GST as mit MOM-E-cad als Matritze, Restriktionsspaltung mit BamHI/EcoRI • Ligation in pGEX 5X1 BamHI/EcoRI geöffnet
GST-CPD-M-cad	U. Kaufmann, 2000
GST-CPD-N-cad	<ul style="list-style-type: none"> • PCR mit <i>Primer</i> Ncad CPD GST s und CPD:MOM=>GSTas mit MOM-N-cad als Matritze, Restriktionsspaltung mit BamHI/EcoRI • Ligation in pGEX 5X1 BamHi/EcoRI geöffnet
MOM-E-cad	M. Rüdiger, Abt. Jockusch, TU Braunschweig
MOM-M-cad	Z. Waibler, 1998
MOM-N-cad	<ul style="list-style-type: none"> • RT-PCR mit <i>Primer</i> MOM-N-cad -s- und MOM-N-cad -as- mit muriner Herz-cDNA als Matritze, Restriktionsspaltung mit BamHI/EcoRI • Ligation in BamHI/EcoRI geöffneten MOM-E-cad Vector
pcDNA-CPD-M-cad	Kaufmann et al., 2000
pEGFP-FHL2	B. Martin, unveröffentlicht

pcDNA-FHL2	B. Martin, unveröffentlicht
GST-FHL2	B. Martin, unveröffentlicht
GST-1-113	B. Martin, unveröffentlicht
GST-113-279	B. Martin, unveröffentlicht
GST-C13	B. Martin, unveröffentlicht
GST-161-279	B. Martin, unveröffentlicht
GST-FL-C11	<ul style="list-style-type: none">• PCR mit <i>Primer</i> EcoRIQ41neu und AKCT3, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall mit pEGFP-FL-C11 als Matritze• Ligation in pGEX 5X1 EcoRI/Sall geöffnet
GST-FL-3/7	<ul style="list-style-type: none">• PCR mit <i>Primer</i> EcoRIQ41neu und AKCT3, Restriktionsspaltung mit EcoRI/Sall mit pEGFP-FL-3/7 als Matritze• Ligation in pGEX 5X1 EcoRI/Sall geöffnet

5. Diskussion

5.1 Überprüfung der Funktionalität von putativem NLS und NES

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das murine ARVCF (mARVCF) als Interaktionspartner der Cadherine mit diesen an der Plasmamembran colokalisiert. Andererseits konnte ebenfalls demonstriert werden, daß mARVCF durch die Behandlung transfizierter Zellen mit Leptomycin B (LMB) im Zellkern zurückgehalten werden kann. Diese Beobachtungen lassen einen regulierten Mechanismus vermuten, nach dem mARVCF in den Kern importiert, aber vor allem schnell und effektiv exportiert wird.

Durch computergestützte Sequenzanalysen der murinen ARVCF cDNA konnte ein bipartites NLS (*nuclear localisation signal*) (Robbins et al., 1991) zwischen AS 609 und 628 ausgemacht werden (RRRKDDASCFGGKKAKGKKD). Weiterhin konnten durch Vergleich mit bekannten Proteinmotiven potentielle *nuclear export signals* (NES) in der Sequenz des murinen ARVCF identifiziert werden. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Regulation der subcellulären Lokalisation von Proteinen über die Konkurrenz zwischen Im- und Exportsignalen kontrolliert werden kann (Abu-Shaar, et al., 1999).

Als Mitglied der p120(ctn) Subfamilie weist auch mARVCF in *armadillo repeat 6* ein Motiv auf, welches als NLS (*nuclear localisation signal*) beschrieben ist. Durch Punktmutationen der relevanten basischen Aminosäuren (vgl. Abb. 4.3) des NLS von mARVCF sollte untersucht werden, welche Rolle dieses Motiv für die Kernlokalisierung des Proteins spielt. Nach Transfection eines entsprechenden Konstruktes (pEGFP klassische NLS mut. FL-C11) in MCF7 oder COS-7 Zellen und anschließender Behandlung mit LMB, zeigte sich jedoch, daß auch dieses Konstrukt in den Kern importiert werden kann. Von Mariner wurden ebenfalls Mutationen der NLS von p120(ctn) unternommen, die zu einem ähnlichen Ergebnis führten (Mariner et al., 2000).

Obwohl nur 5% der Proteinen mit einem solchen NLS-Motiv nicht im Zellkern lokalisieren und in rund der Hälfte aller nucleären Proteine der SwissProt Datenbank

derartige Motive vorhanden sind (Robbins et al., 1991), scheint es demnach jedoch für die Translokation von mARVCF (oder p120(ctn)) nicht (oder nicht ausschließlich) von Bedeutung zu sein. Interessanter Weise codieren auch die Plakophiline in einem *loop* an vergleichbarer Stelle für eine Abfolge basischer AS, die jedoch ebenfalls nicht für die Translokation dieser Moleküle in den Zellkern benötigt werden (Schmidt et al., 1997; Klymkowsky, 1999).

Um die Beteiligung der theoretisch identifizierten NES-Motive in mARVCF zu untersuchen, wurden Deletions- und Punktmutations-Konstrukte angefertigt. Dadurch wurde gezeigt, daß offenbar beide der identifizierten NES in Exon 13 und Exon 20 zusammen für den Export von mARVCF verantwortlich sind. Die Mutation bzw. Deletion nur eines der beiden Motive führte lediglich zu einer inhomogenen Lokalisation der Konstrukte an der Plasmamembran, im Cytoplasma und im Zellkern. Durch die Mutation beider Motive (jeweils der Leuzine) konnte demgegenüber die Lokalisation von mARVCF im Nucleus erreicht werden.

Für das mit ARVCF eng verwandte p120(ctn) wurde im alternativen Exon B ein funktionelles NES identifiziert (van Hengel et al., 1999), dessen Aktivität ebenfalls durch LMB inhibiert werden kann (vgl. Abb. 5.1).

LMB ist ein Antibiotikum, das den CRM1/exportin1 vermittelten Proteinexport aus dem Zellkern inhibiert (Kudo et al., 1999). Daß die Aktivität der NES in mARVCF durch LMB sehr effizient inhibiert werden kann läßt vermuten, daß mARVCF (wie auch p120(ctn)) einem CRM1/exportin1 vermittelten Exportmechanismus unterliegt. Außerdem zeigte van Hengel, daß eine Punktmutation (identisch mit der im Rahmen dieser Arbeit an mARVCF durchgeführt) das Exportsignal von p120(ctn) funktionslos macht und p120(ctn) somit im Kern zurückgehalten werden kann (van Hengel et al., 1999). Dabei scheint die Mutation der zwei Leuzine zu Alaninen generell die Funktion eines NES zu inhibieren (Wen et al., 1995; Gorlich et al., 1996).

<pre> ...LEEEEDVIVLIDDEGGQ... h p120(ctn) (Exon B) ...LEEEEDVIVLIDDEGNQ... m p120 ...GPSRPAVRLVDAVGDA... h ARVCF ...GALAAQLEFVLRDRIEVA... m ARVCF (Exon 20) </pre>	<p>Abb. 5.1: Aminosäurevergleich der <i>nuclear</i> Export-Signale (NES) von p120(ctn) und ARVCF (Verändert nach Anastasiadis und Reynolds, 2000). (h: human; m: murin).</p>
---	---

Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen, konnte van Hengel den Effekt von LMB auf die Lokalisation von p120(ctn) jedoch nur in E-

Cadherin-negativen L929 Zellen eindeutig aufzeigen. In E-Cadherin-positiven, epithelialen MDCK Zellen war eine Kernlokalisierung von p120(ctn) durch LMB-Behandlung kaum nachzuweisen (van Hengel et al., 1999).

Generell scheint die Expression von Cadherinen, insbesondere E-Cadherin, eine wichtige Rolle bei der subcellulären Lokalisation und nucleären Translokation von p120(ctn) zu spielen. Während die *armadillo repeat* Proteine β -Catenin (Huber et al., 1996; Inomata et al., 1996), Plakoglobin (Karnovsky und Klymkowsky, 1995) und die Plakophiline 1 bis 3 (Mertens et al., 1996; Schmidt et al., 1997; Bonne et al., 1999) alle endogen im Zellkern zu detektieren sind, ist p120(ctn) (zumindest ohne Exon B) nie im Kern lokalisiert (van Hengel et al., 1999). Ebenso ist endogenes humanes (Mariner et al., 2000) und murines (Kaufmann et al., 2000) ARVCF gar nicht oder nur in sehr geringem Maße im Nucleus zu finden. Auch Überexpression von mARVCF konnte im Rahmen dieser Arbeit in diversen (Cadherin-positiven) Zellen nicht zu einer Akkumulation des Proteins im Kern führen. In humanen Carcinomzellen, die kein E-Cadherin exprimieren, ist p120(ctn) hingegen im Zellkern lokalisiert (Daniel et al., 1995; Daniel und Reynolds, 1995; Pierceall et al., 1995). Durch die exogene Expression von E-Cadherin kann diese Lokalisation jedoch aufgehoben werden.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen mit mARVCF, konnte van Hengel die LMB-induzierte Translokation von p120(ctn) in den Kern jedoch nur in E-Cadherin-negativen L929 Zellen eindeutig aufzeigen. In E-Cadherin-positiven, epithelialen MDCK Zellen war eine nucleäre Lokalisation von p120(ctn) durch LMB-Behandlung kaum nachzuweisen (van Hengel et al., 1999). Zusammen mit den Ergebnissen in E-Cadherin-positiven, epithelialen MCF7 Zellen, in denen mARVCF nach LMB-Behandlung im Zellkern zu detektieren ist, scheint mARVCF bei diesen Prozessen weniger dem Einfluß der Cadherine, insbesondere E-Cadherin zu unterliegen.

Weitere Versuche mit zusätzlicher exogener Expression von E-Cadherin und anschließender LMB-Behandlung sollten weiteren Aufschluß geben können.

Somit stehen mehrere Erklärungsmöglichkeiten zur Verfügung:

- entweder unterliegt mARVCF einem effektiverem Exportmechanismus, als andere *armadillo repeat* Proteine;

- die Anbindung von mARVCF an die Cadherine (oder andere cytoplasmatische Interaktionspartner) ist weniger stark als die von p120(ctn);
- oder eine Translokation von mARVCF in den Kern findet nur unter ganz bestimmten Bedingungen statt (z.B. Stress).

Für die Möglichkeit des schnellen und umfassenden Exports von mARVCF sprechen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit LMB.

Dadurch, daß mARVCF einem wahrscheinlich CRM1/exportin1 vermitteltem Exportmechanismus unterliegt, weist es eine duale Lokalisation im Zellkern und an der Plasmamembran auf. Während das Protein an der Membran mit den Cadherinen interagiert, sind mögliche Partner im Nucleus vollkommen unbekannt. Durch einen Hefe-Zwei-Hybrid *screen* mit p120(ctn) als Köder (Daniel und Reynolds, 1999) wurde ein Transkriptionsfaktor der PTB/POZ Familie als spezifischer Interaktionspartner von p120(ctn) im Zellkern identifiziert.

Aufgrund des niedrigen Expressionslevels von mARVCF (Waibler, 1998; Mariner et al., 2000) scheint eine Funktion von ARVCF als Strukturprotein unwahrscheinlich. Zusammen mit den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen sind zwei Funktionsbereiche von mARVCF denkbar:

- Der regulierte Im- und Exportmechanismus, dem mARVCF unterliegt und die damit verbundene duale Lokalisation an der Plasmamembran und im Zellkern legen die Vermutung von mARVCF als Signaltransduktor zwischen Zell *junctions* und Nucleus nahe.
- Zusätzlich erfüllt ARVCF eine Funktion als Mediator zwischen dem Cadherin-Catenin Komplex und anderen Molekülen wie Erbin (Laura et al., 2000) oder FHL2 (diskutiert in Abschnitt 5.3).

5.2 Clonierung und Charakterisierung der mARVCF Splice-Varianten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die in unserer Arbeitsgruppe mittels RT-PCR identifizierten N- und C-terminalen Fragmente der Splice-Varianten des murinen ARVCF cloniert und charakterisiert werden. Dazu wurde u.a. das MOM *recruitment assay* herangezogen. Dabei zeigte sich, daß die Bindekapazität von mARVCF für die

drei untersuchten Cadherine, E-, M- und N-Cadherin, *in vivo* unterschiedlich ist. Obwohl das *armadillo repeat* Protein in *in vitro* Interaktionsstudien alle drei Cadherine gleich gut binden kann, zeigte sich im MOM assay ein inhomogenes Interaktionsverhalten zwischen mARVCF und N-Cadherin, nicht aber E- oder M-Cadherin. Offenbar liefert die Zelle außer den Cadherinen also zusätzliche, modifizierende Faktoren, die in dem *in vitro* System nicht zur Verfügung stehen. Da mARVCF in den beiden N-Cadherin-positiven Zelllinien EJ28 und HeLa eine unterschiedliche subcelluläre Lokalisation aufweist, scheinen solche Faktoren vom cellulären Kontext bestimmt zu werden. Diese Annahme wird von Experimenten mit p120(ctn) unterstützt. So kann p120(ctn), in Abhängigkeit vom cellulären Kontext, phosphoryliert werden, was wiederum einen starken Einfluß auf die durch p120(ctn) modulierte, Cadherin-vermittelte Zelladhäsion ausübt (Yap et al., 1998; Aono et al., 1999; Anastasiadis und Reynolds, 2000). Eine vergleichbare Phosphorylierung konnte auch für ARVCF nachgewiesen werden (Mariner et al., 2000).

ARVCF gehört der p120(ctn) Subfamilie der *armadillo repeat* Proteine an und weist eine große Homologie zu p120(ctn) auf. Beide Proteine binden an die juxtamembran Region (JMD) der Cadherine (Kaufmann et al., 2000; Thoreson et al., 2000; Ferber et al., 2002) und schließen sich, zumindest im Komplex mit E-Cadherin, dabei scheinbar gegenseitig aus (Mariner et al., 2000). Aufgrund dieser Tatsachen sollte untersucht werden, ob das inhomogene Bindeverhalten von mARVCF und N-Cadherin im MOM assay auf eine Kompetition zwischen den beiden *armadillo repeat* Proteinen mARVCF und p120(ctn) zurückzuführen ist. In MOM assays mit N-Cadherin, mARVCF und p120(ctn) konnte gezeigt werden, daß dies nicht der Fall ist. In der Gegenwart von ectopisch überexprimiertem p120(ctn) war mARVCF noch immer in der Lage, mit p120(ctn) zusammen am mitochondrial verankerten MOM-N-Cadherin zu lokalisieren. Andererseits gibt es Zellen, bei denen sowohl p120(ctn) als auch mARVCF an der Plasmamembran colocalisieren und die Bindestelle von N-Cadherin an den Mitochondrien unbesetzt bleibt.

Dieses unterschiedliche Bindeverhalten von mARVCF gegenüber N-, nicht aber E- oder M-Cadherin scheint besonders interessant im Kontext der Experimente von Navarro mit p120(ctn) und N-Cadherin (Navarro et al., 1998). Bei der Coexpression von VE- und N-Cadherin in Cadherin-defizienten CHO Zellen (*chinese hamster*

ovary), schließt VE-Cadherin N-Cadherin aus den Zell-*junctions* aus. VE-Cadherin Konstrukte ohne JMD (dadurch unfähig p120(ctn) zu binden) sind zu einem solchen Ausschluß von N-Cadherin nicht in der Lage. Eine Folgerung daraus ist, daß p120(ctn) durch die höher affine Bindung von VE-Cadherin und die weniger affine Bindung an N-Cadherin unterschiedliche Cadherin-Komplexe an den *adherens junctions* generiert (Anastasiadis und Reynold, 2000). Eine ähnliche Modifikation des Cadherin-Catenin Komplexes an der Plasmamembran durch mARVCF wäre möglich.

Die differenzielle Interaktion von mARVCF und N-Cadherin könnte auch im Hinblick auf Experimente relevant sein die zeigen, daß die Expression von N-Cadherin assoziiert ist mit Metastasierung und Zell-Migration (Niemann et al., 1999; Hazan et al., 2000). Einerseits führt die Überexpression von N-Cadherin in MCF7 Zellen in Kultur zur Invasivität (Hazan et al., 2000). Andererseits wird die Invasivität von N-Cadherin-positiven Zellen durch Expression von E-Cadherin verhindert (Frixen et al., 1991). Darüber hinaus wurde N-Cadherin als *pathfinding molecule* beschrieben, das bei der Migration myotomaler Zellen während der Myogenese benötigt wird (Brand-Saberi et al., 1996).

Bei diesen Prozessen, bei denen ein Wechsel zwischen starker (durch E-Cadherin vermittelter) und schwächerer (durch N-Cadherin vermittelter) Adhäsion stattfindet, könnte ARVCF durch dessen unterschiedliche Bindekapazität für verschiedene Cadherine eine modulierende Rolle spielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Experimenten gezeigt werden, daß alle acht potentiellen mARVCF Splice-Varianten in der Lage sind, mit den untersuchten Cadherinen zu interagieren. Auch hinsichtlich der subcellulären Lokalisation und der Colokalisation mit Cadherinen, zeigen alle Isoformen das gleiche Verhalten. Somit konnte nachgewiesen werden, daß die durch alternatives Splicen veränderten N- und C-Termini von mARVCF die Bindung an die Cadherine nicht beeinflussen. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Kaufmann überein, nach denen die *armadillo repeat* Region von mARVCF zur Anbindung an die Cadherine benötigt wird (Kaufmann et al., 2000). Da das Vorkommen von alternativen Isoformen jedoch innerhalb der gesamten p120(ctn) Subfamilie konserviert ist (Paffenholz und Franke, 1997; Keirsebilck et al., 1989;

Hatzfeld 1999), scheint es für die Funktion dieser Proteingruppe von Bedeutung zu sein. Alternatives Splicen betrifft in der Regel die N- und C-Termini dieser Proteine, die *armadillo repeats* bleiben jedoch meist unverändert und dadurch offenbar frei für die Interaktion mit Cadherinen. Möglicherweise können die verschiedenen Isoformen die Cadherin-Funktion dadurch beeinflussen, daß über die veränderten N- und C-Termini unterschiedliche Bindepartner zum Cadherin-Catenin Komplex an der Plasmamembran rekrutiert werden (Anastasiadis und Reynolds, 2000).

Im Falle von mARVCF sind das alternative Splicen der N-terminalen *coiled-coil* Domäne und des C-terminalen PDZ-Bindemotivs (DSWV) der Variante 3/7 am offensichtlichsten dazu geeignet, unterschiedliche Partner zu rekrutieren.

Für humanes ARVCF (hARVCF) konnte gezeigt werden, daß Erbin, ein Protein der *leucine rich repeat and PDZ domain protein family* über dessen PDZ Domäne hoch affin und spezifisch an die PDZ-Bindedomäne von hARVCF, p0071 und δ -Catenin binden kann (Laura et al., 2002). Alle drei Proteine weisen an ihrem C-terminalen Ende das, auch in der murinen ARVCF Isoform 3/7 vorhandene, PDZ-Bindemotiv DSWV auf. Durch Coimmunfluoreszenz- und Coimmunprecipitations-Analysen konnte weiterhin gezeigt werden, daß hARVCF oder δ -Catenin mit β -Catenin, N- oder E-Cadherin und Erbin in einem Komplex vorkommen. Diese Ergebnisse legen nahe, daß hARVCF oder δ -Catenin die Assoziation von Erbin mit dem *junctional* Cadherin-Catenin Komplex vermitteln (Laura et al., 2002).

5.3 Assoziation von mARVCF und dem LIM-only Protein FHL2

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das LIM-only Protein FHL2 als neuer Interaktionspartner von mARVCF identifiziert. FHL2 ist ein 4½-LIM Domänen Protein, zeigt eine starke Expression in Herz- und Skelettmuskel, ist aber in malignen Rhabdomyosarcoma Zellen herunter reguliert (Genini et al., 1997). Hier konnte gezeigt werden, daß FHL2 durch die Interaktion mit mARVCF aus den Fokalkontakten, wo es mit Integrinen interagiert, zum Cadherin-Catenin Komplex an der Plasmamembran transloziert.

Vermutlich auf Grund des geringen Expressionslevels von endogenem mARVCF (Waibler, 1998; Mariner et al., 2000) in den eingesetzten Mausmyoblasten, können

diese Effekte nur nach exogener Überexpression von mARVCF beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse sind vom *armadillo repeat* Protein β -Catenin bekannt, wo in einigen Zellen die nucleäre Lokalisation des Proteins erst nach Überexpression zu detektieren ist, da der freie, cytoplasmatische *pool* an β -Catenin zu gering ist (Behrens et al., 1996).

Die Assoziation von FHL2 als Integrin Bindepartner mit einem Interaktionspartner der juxtamembran Domäne (JMD) der Cadherine ist besonders im Kontext des Cadherin-Integrin *crossstalks* von Interesse. So wurden beispielsweise kurze Peptide, die funktionellen Domänen (juxtamembran Domäne, SHC Binderegion, Catenin Bindedomäne) der CPD von N-Cadherin entsprechen in Hühnchen *explants* eingebracht. Diese wurden anschließend hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Adhäsion auf Laminin und des Auswachsens von Neuriten untersucht. Beides sind Vorgänge, die durch Integrine vermittelt werden und auch durch anti-Integrin Antikörper blockiert werden können. Dabei zeigte sich, daß nur die Peptide, die der JMD entsprechen, beide Integrin-vermittelten Ereignisse vollkommen blocken können. Peptide der beiden anderen funktionellen Domänen zeigten keinen Effekt auf die Adhäsion oder das Neuriten Wachstum (Lilien et al., 1999).

Durch die Analyse dominant-negativer Integrin und Cadherin Konstrukte beim Auswachsen von Axonen in der *Xenopus* Retina (ebenfalls ein Integrin-vermittelter Vorgang) konnte die Vorstellung, daß die JMD von N-Cadherin verschiedene Funktionen der Integrine regulieren kann unterstützt werden (Lilienbaum et al., 1995; Riehl et al., 1996).

Da mARVCF in der vorliegenden Arbeit als ein Mediator zwischen dem Cadherin-Catenin Komplex an der Plasmamembran und dem Integrin Interaktionspartner FHL2 charakterisiert werden konnte, scheint das Protein ebenfalls als Vermittler zwischen Cadherinen und Integrienen in Frage zu kommen. Besonders im Hinblick auf die oben beschriebenen Experimente mit der JMD der Cadherine scheint mARVCF von Interesse, da das Protein als Bindepartner der JMD beschrieben wurde (Kaufmann et al., 2000). Der andere bekannte Interaktionspartner der JMD der Cadherine, p120(ctn), scheint bei einer Vermittlung zwischen Cadherinen und Integrienen weniger in Betracht zu kommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß p120(ctn) in dem hier herangezogenen Zellsystem (C2C12 Mausmyoblasten), wie auch in anderen Zellen (Reynolds et al., 1996; Nonnenmacher, 2001), nach

exogener Überexpression zu einem sog. dendritischen Phänotyp der transfizierten Zellen führt. Eine Translokation von FHL2 an die Plasmamembran nach Cotransfection mit p120(ctn) konnte demzufolge nicht gezeigt werden.

Die postulierte Rolle von mARVCF als Vermittler zwischen Cadherinen und Integrinen ist auch im Hinblick auf die Muskelentwicklung interessant. Wie von B. Martin gezeigt, scheint FHL2 eine kritische Rolle bei der Muskelentwicklung, insbesondere der Fusion von Myoblasten zu Myotuben zu spielen. Dabei scheint FHL2 die myogene Differenzierung zu beschleunigen, indem es mit β -Catennin interagiert und so zur Repression β -Catenin-abhängiger Gene beiträgt (Martin et al., 2002).

Auch die Expression von FHL2 in Myoblasten, aber der geringe FHL2 Level im malignen Gegenstück, den Rhabdomyosarcoma Zellen, läßt eine wichtige Rolle des Proteins während der Skelettmuskel Differenzierung vermuten (Genini et al., 1997). Andererseits scheint die JMD der Cadherine ebenfalls eine wichtige Rolle bei der myotomalen Entwicklung zu spielen (Horikawa und Takeichi, 2001). Durch die Expression einer JMD-defizienten N-Cadherin Mutante in Somiten von Hühnchen Embryonen konnte die morphogenetische Expansion des Myotoms stark unterdrückt werden. Auch bei diesen Vorgängen scheint p120(ctn), als prominentester Interaktionspartner der JMD, keine Rolle zu spielen, denn eine Substitution von 3 AS in der JMD von N-Cadherin ist zwar in der Lage, die Anbindung von p120(ctn) an das Cadherin spezifisch zu inhibieren, hat jedoch keinen Effekt auf die myotomale Entwicklung in den Hühnchen Embryonen. Somit scheint die regulatorische Funktion der JMD von N-Cadherin durch andere JMD-Bindepartner als p120(ctn) vermittelt zu werden (Horikawa und Takeichi, 2001).

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die in unserer Arbeitsgruppe identifizierten Splice-Varianten des murinen ARVCF (mARVCF) cloniert und charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, daß alle 8 putativen Isoformen im gleichen Maße mit den Zelladhäsions-Molekülen M-, E- und N-Cadherin interagieren können und mit diesen an der Plasmamembran bzw. den Zell-Zellkontakten colocalisieren. Dabei nimmt N-Cadherin eine Sonderstellung ein. Zum einen ist die Interaktion mit endogenem N-Cadherin abhängig vom Zellkontext und zum anderen konnte mit Hilfe des MOM *recruitment assays* gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu MOM-M- und MOM-E-Cadherin, eine Assoziation von mARVCF und MOM-N-Cadherin nicht in jeder Zelle stattfindet. Eine mögliche Konkurrenz von mARVCF mit dem nahe verwandten *armadillo repeat* Protein p120(ctn) um die Bindestelle in N-Cadherin konnte dabei als Ursache ausgeschlossen werden.

Als nächstes wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß mARVCF eine duale Lokalisation an der Plasmamembran und im Zellkern aufweist. Dabei unterliegt mARVCF einem effektiven Exportmechanismus. Dieser Export kann durch Leptomycin B inhibiert werden, scheint somit also CRM1/exportin1-vermittelt zu sein und wird offenbar durch zwei verschiedene NES (*nuclear export signal*)-Sequenzen in mARVCF reguliert. Das in der p120(ctn) Subfamilie (zu der auch mARVCF gehört) konservierte NLS (*nuclear localisation signal*) konnte als für den Protein-Import unwirksam charakterisiert werden.

Weiterhin wurde das LIM-*only* Protein FHL2 als neuer Interaktionspartner von mARVCF identifiziert. Dabei wirkt mARVCF als Mediator zwischen dem Cadherin-Catenin Komplex an der Plasmamembran und dem Interaktionspartner der Integrine FHL2. mARVCF ist in der Lage, FHL2 aus den Fokalkontakten zum Cadherin-Catenin Komplex an der Membran zu translozieren und in den Komplex einzubinden.

7. Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Sonstige Symbole und Abkürzungen

A	Adenin
A	Amper
a.d.	aqua dest
Abb.	Abbildung(en)
Ac	Acetat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BP	Birkenprofilin
BSA	<i>Bovine</i> -Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C	Cytosin
ca.	zirka
CBD	Catenin Bindedomäne
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CPD	cytoplasmatische Domäne
DNA	Desoxiribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat
EC	extracelluläre Subdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
evtl.	eventuell
exkl.	exklusive
F	Farad
Fa.	Firma
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunde(n)
inkl.	inklusive
JMD	juxtamembran Domäne

Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen(paar(e))
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
L	Liter
LMB	Leptomycin B
Lsg.	Lösung
M	molar
m	Milli-
max.	maximal
μ	Mikro
min	Minuten
mind.	mindestens
mol	Mol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
N	normal
n	Nano-
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
nt	Nucleotid(e)
OD	Optische Dichte
p	Pico-
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
polyA+	polyadenyliert
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
S.	Seite
s.	siehe
sec.	Sekunde(n)
sek.	sekundär
sog.	sogenannt
T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
TM	transmembran Region
U	Einheit(en)
u. U.	unter Umständen
u. v. m.	und vieles mehr
u.a.	unter anderem
ü/N	über Nacht
usw.	und so weiter
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

8. Literaturverzeichnis

- Abu-Shaar, M., Ryoo, H. D. und Mann, R. S. (1999). Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.* 13, 935-945.
- Anastasiadis, P. Z., Moon, S. Y., Thoreson, M. A., Mariner, D. J., Crawford, H. C., Zheng, Y. Reynolds, A. B. (2000). Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat. Cell. Biol.* 2, 637-644.
- Bachmann, B. J. (1983). Linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol. Rev.* 47, 180-185.
- Beckerle, M.C. (1997). Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays.* 19, 949-57.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Groschedl, R. und Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcriptionfactor LEF-1. *Nature* 15, 638-642.
- Benson, D. L. und Tanaka, H. (1998). N-cadherin redistribution during synapsogenesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18(17), 6892-6904.
- Birchmeier, W. und Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem.-Biophys. Acta* 1198, 11-26.
- Bornemann, A. und Schmalbruch, H. (1994). Immunocytochemistry of M-cadherin in mature and regenerating rat muscle. *Anat Rec* 239, 119-125.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A. und Hotchin, N. A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell. Biol.* 137, 1421-1431.
- Brand-Saberi, B., Gamel, A. J., Krenn, V., Mueller, T. S., Wilting, J. und Christ, B. (1996). N.cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud. *Dev Biol* 178, 160-173.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). A high efficiency plasmid transforming recA *E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio. Techniques* 5, 376.
- Butz, S. und Kemler, R. (1994). Distinct cadherin-catenin complexes in Ca (2+) -dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett.* 355, 195-200.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., McDonald, R. J. und Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acids from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Chothia, C. und Jones, E. Y. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 823-862.

- Cowin, P. und Burke, B. (1996). Cytoskeletal-membrane interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 56-65.
- Daniel, C. W., Strickland, P. und Friedmann, Y. (1995). *Dev. Biol.* 169, 511-519.
- Daniel, J. M. und Reynolds, A. B. (1995). The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous poliposis coli protein or α -catenin. *J. Cell Biol.* 15, 4819-4824.
- Daniel, J. M. und Reynolds, A. B. (1999). The catenin p120ctn interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 19, 3614-3623.
- Dawid, I.B. (1998). LIM protein interactions: Drosophila enters the stage. *Trends Genet.* 14, 480-2.
- Deguchi, M., Iizuka, T., Hata, Y., Nishimura, W., Hirao, K., Yao, I., Kawabe, H. und Takai, Y. (2000). PAPIIN. A novel multiple PSD-95/Dig-A/ZO-1 protein interacting with neural plakophilin-related armadillo repeat protein/delta-catenin and p0071. *J. Biol. Chem.* 275, 29875-80.
- Desmaze, C., Prieur, M., Amblard, F., Aikem, M., LeDeist, F., Demczuk, S., Zucman, J., Plougastel, B., Delattre, O., Croquette, M. F., et al. (1993). Physical mapping by FISH of the DiGeorge critical region (DGCR): involvement of the region in familial cases. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1239-1249.
- Detrick, R. J., Dichey, D. und Kitner, C. R. (1990). The effect of N-cadherin misexpressing on the morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron* 4, 493-506.
- Donalies, M., Cramer, M., Ringwald, M. und Starzinski-Powitz, A. (1991). Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8024-8028.
- Eng, H., Herrenknecht, K., Semb, H., Starzinski-Powitz, A., Ringertz, N. und Gullberg, D. (1997). Effects of divalent cations on M-cadherin expression and distribution during primary rat myogenesis in vitro. *Differentiation* 61, 169-176.
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (1996). Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr. Biol.* 6, 1385-8.
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (1998). PDZ domains and the formation of protein networks at the plasma membrane. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 228, 209-33.
- Ferber, A., Yean, C., Sarmiento, E. und Martinez, J. (2002). An octapeptide in the juxtamembrane domain of VE-cadherin is important for p120 binding and cell proliferation. *Exp. Cell Res.* 274, 35-44.
- Fimia, G.M., De Cesare, D. und Sassone-Corsi, P. (1999). CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT. *Nature* 398, 165-9.
- Finnemann, S., Mitrik, I., Hess, M., Otto, G. und Wedlich, D. (1997). Uncoupling of XB/U-cadherin-catenin complex formation from its function in cell cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 272, 11856-11862.

- Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D. und Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell. Biol.* 113, 173-85.
- Gaetje, R., Kotzian, S., Herrmann, G., Baumann, R. und Starzinski-Powitz, A. (1997). Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the tumor suppressor molecule E-cadherin. *Am J Path* 150, 461-467.
- Geiger, B. und Ayalon, O. (1992). Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* 8, 307-332.
- Genini, M., Schwalbe, P., Scholl, F. A., Remppis, A., Mattei, M. G. und B. W. Schäfer, B. (1997). Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma. *DNA Cell Biol.* 16, 433-42.
- Gorlich, D. und Mattaj, I. W. (1996). *Science* 271, 1513-1518.
- Grosheva, I., Shtutman, M., Elbaum, M. und Bershadsky, A. D. (2001). p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J. Cell. Sci.* 114, 695-707.
- Haffar, O. K., Popov, S., Dubrovsky, L., Agostini, I., Tang, H., Pushkarsky, T., Nadler, S. G. und Bukrinsky, M. (2000). Two nuclear localisation signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of HIV-1 pre-integration complex. *J. Mol. Biol.* 2, 359-368.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli* in DNA-cloning. 1. Herausgeber: Glover, D. M. (IRL press), 109-135.
- Hatzfeld, M., Kristjansson, G. I., Plessmann, U. und Weber K. (1994). Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J. Cell Sci.* 107, 2259-2270.
- Hartzfeld, M. und 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. *J. Cell. Sci.* 109, 2767-2778.
- Hatzfeld, M. (1999). The armadillo family of structural proteins. *Int Rev Cytol* 186, 179-224.
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L. und Aarson, S. A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell. Biol.* 148, 779-90.
- Heid, H. W., Schmidt, A., Zimbelmann, R., Schafer, S., Winetr-Simanowski, S., Stumpp, S., Keith, M., Figge, U., Schnolzer, M. und Franke, W. W. (1994). Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation* 58, 113-131.
- Hertig, C. M., Butz, S., Koch, S., Eppenberger-Ebehardt, M., Kemler, R. und Eppenberger, H.M. (1996). N-cadherin in adult rat cardiomyocytes in culture. *J. Cell Sci.* 109, 11-20.
- Hinck, L., Näthke, I. S., Papkoff, J. und Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin-catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* 125, 1327-1340.

- Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A und Takeichi, M. (1987). Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J. Cell Biol.* 105, 2501-2510.
- Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S. und Takeichi, M. (1992). Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell.* 70, 293-301.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Horikawa, K. und Takeichi, M. (2001). Requirement of the juxtamembrane domain of the cadherin cytoplasmic tail for morphogenetic cell rearrangement during myotome development. *J Cell Biol.* 155(7), 1297-306.
- Huber, O., Bierkamp, C. und Kemler, R. (1996). Cadherins and catenins in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 685-691.
- Huber, A. H., Nelson, W. J. und Weiss, W. I. (1997). Three-dimensional Structure of the armadillo repeat region of β -catenin. *Cell* 90, 871-882.
- Humphries, M. J. und Newham, P. (1998). The structure of cell adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* 8, 78-83.
- Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S. und Nagafuchi, A. (1999). Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol.* 144(6), 1311-22.
- Inomata, M., Ochiai, A., Akimoto, S., Kitano, S. und Hirohashi, S. (1996). *Cancer Res.* 56, 2213-2217.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A. und Wernig, A. (1994). Expression pattern of M-Cadherin in normal, denervated and regenerating mouse muscle. *Dev Dyn* 199, 326-337.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A. und Wernig, A. (1997 a). Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts. *J. Phys.* 500, 775-785.
- Irintchev, A., Langer, M., Zweyer, M. und Wernig, A. (1997 b). Myoblasttransplantation in the mouse: what cell do we use. *Basic and Applied Myology* 7, 161-166.
- Karnovsky, A. und Klymkowsky, M. W. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4522-4526.
- Kaufmann, U. (2000). Analyse der Wechselwirkung von M-Cadherin zum Cytoskelett und Cytoskelett-assoziierten Faktoren. Doktorarbeit, Frankfurt am Main.
- Kaufmann, U., Zuppinger, C., Waibler, Z., Ruediger, M., Urbich, C., Martin, B., Jockusch, B., Eppenberger, H. und Starzinski-Powitz A. (2000). The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *J Cell Sci.* 113, 4121-4135.

- Kaupmann, K., Becker-Follmann, J., Jockusch, H. und Starzinski-Powitz, A. (1992). The gene of the cell adhesion molecule M-cadherin maps to mouse chromosome 8 and human chromosome 16q24.1-qter and is near the E-cadherin (Uvomorulin) locus in both species. *Genomics* 14, 488-490.
- Keirsebilck, A., Bonne, S., Staes, K., van Hengel, J., Nollet, F., Reynolds, A. und van Roy F. (1998). Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): Expression of multiple alternative spliced isoforms. *Genomics* 50, 129-146.
- Kelly, D., R. Goldberg, D. Wilson, E. Lindsay, A. Carey, J. Goodship, J. Burn, I. Cross, R.J. Shprintzen und Scambler P.J. (1993). Confirmation that the velo-cardio-facial syndrome is associated with haplo-insufficiency of genes at chromosome 22q11. *Am. J. Med. Genet.* 45, 308-312.
- Klymkowsky, M. W. (1999). Plakophilin, Armadillo repeats and nuclear localization. *Microsc. Res. Tech.* 45, 43-54.
- Knudsen, K. A., Soler, A.P., Johnson, K.R. und Wheelock, M.J.. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J. Cell Biol.* 130, 67-77.
- Kowalczyk, A. P., Hatzfeld, M., Bornslaeger, E. A., Kopp, D. S., Borgwardt, J. E., Corcoran, C. M., Settler, A. und Green K. J. (1999). The head domain of plakophilin 1 binds to desmoplakin and enhances its recruitment to desmosomes. Implications for cutaneous disease. *J. Biol. Chem.* 274, 18145-18148.
- Kuch, C., Winnekendonk, D., Butz, S., Unvericht, U., Kemler, R. und Starzinski-Powitz, A. (1997). M-cadherin-mediated cell adhesion and complex formation with the catenins in myogenic mouse cells. *Exp Cell Res.* 232, 331-338.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. und Horinouchi, S. (1999). Leptomycin B inactivates CRM/exportin 1 by covalent modification at a cystein residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9112-9117.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J. und Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8263-8267.
- Laura, R. P., Witt, A. S., Held, H. A., Gerstner, R., Deshayes, K., Koehler, M. F., Kosik, K. S., Sidhu, S. S. und Lasky, L. A. (2002). The erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl-termini of d-catenin and ARVCF. *J. Biol. Chem.* 30, *epub ahead of print*.
- Liaw, C., Cannon, C., Power, M. D., Kiboneka, P. K. und Rubin, L. L. (1990). Identification and cloning of two species of cadherins in bovine endothelial cells. *EMBO J.* 9, 2701-2708.
- Lilien, J., Arregui, C., Li, H. und Balsamo, J. (1999). The juxtamembrane domain of cadherin regulates integrin-mediated adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 58, 727-734.
- Lilienbaum, A., Reszka, A. A., Horwitz, A. F. und Holt, C. E. (1995). Chemeric integrins expressed in retinal ganglion cells impair process outgrowth in vivo. *Mol. Cell Neurosci.* 6, 139-152.

- Lindl, T. und Bauer, J. (1998). Zell- und Gewebekultur. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Lu, Q., Paredes, M., Medina, M., Zhou, J., Cavallo, R., Peifer, M., Orecchio, L. und Kosik, K. S. (1999). Delta-catenin, an adhesive junction-associated protein which promotes cell scattering. *J. Cell Biol.* 144, 519-523.
- Maniatis T., Fritsch, E. F. und Sambrook, E. F. (1982). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mareel, M., Bracke, M. und van Roy, F. (1994). Invasion promotor versus invasion suppressor molecules: the paradigm of E-cadherin. *Mol. Biol. Rep.* 19, 45-67.
- Mariner, D.J., Wang, J. und Reynolds, A.B.. (2000). ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120ctn in E-cadherin complexes. *J. Cell Sci.* 113, 1481-1490.
- Martin, B., Wixler, V., Schneider, R., Waibler, Z., Behrens, J., von der Mark, K. und Starzinski-Powitz, A. (2002). The LIM-only protein FHL2 interacts with β -catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J. Cell Biol.*, eingereicht.
- McNeill, H., Ozawa, M., Kemler, R. und Nelson, W. J. (1990). Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 62, 309-316.
- Mertens, C., Kuhn, C. und Franke, W. W. (1996). Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J. Cell Biol.* 135, 1009-1025.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O. und Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates β -catenin - induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391- 399.
- Moore, R. und Walsh, F. (1993). The cell adhesion molecule M-cadherin is specifically expressed in developing and regenerating, but not denervated skeletal muscle. *Development* 117, 1409-1420.
- Morgan, M. J. und Madgwick, A. J. (1999). The fourth member of the FHL family of LIM proteins is expressed exclusively in the testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 255, 251-5.
- Morrow, B., Goldberg, R., Carlson, C., DasGupta, R., Sirotkin, H., Collins, J., Dunham, I., O'Donnell, H., Scambler, P., Shprintzen, R. und Kucherlapati R. (1995). Molecular definition of the 22q11 deletions in velo-cardio-facial syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 1391-1403.
- Müller, J.M., Isele, U., Metzger, E., Rempel, A., Moser, M., Pscherer, A., Breyer, T., Holubarsch, C., Buettner, R. und Schüle, R. (2000). FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *Embo J.* 19, 359-69.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M. und Rini J.M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360-364.
- Nathans, D. und Smith, M. (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 273-293.

- Näthke, I., Hinck, S., Swedlow, J.R., Papkoff J. und Nelson J. W. (1994). Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarised epithelial cells. *J. Cell Biol.* 125, 1341-1352.
- Navarro, P., Ruco, L. und Dejana, E. (1998). Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J. Cell Biol.* 140, 1475-1484.
- Nieman, M. T., Prudoff, R. S., Johnson, K. R. und Wheelock, M. J. (1999). N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J. Cell Biol.* 147, 631-44.
- Nonnenmacher, F. (2001). Herstellung und Charakterisierung von Expressionsklonen des Armadillo-Repeat-Proteins p120 in Säugierzellen. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.
- Noren, N. K., Liu, B. P., Burridge, K. und Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J. Cell Biol.* 150, 567-579.
- Nose, A., Nagfuchi, A. und Takeichi, M. (1987). Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell adhesion molecules. *EMBO J.* 6, 3655-3661.
- Nose, A., Tsuji, K. und Takeichi, M. (1990). Localization of specific determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61, 147-155.
- Ohkubo T. und Ozawa, M. (1999). P120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *J. Biol. Chem.* 274, 21409-21415.
- Ozawa, M., Baribault, H. und Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO* 8, 1711-1717.
- Paffenholz, R. und Franke, W. (1997). Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family. *Differentiation* 61, 293-304.
- Paffenholz, R., Kuhn, C., Grund, C., Stehr, S. und Franke, W. W. (1999). The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Exp. Cell. Res.* 250, 452-464.
- Paulson, A. J., Mooney, E., Fang, X., Ji, H. und McCrea, P. D. (2000). XARVCF, xenopus member of the p120 catenin subfamily associates with cadherin juxtamembrane region. *J. Biol. Chem.* 275, 30124-31.
- Peifer, M. und Wieschaus, E. (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin. *Cell* 63, 1167-1178.
- Peifer, M., Berg, S. und Reynolds, A. B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76, 789-791.
- Perego, C., Vanoni, C., Massari, S., Longhi, R. und Pietrini, G. (2000). Mammalian LIN-7 PDZ proteins associate with beta-catenin at the cell-cell junctions of epithelia and neurons. *EMBO* 19, 3978-89.

- Pierceall, W. E., Woodard, A. S., Morrow, J. S., Rimm, D. und Fearon, E. R. (1995). *Oncogene*, 11, 1319-1326.
- Pouliot, Y., Gravel, M. und Holland, P. C. (1994). Developmental regulation of M-cadherin in the terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Dev Dyn* 200, 305-312.
- Reynolds A. B., Roesel, D. J., Kanner, S. B. und Parson, J. T. (1989). Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol. Cell Biol.* 9, 629-638.
- Reynolds A. B. und Daniel, J. (1997). P120 catenin: a src substrate turned catenin. In *Cytoskeletal-Membrane Interactions and Signal Transduction*, 31-48. Landes Bioscience, Austin, TX USA.
- Reynolds A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., Wu, J. und Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol. Cell Biol.* 14, 8333-42.
- Reynolds A. B., Daniel, J. M., Mo, Y. Y., Wu, J. und Zhang, Z. (1996). The novel catenin p120cas binds classical cadherins and induces an unusual phenotyp in NIH3T3 fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 225, 328-337.
- Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G. B., Cornel, E., Lilienbaum, A. und Holt, C. E. (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* 17, 837-848.
- Rimm, D. I., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C.D. und Morrow, J.S. (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8813-8817.
- Riggleman B., Wieschaus, E. und Schedl P. (1989). Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev* 3, 96-113.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dölz, R., Jähmig, F., Epplen, J., Mayer, S., Müller, C. und Kemler, R. (1987). The structure of the cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺ dependent cell adhesion. *EMBO J.* 6, 3647-3653.
- Robbins, J., Dilworth, S., Lasky, R. und Dingwald, C. (1991). Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequences. *Cell* 64, 615-623.
- Rose, O., Rohwedel, J., Reinhardt, S., Bachmann, S., Cramer, M., Rotter, M., Wobus, M. und Starzinski-Powitz, A. (1994). Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cells in culture. *Dev. Dyn.* 201, 245-259.
- Rose, O., Grund, C., Reinhardt, S., Starzinski-Powitz, A. und Franke, W. W. (1995). Contactus adhaerens, a special type of plaque-bearing adhering junction containing M-cadherin, in the granule layer of the cerebellar glomerulus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6022-6026.

- Rüdiger, M., Jockusch, B.M. und Rothkegel, M. (1997). A novel epitope-antibody combination for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques* 23, 96-97.
- Sacco, P. A., McGranahan, M., Wheelock, M. J. und Johnson, K. R. (1995). Identification of plakoglobin domains required for association with N-cadherin and α -catenin. *J. Biol. Chem.* 270, 20201-20206.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloon, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. und Arnehim, N. (1985). Zytomatic application of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Garcia, I. und Rabbitts, T.H. (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.* 10, 315-20.
- Schäfer, A. (2000). Charakterisierung von murinem ARVCF in differenzierenden Skelettmuskelzellen. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.
- Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Pratzel, S., Zimbelmann, R. und Franke, W. W. (1997). Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res.* 290, 481-499.
- Schmidt, A., Langbein, L., Pratzel, S., Rode, M., Rackwitz, H. R. und Franke, W. W. (1999). Plakophilin 3-a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. *Differentiation* 64, 291-306.
- Scholl, F. A., McLoughlin, P., Ehler, E., de Giovanni, C. und Schäfer, B. W. (2000). DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *J Cell Biol.* 151, 495-506.
- Shimoyama, Y., Yoshida, T., Terada, M., Shimosato, Y., Abe, O. und Hirohashi, S. (1989). Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues. *J Cell Biol.* 109, 1787-94.
- Shan, W. S., Tanaka, H., Phillips, G. R., Arndt, K., Yoshida, M., Colman, D. R. und Shapiro, L. (2000). Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol* 148(3), 579-90.
- Shapiro, L., Fannon, A. M., Kwong, P. D., Thompson, A., Lehmann, M. S., Grübel, G., Legrand, I., Als-Nielsen, J., Colman, D.R. und Hendrickson, W.A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature.* 374, 327-336.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., Matsuyoshi, N. und Takeichi, M. (1995). Association of p120, a tyrosine kinase substrate, with E-cadherin/catenin complexes. *J. Cell Biol.* 128, 949-957.
- Sirotkin H., O'Donnell, H., DasGupta, R, Halford, S., St Jore, B., Puech, A., Parimoo, S., Morrow, B., Skoultchi, A., Weissman, S. M., Scambler, P. und Kucherlapati, R. (1997). Identification of a new human catenin gene family member (ARVCF) from the region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics.* 41, 75-83.

- Smith, E. A. und Fuchs, E. (1998). Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J. Cell Biol.* 141, 1229-1241.
- Staddon, J. M., Smales, C., Schulze, C., Esch, F. S. und Rubin, L. L. (1995). p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J. Cell Biol.* 130, 369-381.
- Steinberg, M. S. und McNutt, P. M. (1999). Cadherins and their connections: Adhesion junctions have border functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 545-560.
- Sterzel, E. (1997). Suche nach M-Cadherin Bindungspartner in einer Myoblasten-cDNA-Bank mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.
- Studier, F. W. und Moffat, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113.
- Takeichi M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenic regulator. *Science* 251, 1451-1455.
- Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 806-811.
- Tamura, K., Shan, W. S., Hendrickson, W. A., Colman, D. R. und Shapiro, L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neuronal (N-) cadherin. *Neuron* 20, 1153-1163
- Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J.M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K. und Reynolds, A. B. (2000). Selective uncoupling of p120 (ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol.* 148, 189-202.
- Tsukita, S., Tsukita, S., Nagafuchi, A. und Yonemura, S. (1992). Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adhesion junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 834-839.
- Urbich, C. (1998). Molekulare Charakterisierung zellulärer Protein-Bindungspartner des M-Cadherin-Catenin-Komplexes. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., Peifer, M., Mortin, M. und Clevers, H. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789-799.
- van Hengel, J., Vanhoenacker, P., Staes, K. und van Roy, F. (1999). Nuclear localisation of the p120 ctn Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96, 7980-7985.
- Vestber, D. und Kemler, K. (1985). Identification of a putative cell adhesion domain of uvomoruli. *EMBO J.* 4, 3393-3398.
- Waibler, Z. (1998). Expressionsanalyse M-Cadherin assoziierter cytoplasmatischer Proteine in differenzierten Skelettmuskelzellen. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.
- Waibler, Z., Schäfer, A. und Starzinski-Powitz, A. (2001). mARVCF cellular localisation and binding to cadherins is influenced by the cellular context but not by alternative splicing. *J. Cell Sci.* 114, 3873-3884.

- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E. D. und Takeichi, M. (1998). Alpha-catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142, 847-857.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamid electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406.
- Wieschaus E. und Riggleman R. (1987). Autonomous requirements for the segment polarity gene *armadillo* during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* 49, 177-184.
- Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. und Taylor, S. S. (1995). *Cell* 82, 463-473.
- Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E., Westhoff, D., Smyth, N., Aumailley, M., Sonnenberg, A. und Paulsson, M. (2000). The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several alpha and beta integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J Biol Chem.* 275, 33669-78.
- Yaffe, D. und Saxl, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270; 725-727.
- Yap, A. S., Niessen, C. M. und Gumbiner, B. M. (1998). The juxtamembrane region of cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120(ctn). *J. Cell Biol.* 4, 779-789.
- Zeschnigk, M., Kozian, D., Kuch, C., Schmoll, M. und Starzinski-Powitz, A. (1995). Involvement of M-cadherin in fusion and terminal differentiation of myogenic cells. *J Cell Sci* 108, 2973-2981.
- Zhou, J., Liyanage, U., Medina, H., Ho, C., Simmons, A. D., Lovett, M. und Kosik, K. S. (1997). Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport.* 8, 2085-2090.

Veröffentlichungen

Kaufmann, U., Zuppinger, C., Waibler, Z., Ruediger, M., Urbich, C., Martin, B., Jockusch, B., Eppenberger, H. und Starzinski-Powitz A. (2000). The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *J Cell Sci.* 113, 4121-4135.

Waibler, Z., Schäfer, A. und Starzinski-Powitz, A. (2001). mARVCF cellular localisation and binding to cadherins is influenced by the cellular context but not by alternative splicing. *J. Cell Sci.* 114, 3873-3884.

Waibler, Z. und Starzinski-Powitz, A.. Cadherins in skeletal muscle development. Titel of the volume: Brand-Saberi (Ed.): *Vertebrate Myogenesis. Series: Results and Problems in Cell Differentiation.* Springer-Verlag, New York, im Druck.

Martin, B., Wixler, V., Schneider, R., Waibler, Z., Behrens, J., von der Mark, K. und Starzinski-Powitz, A. (2002). The LIM-only protein FHL2 interacts with β -catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J. Cell Biol.*, eingereicht.

Waibler, Z., Martin, B., Wixler, V. und Starzinski-Powitz, A. (2002). The armadillo repeat protein mARVCF recruits the LIM-only protein FHL2 to the cadherin-based junctions. In Vorbereitung.

Lebenslauf

Zoe Waibler

Diplom-Biologin
Raiffeisenstr. 70
60386 Frankfurt am Main

Persönliche Daten

Geburtsdatum:	29.10.1973
Geburtsort:	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schule

1980-1983	Grundschule am Hang, Frankfurt am Main
1984-1993	Additive Gesamtschule am Ried, Frankfurt am Main
	Abschluß Allgemeine Hochschulreife

Studium

ab Oktober 1993	Biologie-Studium, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik 1. Nebenfach: Zoologie 2. Nebenfach: Vor- und Frühgeschichte
ab Januar 1998	Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Institut der Anthropologie und Humangenetik, AK Starzinski-Powitz Titel der Diplomarbeit: Expressionsanalyse M-Cadherin assoziiierter cytoplasmatischer Proteine in differenzierenden Skelettmuskelzellen
ab Januar 1999	Promotion, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Institut der Anthropologie und Humangenetik, AK Starzinski-Powitz Titel der Doktorarbeit: Molekulare Analysen des <i>armadillo</i> <i>repeat</i> Proteins mARVCF