



# „DER EINFLUSS DES P0071 PROTEINS AUF DIE ZELLPOLARITÄT“

**Dissertation**

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I

(Biowissenschaften)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

**Jenny Schulz**

geb. am 25.04.1986 in Berlin

Gutachter:

Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Otmar Huber

Tag der öffentlichen Verteidigung: 21.03.2016

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
ZUSAMMENFASSUNG .....	VI
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Die Zellpolarität .....	7
1.2 Die Entstehung der Zellpolarität in Epithelzellen .....	9
1.3 Die konservierten Polaritätskomplexe.....	11
1.4 Der molekulare Aufbau der Adherens Junctions und Desmosomen .....	13
1.5 Die Bedeutung der Armadillo-Proteinfamilie für die Zellpolarität .....	13
1.6 Die Bedeutung der Zellkontakte für die Zellpolarität.....	17
1.7 Der Zusammenhang zwischen Zellpolarität und Krebs.....	18
1.8 Der gerichtete Vesikeltransport.....	19
1.9 Verschiedene Modelle zur Untersuchung der Zellpolarität.....	22
1.10 Die Zielstellung der Arbeit.....	24
<b>2 Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
2.1 Die Lokalisation von p0071 in der murinen Haut.....	25
2.2 Der Aufbau der Adherens Junctions Komplexe in Keratinozyten .....	28
2.3 Die <i>de novo</i> Zell-Zell-Kontaktbildung in Mauskeratinozyten .....	33
2.4 Der Einfluss von p0071 und p120 auf die Cadherin-Lokalisation.....	38
2.5 Der Einfluss von p0071 und p120 auf die interzelluläre Adhäsion.....	42
2.6 Der Einfluss von p0071 und p120 auf die Proteinlevel von Adherens Junctions Komponenten.....	44
2.7 Der Einfluss der Cadherine auf die p0071 und p120 Lokalisation .....	46
2.8 Der Differenzierungsprozess in Keratinozyten.....	51
2.9 Die apikal-basolaterale Zellpolarität in Enterozyten.....	54
2.10 Der Differenzierungsprozess in Enterozyten .....	55
2.11 Die Caco-2 Kultivierung auf einem Biochip .....	61
2.12 Die p0071 Lokalisation während der Zystenbildung .....	64
2.13 Der Einfluss von p0071 auf die Zystenbildung von Caco-2 Zellen .....	66

---

2.14	Die Identifizierung neuer p0071 Interaktionspartner.....	71
2.15	Die COPII-Komponenten und p0071.....	72
2.16	Der VSVG-Transport vom ER zum Golgi-Apparat nach p0071 Knockdown...75	
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
3.1	p0071 als Adherens Junctions Komponente .....	79
3.2	Der Einfluss von p0071 auf die apikal-basolaterale Zellpolarität.....	85
3.3	Mögliche Funktionen von p0071 beim intrazellulären Proteintransport .....	89
3.4	Modell zur Rolle von p0071 bei der Zellpolarität .....	92
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>94</b>
4.1	Hefestämme.....	94
4.2	Plasmid-Transformation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109.....	95
4.3	Y2H Screening.....	96
4.4	DNA-Isolierung aus Hefen.....	97
4.5	Polymerase-Kettenreaktion für die Y2H Proben.....	98
4.6	Zelllinien .....	99
4.7	2D Zellkultur .....	99
4.8	3D Zellkultur .....	101
4.9	<i>Live Cell Imaging</i> .....	102
4.10	Zellzahlbestimmung.....	102
4.11	siRNA Transfektion.....	103
4.12	Lentivirale Transduktion.....	103
4.13	Immunzytologische Untersuchungen .....	104
4.14	Immunhistochemische Färbungen.....	106
4.15	Herstellung von Zelllysaten.....	107
4.16	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	108
4.17	SDS-PAGE.....	109
4.18	Western Blot .....	109
4.19	Immunpräzipitation .....	111
4.20	Dispase-Test.....	112
4.21	VSVG-Test.....	112

---

4.22	Endo H-Test.....	113
4.23	Vermessung der Orientierung der mitotischen Spindel .....	114
4.24	Statistische Auswertung .....	115
ANHANG .....		116
Anhang 1	Verwendete primäre Antikörper .....	116
Anhang 2	Verwendete sekundäre Antikörper .....	118
Anhang 3	Transfizierte siRNAs und shRNAs.....	118
Anhang 4	Transfizierte Plasmide .....	119
Anhang 5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	119
Anhang 6	TABELLENVERZEICHNIS .....	120
LITERATURVERZEICHNIS.....		121
DANKSAGUNG .....		130
LEBENS LAUF.....		131
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....		132

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
AEE	apikale <i>early endosomes</i>
aPKC	atypische Proteinkinase C
aq. dest.	Aqua destillata
ARE	apikale Recyclingendosome
ARVCF	<i>Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BEE	basale <i>early endosomes</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
COPII	<i>coatamer protein complex II</i>
CRE	<i>common recycling endosomes</i>
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DLG	<i>discs large</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Desmoplakin
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Cad.	Epithel-Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
Endo H	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
FA	Formaldehyd
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FRMPD2	<i>FERM and PDZ domain containing 2</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i> , GTPase-aktiverendes Protein
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> , GTP-Austauschfaktor
HaCaT	<i>human adult low calcium high temperature</i> Keratinozyten
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK-293T	<i>human embryonic kidney</i> Zellen
HeLa	Henrietta Lacks (bzw. Helen Lane)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
K	Kontrolle
KD	Knockdown
KLHL12	<i>kelch-like protein 12</i>
LGL	<i>lethal giant larvae</i>

<b>LSM</b>	<i>Laser Scanning Microscope</i>
<b>MCF-7</b>	Michigan Cancer Foundation - 7
<b>MDCK</b>	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MKZ</b>	Mauskeratinozyten
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>N-Cad.</b>	Neuronal-Cadherin
<b>NFKB</b>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>PALS</b>	<i>protein associated with LIN-7-1, auch als stardust bekannt</i>
<b>PATJ</b>	<i>PALS1-associated tight-junction protein</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PBSE</b>	<i>phosphate buffered saline + EDTA</i>
<b>P-Cad.</b>	Plazenta-Cadherin
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PES</b>	Polyethersulfon
<b>PKC <math>\zeta</math></b>	Proteinkinase C zeta
<b>Rac1</b>	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
<b>RhoA</b>	<i>ras homolog family member A</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>St.</b>	Saint
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TBST</b>	<i>Tris buffered saline + Tween20</i>
<b>TGN</b>	trans-Golgi-Netzwerk
<b>TJ</b>	Tight Junctions
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>VE-Cad.</b>	Vaskulär-endothelial-Cadherin
<b>VSVG</b>	Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein
<b>WB</b>	Western Blot
<b>Y2H</b>	<i>Yeast Two Hybrid</i>

**ZUSAMMENFASSUNG**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von p0071 auf die Zellpolarität untersucht. Für die Ausbildung der Zellpolarität sind u. a. Zell-Zell-Kontakte und der intrazelluläre Vesikeltransport von Bedeutung. Diese Aspekte wurden in unterschiedlichen Modellsystemen nähergehend analysiert.

Vergleichende Studien zwischen p0071 und dem verwandten p120 Catenin in Mauskeratinozyten und zum Teil in HaCaT-Zellen konnten für p120 eine regulierende Funktion auf das Proteinlevel und die Membranlokalisation der klassischen Cadherine zeigen. Die durchgeführten Experimente belegen zudem erstmals, dass die regulierende Funktion von p120 auf die klassischen Cadherine in diesen Zelllinien nicht auf p0071 übertragbar ist.

In den apikal-basolateral polarisierenden Caco-2 Zellen konnte ein Effekt von p0071 auf die Ausbildung gewebeartiger Strukturen sowie auf die Lumenbildung in der 3D Zellkultivierung nachgewiesen werden. So bedingt ein p0071 Knockdown ein erhöhtes Vorkommen multipolarer mitotischer Spindeln und gestörte Transportprozesse, die dazu führen, dass in den 3D gewachsenen Caco-2 Zysten mehrere Stellen mit fehllokalisierten apikalen Markern auftreten.

Ein zusätzlich durchgeführtes *Yeast Two Hybrid Screening* ergab außerdem erste Hinweise auf eine Beteiligung von p0071 an der Regulation des Vesikeltransports vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat.

Zusammenfassend konnte somit durch die vorliegende Arbeit erstmals ein Einfluss von p0071 bei der Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität gezeigt werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Zellpolarität

Die Zellpolarität, definiert als die asymmetrische Verteilung von Zellbestandteilen innerhalb einer Zelle (Martin-Belmonte *et al.*, 2012), besitzt eine sehr große Relevanz für viele Aspekte der Zell- und Entwicklungsbiologie. So dient zum Beispiel die asymmetrische Zellteilung der Basalzellen in der Epidermis der Regeneration der Haut, in dem dadurch einerseits der Erhalt der adulten Stammzellen sowie andererseits die Bildung differenzierungsfähiger Keratinozyten gewährleistet wird (Lechler *et al.*, 2005). Neben der asymmetrischen Zellteilung ist die Zellpolarität auch für die Gewebemorphogenese und die Zellmigration essentiell und damit für die Integrität von Geweben unerlässlich (Niessen *et al.*, 2012).

Höhere Organismen bestehen aus vielen verschiedenen Zellarten, die zur Wahrnehmung ihrer spezifischen Funktionen unterschiedliche Arten von Zellpolarität ausbilden (siehe Abb. 1-1, S. 8). Dadurch werden in polarisierten Zellen abgegrenzte funktionelle Domänen definiert, die für die Interaktion der Zelle mit einer variablen Umwelt notwendig sind und die die Orientierung, z. B. innerhalb eines Gewebes, die Funktion und das Schicksal der Zelle bestimmen können.

Zwei wichtige Arten der Zellpolarität sind in der Abb. 1-1 (S. 8) schematisch dargestellt. Die apikal-basolaterale Zellpolarität ist unter anderem für die Struktur und Funktion von einschichtigen Epithelien notwendig. Mehrschichtige Epithelien, wie die Haut, besitzen hingegen keine klar definierten apikal-basolateralen Membrandomänen, sondern weisen eine apikal-basolaterale Polarität über die verschiedenen Gewebeschichten hinweg auf (Niessen *et al.*, 2012). Die anterior-posteriore Polarität wird bei der asymmetrischen Zellteilung, der Zellmigration und der Axonspezifizierung ausgebildet.

Damit eine Zelle eine Zellpolarität ausbilden kann, muss sie zunächst Informationen über ihre Umgebung erhalten, d. h. wo sie sich in Bezug auf andere Zellen befindet. Diese Informationen werden durch Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Kontakte vermittelt und dienen dazu in der Zelle biologische Prozesse in Gang zu setzen, die zur Entstehung einer asymmetrischen Organisation innerhalb der Zelle führen. Bei diesen biologischen Prozessen spielen das Zytoskelett, verschiedene Zellkontakte, der

gerichtete Vesikeltransport und konservierte Polaritätskomplexe eine wichtige Rolle (Bryant *et al.*, 2008). Diese Aspekte werden in den nachfolgenden Abschnitten noch näher erläutert. Generell gilt, dass die Mechanismen zur Ausbildung der Zellpolarität von der Hefe über *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* bis zu den Säugetieren konserviert sind und die Zellpolarität essentiell für fast alle Ein- und Vielzeller ist.

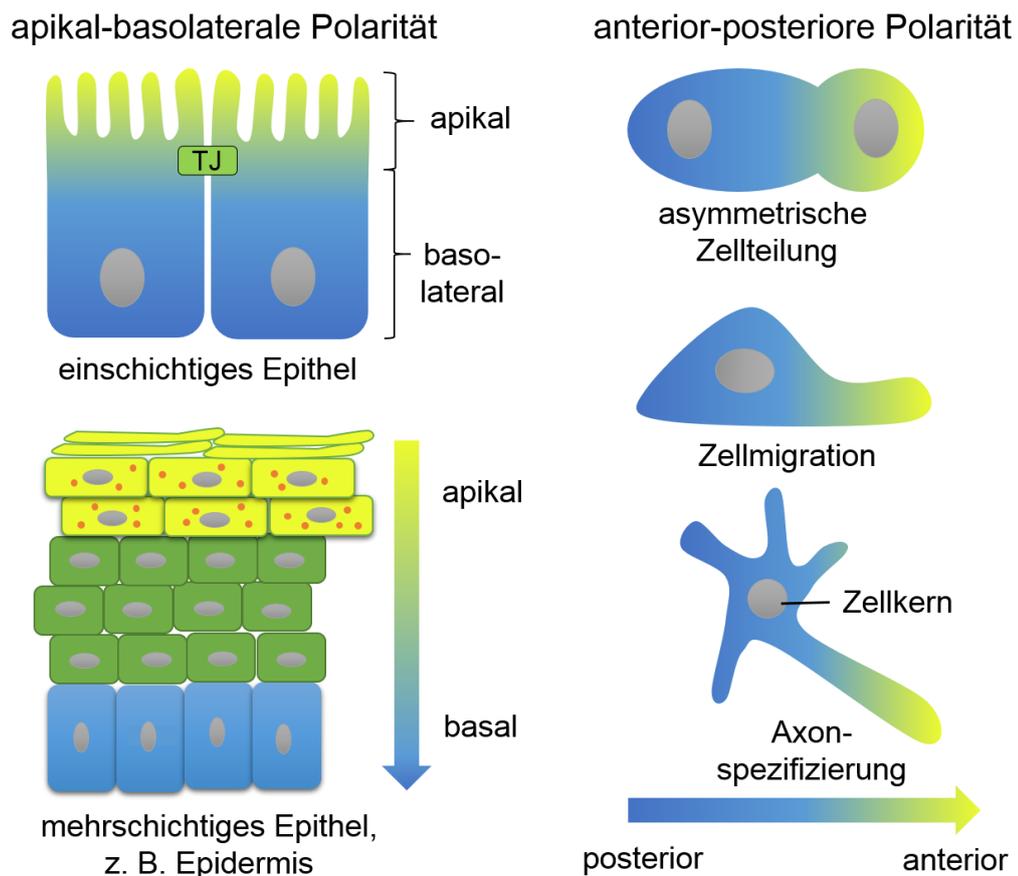


Abb. 1-1: Verschiedenen Arten der Zellpolarität

Einschichtige Epithelien weisen eine apikal-basolaterale Polarität auf. Die Grenze zwischen der apikalen und der basolateralen Membrandomäne bilden die Tight Junctions (TJ). Mehrschichtige Epithelien, wie die Epidermis, bilden eine apikal-basolaterale Polarität über die verschiedenen Gewebeschichten hinweg aus. Adulte Stammzellen teilen sich zum Teil durch asymmetrische Zellteilung und verfügen dazu über eine anterior-posteriore Polarität. Migrierende Zellen sowie Neuronen weisen ebenfalls eine anterior-posteriore Polarität auf, wodurch einerseits die Richtung der Zellmigration festgelegt ist bzw. andererseits die Richtung der Signalweiterleitung zwischen den Neuronen. Der Farbverlauf innerhalb der Zellen soll die asymmetrische Verteilung von Zellbestandteilen und so die Zellpolarität darstellen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Etienne-Manneville, 2004.

## 1.2 Die Entstehung der Zellpolarität in Epithelzellen

Epithelzellen sind die am häufigsten vertretene Zellart im menschlichen Körper und sind an der Ausbildung wichtiger Organe wie der Haut und dem Darm maßgeblich beteiligt. Als Barriere gegen die äußere Umwelt schützen Epithelien den Organismus, z. B. vor mechanischen Defekten und verhindern u. a. das Eindringen von schädlichen Mikroorganismen. Zudem sind sie für die Absorption und Sekretion verschiedenster Stoffe zuständig und stellen damit nicht nur eine Abgrenzung, sondern auch eine wichtige Kontaktfläche mit der Umgebung dar.

Einschichtige Darmepithelzellen, sogenannte Enterozyten, polarisieren zur Ausübung ihrer primären Funktionen – den Körper mit Nährstoffen zu versorgen und von der Außenwelt abzugrenzen – apikal-basolateral (Abb. 1-1, S. 8). Als apikal wird dabei die dem Darmlumen zugewandte Membrandomäne bezeichnet. Sie verfügt über einen Bürstensaum aus Mikrovilli zur Oberflächenvergrößerung, die wiederum einer effizienten Absorption und Sekretion dient. Die basale Membrandomäne verbindet die Zelle mit der extrazellulären Matrix, wohingegen die laterale Membrandomäne durch Zell-Zell-Kontakte charakterisiert ist, die sich zwischen benachbarten Zellen ausbilden. Da sich die Membranzusammensetzung der basalen und lateralen Membranregion nicht signifikant voneinander unterscheidet, jedoch stark von der apikalen Membranregion, werden diese oft als basolaterale Membrandomäne zusammengefasst.

Für die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität in einschichtigen Epithelien bilden benachbarte Zellen zunächst initiale Zell-Zell-Kontakte. An diesen initialen Zell-Zell-Kontakten kommt es zur *trans*-Dimerisierung von E-Cadherin *cis*-Dimeren (McNeill *et al.*, 1993), d.h., dass zwei E-Cadherin Moleküle auf derselben Plasmamembran zunächst *cis*-Dimere bilden, indem sie lateral miteinander assoziieren und anschließend mit anderen E-Cadherin *cis*-Dimeren auf benachbarten Plasmamembranen extrazellulär assoziieren und so *trans*-Dimere bilden.

Bei E-Cadherin handelt es sich um ein Transmembranprotein, das zur Familie der klassischen Cadherine gehört, die calciumabhängige, homophile Zell-Zell-Kontakte bilden (Takeichi, 1990). E-Cadherin ist ein wichtiger Bestandteil der Adherens Junctions in Epithelzellen. Adherens Junctions sind neben den Tight Junctions und Desmosomen eine Art von Zell-Zell-Kontakten. Die Adherens Junctions sorgen zusammen mit den Desmosomen für die mechanische Stabilität innerhalb eines Zellverbandes, indem die

Adherens Junctions das Aktinzytoskelett benachbarter Zellen miteinander verbinden und die Desmosomen das Keratinzytoskelett (siehe Abb. 1-2, S. 10). Die Tight Junctions hingegen verhindern die freie Diffusion löslicher Moleküle durch den interzellulären Raum sowie der apikalen und basolateralen Membranproteine außerhalb ihrer definierten Membrandomänen (Iken *et al.*, 2008). Dazu sind sie in polarisierten Epithelzellen oberhalb der Adherens Junctions und Desmosomen lokalisiert (siehe Abb. 1-2, S. 10).

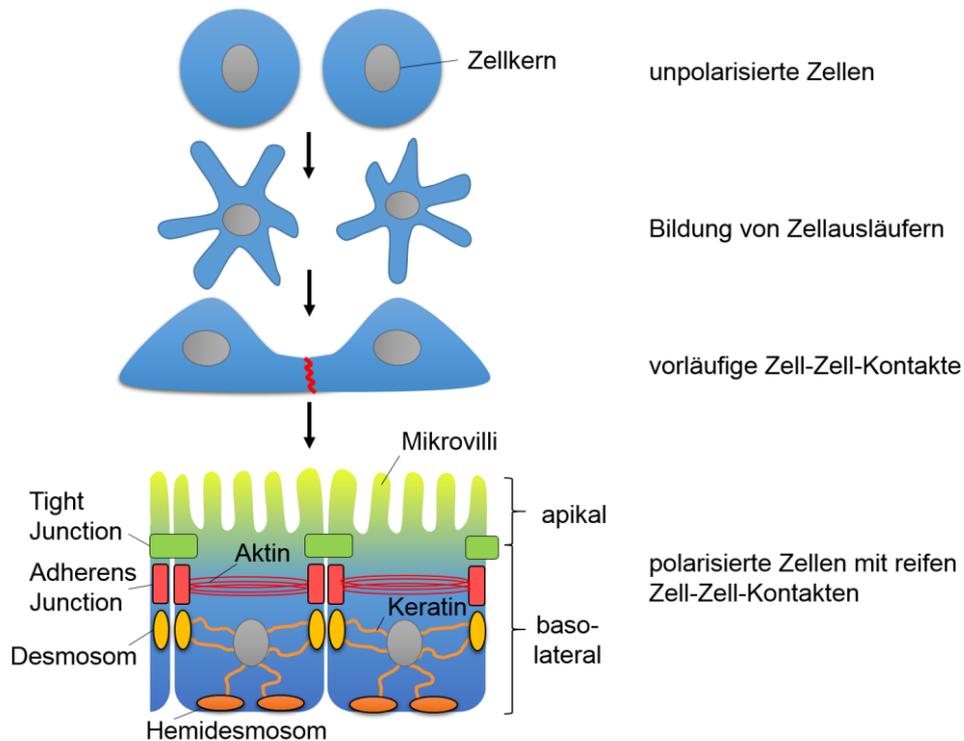


Abb. 1-2: Die Entstehung der Zellpolarität in einschichtigen Epithelien

Unpolarierte Zellen bilden zunächst Zellausläufer, um Kontakt mit benachbarten Zellen herzustellen. An dieser primären Kontaktzone entstehen dann vorläufige Zell-Zell-Kontakte, die biologische Prozesse in Gang setzen, die zur Ausbildung einer apikal-basolateralen Zellpolarität führen. Die Grenze zwischen den apikalen und basolateralen Membrandomänen bilden die Tight Junctions. Unterhalb dieser Zell-Zell-Kontakte sind die Adherens Junctions lokalisiert und darunter die Desmosomen. Hemidesmosomen wiederum stellen auf der basalen Zellseite Zell-Matrix-Kontakte her. Für die mechanische Stabilität der Epithelzellen sorgen die Adherens Junctions und Desmosomen, indem sie das Aktin- bzw. das Keratinzytoskelett benachbarter Zellen miteinander verbinden. Auf der apikalen Seite bilden Darmepithelzellen für einen effizienten Stoffaustausch Mikrovilli aus. Die Abbildung wurde modifiziert nach Ebnet, 2008.

An den initialen *trans*-dimerisierten E-Cadherin Molekülen lokalisieren weitere Adherens Junctions und Tight Junctions Proteine sowie die Komponenten des Par-Polaritätskomplexes. Dieser besteht aus den Proteinen Par3, Par6 und der atypischen Proteinkinase C (aPKC) (Suzuki *et al.*, 2001). Die aPKC führt dann mutmaßlich durch

Phosphorylierung von nachgeschalteten Signalgebern zur Reifung der Zell-Zell-Kontakte (Suzuki *et al.*, 2002). Diese ist notwendig um mit den Polaritätskomplexen zusammen einerseits die Orientierung und andererseits die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität zu gewährleisten.

### 1.3 Die konservierten Polaritätskomplexe

Die Definition von Membrandomänen in apikal oder basolateral geschieht mit Hilfe von Proteinkomplexen, die nur in bestimmten Membranbereichen lokalisieren und somit diese Bereiche gegenüber anderen abgrenzen. Neben den bereits eingeführten Zell-Zell-Kontakten spielen dabei auch drei stark konservierte Polaritätskomplexe eine wichtige Rolle, die zuerst in *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* charakterisiert wurden, aber auch in humanen Epithelien zu finden sind. Die drei Polaritätskomplexe – Par, Crumbs und Scribble – lokalisieren in unterschiedlichen Membranbereichen und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Lokalisation, so dass darüber die Aufrechterhaltung der apikal-basolateralen Zellpolarität in Epithelzellen gewährleistet wird (siehe Abb. 1-3, S. 11).

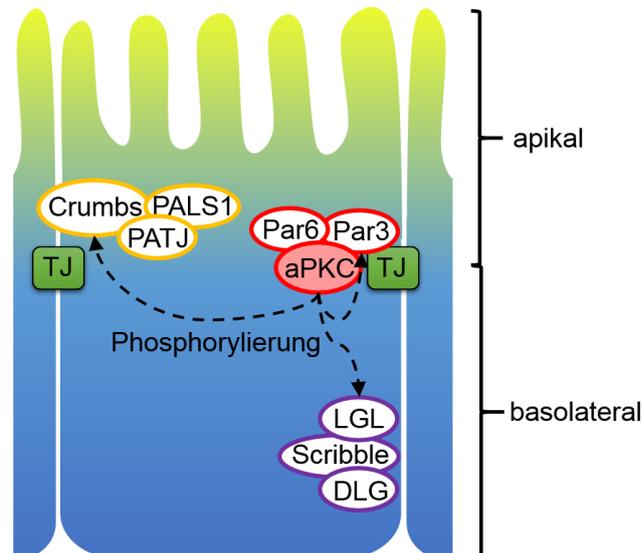


Abb. 1-3: Die Lokalisation der Polaritätskomplexe in einschichtigen Epithelien  
Apikal an den Tight Junctions (TJ) lokalisiert der Par-Komplex, bestehend aus Par3 und Par6 sowie der atypischen Proteinkinase C (aPKC). Ebenfalls apikal lokalisiert der Crumbs-Komplex, bestehend aus dem Crumbs-Protein sowie *protein associated with LIN-7-1* (PALS1) und *PALS1-associated tight junction protein* (PATJ). Der Scribble-Komplex lokalisiert basolateral und besteht neben dem Scribble-Protein aus *lethal giant larvae* (LGL) und *discs large* (DLG). Die aPKC kann verschiedene Proteine der Polaritätskomplexe phosphorylieren und beeinflusst so die Lokalisation der phosphorylierten Proteine. Die Abbildung wurde modifiziert nach Iden *et al.*, 2008.

Der Scribble-Komplex, neben dem Scribble-Protein bestehend aus *lethal giant larvae* (LGL) und *discs large* (DLG), definiert die basolaterale Membrandomäne (Laprise *et al.*, 2004). Dazu lokalisiert der Komplex an den Adherens Junctions entlang der basolateralen Membrandomäne, wohin das Scribble-Protein in Abhängigkeit von E-Cadherin transportiert wird (Navarro *et al.*, 2005).

Der Crumbs-Komplex besteht neben dem Transmembranprotein Crumbs aus PALS1 (*protein associated with LIN-7-1*, auch als *stardust* bekannt) und PATJ (*PALS1-associated tight-junction protein*) und lokalisiert in der apikalen Membrandomäne.

An der Grenze zwischen der apikalen und basolateralen Membrandomäne lokalisieren die Tight Junctions und an diesen der Par-Komplex. Diese definierte Lokalisation des Par-Komplexes erfolgt über eine Interaktion zwischen Par3 und einem Tight Junctions Protein (Ebnet *et al.*, 2001).

Die atypische Proteinkinase C kann Par3 (Nagai-Tamai *et al.*, 2002), Crumbs (Sotillos *et al.*, 2004) und LGL (Betschinger *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2003) phosphorylieren und reguliert darüber die Lokalisation der phosphorylierten Proteine sowie die der dazugehörigen Polaritätskomplexe. So führt ein Fehlen der Phosphorylierung von Crumbs durch aPKC zur Fehllokalisierung von Crumbs, PATJ, aPKC und Scribble und damit zu Störungen bei der Ausbildung der Zellpolarität in *Drosophila*-Embryonen (Sotillos *et al.*, 2004). Die Kinaseaktivität von aPKC wird durch Par6 und der Rho-GTPase Cdc42 (*cell division cycle 42*) reguliert. Bindet aktives Cdc42-GTP an Par6 wird dessen inhibierende Wirkung auf aPKC aufgehoben, welche dann z. B. Par3 phosphorylieren kann (Yamanaka *et al.*, 2001). Dies hat zu Folge, dass Par3 nicht länger im Par-Komplex vorkommt, was für die Reifung der Tight Junctions auch nicht notwendig ist (Horikoshi *et al.*, 2009). Für die korrekte Ausbildung der Tight Junctions ist jedoch eine Phosphorylierung von LGL durch aPKC erforderlich, die dafür sorgt, dass LGL nicht apikal lokalisieren kann (Yamanaka *et al.*, 2003).

## 1.4 Der molekulare Aufbau der Adherens Junctions und Desmosomen

Adherens Junctions sind eine Art von Zell-Zell-Kontakten, die neben der Funktion der Vermittlung mechanischer Stabilität im Zellverband auch an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt sind (Niessen, 2007). Molekular sind sie u. a. aus Transmembranproteinen, den Cadherinen aufgebaut. An den zytoplasmatischen Teil der Cadherine binden verschiedene Catenine. Diese Catenine vermitteln die Assoziation der Adherens Junctions mit dem Aktinzytoskelett und sorgen damit für die erwähnte mechanische Stabilität der Zellen. Die beiden Catenine p120 und  $\beta$ -Catenin binden die Cadherine direkt über ihre Armadillo-Domänen (Daniel *et al.*, 1995; Hulsken *et al.*, 1994; Ishiyama *et al.*, 2010).  $\beta$ -Catenin wirkt dabei regulierend auf die Adherens Junctions, indem es die Bindung von  $\alpha$ -Catenin, einem aktin-bindenden Protein, regelt (Drees *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2005). Das p120 Catenin reguliert hingegen die Stabilität der Cadherine an der Plasmamembran, indem es die Endozytose und den Abbau der Cadherine verhindert (Nanes *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2005). Darüberhinaus konnte für p120 ein Einfluss auf verschiedene Aspekte des Rho-Signalweges gezeigt werden.  $\beta$ -Catenin besitzt ebenfalls eine signalgebende Wirkung als wichtiger Bestandteil des Wnt-Signalweges.

Eine weitere Art von Zell-Zell-Kontakten stellen die Desmosomen dar. Sie werden ebenfalls durch Transmembranproteine, den desmosomalen Cadherinen Desmoglein und Desmocollin, gebildet. An den zytoplasmatischen Teil der desmosomalen Cadherine binden ebenfalls Proteine aus der Armadillo-Proteinfamilie sowie Desmoplakin. Die zytoplasmatischen Proteine vermitteln die Assoziation der Desmosomen mit dem Keratinzytoskelett und stärken dadurch die mechanische Stabilität der Zellen (Green *et al.*, 2007).

## 1.5 Die Bedeutung der Armadillo-Proteinfamilie für die Zellpolarität

Die Armadillo-Proteinfamilie ist charakterisiert durch eine variable Anzahl an Wiederholungen des Armadillo-Motivs, das erstmals im Segment-Polaritätsprotein Armadillo in *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (Riggleman *et al.*, 1989). Zu dieser Proteinfamilie gehört eine Vielzahl an Mitgliedern, die mitunter sehr unterschiedliche Funktionen ausüben. Zu den am besten charakterisierten Mitgliedern zählen  $\beta$ -Catenin und p120. Beide lokalisieren an Adherens Junctions in Epithelzellen, wo sie an den zytoplasmatischen Teil der klassischen Cadherine, wie E- und P-Cadherin

binden. Die Nomenklatur der klassischen Cadherine richtet sich häufig nach dem Gewebe, in dem sie vorwiegend exprimiert werden oder zuerst isoliert wurden. So kommt E (Epithelial)-Cadherin in den meisten Epithelien vor, N (Neuronal)-Cadherin tritt in neuronalem Gewebe auf und P (Plazental)-Cadherin wurde zuerst aus der Plazenta isoliert (Nose *et al.*, 1986). Mittels Zellkulturexperimenten wurde zudem gezeigt, dass es durch siRNA-vermittelte p120 Knockdowns nicht nur zu einer Reduktion der Proteinmenge an klassischen Cadherinen kommt, sondern auch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin durch lysosomalen Abbau (Davis *et al.*, 2003). Das bedeutet, dass p120 einen sehr entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Adherens Junctions in Epithelzellen besitzt.

Zur p120 Subfamilie der Armadillo-Proteinfamilie gehören neben p120 und p0071 auch ARVCF (*Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome*) und  $\delta$ -Catenin. Die Catenine p120, ARVCF und p0071 werden ubiquitär exprimiert und es existieren mehrere Isoformen von ihnen, ohne dass deren spezifische Funktionen bisher gut verstanden sind. Die Expression von  $\delta$ -Catenin ist auf das Nervensystem beschränkt, obwohl zum Teil in verschiedenen Tumorgeweben eine Re-Expression nachweisbar ist (Pieters *et al.*, 2012).



Abb. 1-4: Die Domänenstruktur von einigen Armadillo-Proteinfamilienmitgliedern. Alle abgebildeten Proteine gehören zur Armadillo-Proteinfamilie, die durch das Vorhandensein von Wiederholungen einer charakteristischen Aminosäuresequenz gekennzeichnet ist. Am äußersten C-Terminus besitzen einige Familienmitglieder ein PDZ-Bindemotiv, wodurch Wechselwirkungen mit PDZ-Domäne enthaltene Proteinen möglich sind. PDZ steht für die drei Proteine PSD96, DLG und ZO-1, bei denen zuerst diese Strukturdomäne entdeckt wurde. Die Abbildung wurde modifiziert nach Keil *et al.*, 2013.

Wie aus der Abb. 1-4 (S. 14) ersichtlich, weisen einige Familienmitglieder der Armadillo-Proteinfamilie ein C-terminales PDZ-Bindemotiv auf, worüber Interaktionen mit Proteinen, die eine PDZ-Domäne enthalten, möglich sind. PDZ steht für die drei Proteine PSD96, DLG und ZO-1, bei denen zuerst diese Strukturdomäne entdeckt

wurde. Die PDZ-Domänen spielen oftmals bei der Bildung größerer Proteinkomplexe eine Rolle. Für p0071 konnte u. a. eine Wechselwirkung mit dem PDZ-Domäne enthaltenen Protein Erbin nachgewiesen werden (Izawa *et al.*, 2002; Jaulin-Bastard *et al.*, 2002). Erbin gehört zur gleichen Proteinfamilie wie das Polaritätsprotein Scribble, der wichtige Funktionen bei der Zellpolarität zugeordnet werden. In HeLa-Zellen konnte eine beeinträchtigte epitheliale Integrität nach der Störung der p0071-Erbin-Interaktion gezeigt werden (Jaulin-Bastard *et al.*, 2002).

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die beiden nahe miteinander verwandten Proteine p0071 und p120 bezüglich ihrer Funktionen an den Zell-Zell-Kontakten verglichen wurden, wird im Folgenden noch einmal näher auf den aktuellen Kenntnisstand bezüglich dieser beiden Proteine eingegangen.

Knockout-Experimente in verschiedenen Tiermodellen konnten für p120 keine essentielle Rolle in der Nematode *Caenorhabditis elegans* (Pettitt *et al.*, 2003) und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Myser *et al.*, 2003) belegen. Im Frosch *Xenopus laevis* ist p120 hingegen für die embryonale Entwicklung entscheidend und sein Fehlen führt zu Gastrulationsdefekten (Fang *et al.*, 2004). Ein totaler Knockout in der Maus ist embryonal letal (Davis *et al.*, 2006), wohingegen gewebespezifische p120 Knockouts sehr unterschiedliche Auswirkungen haben. So führte der Knockout in der Speicheldrüse zu schweren Defekten bei der Zellpolarität. Dies hatte eine Verstopfung des Gangsystems dieses sekretierenden Organs mit unpolarisierten Zellen zur Folge, woraufhin die Tiere kurz nach der Geburt verstarben (Davis *et al.*, 2006).

Ein Epidermis-spezifischer p120 Knockout in der Maus verringerte die Anzahl der gebildeten Adherens Junctions, jedoch ohne Beeinträchtigung der epithelialen Barrierefunktion. Das Vorhandensein unbeeinflusster Tight Junctions und Desmosomen scheint für diese Aufgabe auszureichend zu sein. Stattdessen konnte aber eine Aktivierung des NFκB-Entzündungssignalweges nachgewiesen werden (Perez-Moreno *et al.*, 2006). Diese erfolgt mutmaßlich durch veränderte Aktivierungslevel der Rho-GTPasen RhoA (*ras homolog family member A*), Cdc42 und Rac1 (*ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) (Perez-Moreno *et al.*, 2006; Perona *et al.*, 1997).

p120 kann die Aktivität von RhoA inhibieren - beispielsweise durch eine direkte Interaktion mit dem Rho-GAP (*GTPase-activating protein*) p190A an N-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten in NIH3T3 Zellen (Wildenberg *et al.*, 2006). Im

Gegensatz dazu wird durch die Interaktion mit dem GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) Vav2 die Aktivität von Cdc42 und Rac1 stimuliert (Noren *et al.*, 2000).

Für p0071 ist bisher die Generierung einer Knockout-Maus nicht publiziert, doch durch Zellkulturexperimente konnte gezeigt werden, dass es einen Einfluss auf die Aktivität von RhoA besitzt (Wolf *et al.*, 2006). Diese Regulation von RhoA durch p0071 ist für die Zellteilung entscheidend. Störungen führen zu Zytokinesedefekten in MCF-7 und HEK-293 Zellen. Neuere Forschungsergebnisse konnten zudem eine Interaktion zwischen p0071 und Follikulin belegen, die das RhoA Aktivierungslevel und darüber die Zellmigration sowie die Zellteilung beeinflusste (Medvetz *et al.*, 2012; Nahorski *et al.*, 2012). Für diese Prozesse sind Modulationen des Aktinzytoskeletts entscheidend, die u. a. durch RhoA und seine Effektoren reguliert werden.

Außer bei der Zellteilung besitzt p0071 womöglich auch eine wichtige Rolle an den Zell-Zell-Kontakten, da es dort in Epithelzellen lokalisiert. Eine Analyse in der epithelialen Zelllinie A431 ergab, dass exogenes p0071 desmosomale Proteine von der Plasmamembran verdrängt, wohingegen dort dann vermehrt die Adherens Junctions Komponenten E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin zu finden waren (Setzer *et al.*, 2004). Zudem ist bekannt, dass p0071 für die basolaterale und ebenfalls von E-Cadherin-abhängige Lokalisation von FRMPD2 (*FERM and PDZ domain containing 2*) in Epithelzellen notwendig ist. FRMPD2 selbst wiederum besitzt einen Einfluss auf die Tight Junctions Bildung und damit auf die Zellpolarität (Stenzel *et al.*, 2009).

Darüber hinaus konnte die GTPase Rab11 als Interaktionspartner von p0071 charakterisiert werden. Rab11 spielt beim Recycling von Membranproteinen an die Plasmamembran eine wichtige Rolle (Ullrich *et al.*, 1996). Knockdown-Experimente zeigten, dass einerseits p0071 die Lokalisation und damit die Funktion von Rab11 beeinflusst, andererseits, dass Rab11 das Recycling der Adherens Junctions Komponenten p0071 und E-Cadherin reguliert. Dies lässt die Vermutung zu, dass p0071 über die Interaktion mit Rab11 einen Einfluss auf die dynamische Regulation der Adherens Junctions besitzt (Keil *et al.*, 2014).

## 1.6 Die Bedeutung der Zellkontakte für die Zellpolarität

Damit Zellen eine apikal-basolaterale Zellpolarität ausbilden können, müssen sie zunächst festlegen an welcher Stelle der Zellmembran die apikale bzw. basolaterale Membrandomäne entstehen soll. Dazu benötigen sie Informationen zu ihrer Umgebung, die sie über Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte erhalten.

In den epithelialen MDCK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Orientierung der apikalen Membrandomäne von der Rho-GTPase Rac1, der extrazellulären Komponente Laminin und vom Zell-Matrix-Rezeptor Integrin abhängt. Wird in diesen Zellen eine dominant-negative Proteinvariante von Rac1 exprimiert, die keine Affinität mehr für GTP hat und daher dauerhaft im inaktiven Zustand vorliegt, kommt es zu Störungen in der strukturellen Zusammensetzung des extrazellulären Laminin. Diese Störungen werden wahrscheinlich durch Effekte von Rac1 auf die Integrine, die als Laminin-Rezeptoren dienen, verursacht. Die Folge davon ist, dass das Laminin kein transzelluläres Polarisierungssignal an die Zelle übermitteln kann und so die Zelle an der falschen Stelle die apikale Membrandomäne definiert (O'Brien *et al.*, 2001).

Die um E-Cadherin gebildeten initialen Zell-Zell-Kontakte bilden u. a. einen Orientierungspunkt für die Lokalisation des Par-Polaritätskomplexes, der an dieser Stelle die Reifung der Zell-Zell-Kontakte bewirkt (Yamanaka *et al.*, 2001). Wie im Abschnitt 1.3 (S. 11) beschrieben, beeinflussen Störungen beim Par-Polaritätskomplex auch die anderen Polaritätskomplexe Scribble und Crumbs, so dass E-Cadherin darüber mehr oder weniger direkt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung der Zellpolarität spielt. Darüber hinaus ist bekannt, dass für die Lokalisation von Scribble an der Plasmamembran E-Cadherin notwendig ist, ohne das der molekulare Mechanismus dahinter genauer aufgeklärt wurde (Navarro *et al.*, 2005). An der Plasmamembran wirkt Scribble wiederum stabilisierend auf die E-Cadherin-Catenin Bindung, da ein Knockdown von Scribble in den MDCK-Zellen zu einer verringerten E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Adhäsion führt (Lohia *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2005).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein E-Cadherin Knockout in der Haut zur Fehllokalisierung der atypische Proteinkinase C und von Rac1 führt. Beide Proteine sind für die Bildung von Tight Junctions essentiell, so dass diese in dem Knockout-Modell gestört waren und die Tiere kurz nach der Geburt aufgrund der fehlenden Barrierefunktion der Haut verstarben (Tunggal *et al.*, 2005).

Des Weiteren dienen die E-Cadherin basierten Zell-Zell-Kontakte auch als Orientierungspunkt für den Vesikeltransport basolateral lokalisierender Proteine. Dazu rekrutiert E-Cadherin die Exozyst-Komponente Sec6/8 zur Plasmamembran (Yeaman *et al.*, 2004). Der Exozyst-Proteinkomplex vermittelt dann dort die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran.

## 1.7 Der Zusammenhang zwischen Zellpolarität und Krebs

Die meisten Tumore beim Menschen haben einen epithelialen Ursprung. Typische Kennzeichen von Tumorzellen sind, neben einer unbegrenzten Zellteilung, auch der Verlust der Zellpolarität, wobei jedoch bisher noch nicht abschließend geklärt werden konnte, ob der Verlust der Zellpolarität eine Ursache oder eine Konsequenz der Tumorentstehung darstellt (Royer *et al.*, 2011).

Die meisten der bisher vorgestellten Proteine, die die apikal-basolaterale Zellpolarität regulieren, sind wichtige Tumorsuppressoren bzw. Proto-Onkogene. Ihr Verlust kann (1) zu Störungen bei der Proliferation durch fehlende regulatorische Einflüsse bezüglich des WNT/ $\beta$ -Catenin oder mTOR (*mammalian target of rapamycin*) Signalweges, (2) zu Veränderungen der Zellmorphologie durch den fehlenden Einfluss auf das Zytoskelett bzw. den gerichteten Vesikeltransport, (3) zu Störungen bei der Zellteilung aufgrund der fehlender Regulation zur korrekten Orientierung der mitotischen Spindeln führen. Dies alles trägt zur Entstehung einer genomischen Instabilität und damit zur Tumorbildung bei (Martin-Belmonte *et al.*, 2012).

Auf das Zytoskelett und die Orientierung der mitotischen Spindel hat u. a. die Rho-GTPase Cdc42 einen maßgeblichen Einfluss (Jaffe *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2010). Als Effektoren von Cdc42 bei der Orientierung der mitotischen Spindel konnten Par6 und aPKC charakterisiert werden (Durgan *et al.*, 2011).

Generell gilt, dass die lokal regulierte Aktivität der Rho-GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA die Ausbildung der Zellpolarität, die Zellmigration und die Adherens Junctions entscheidend beeinflusst (Etienne-Manneville *et al.*, 2002).

## 1.8 Der gerichtete Vesikeltransport

Der gerichtete Vesikeltransport zur Plasmamembran wird auf drei Ebenen reguliert. Zum einen sorgen intrinsische Proteinsortierungssignale und die entsprechenden zellulären Sortierungsmechanismen für einen gerichteten Proteintransport an zuvor definierte Membrandomänen. Für die Ausbildung von definierten Membrandomänen sorgen Polaritätskomplexe, deren Anordnung an der Plasmamembran über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte reguliert wird. Damit beeinflussen die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sowie die Polaritätskomplexe letztendlich den gerichteten Vesikeltransport zur Plasmamembran (Mellman *et al.*, 2008).

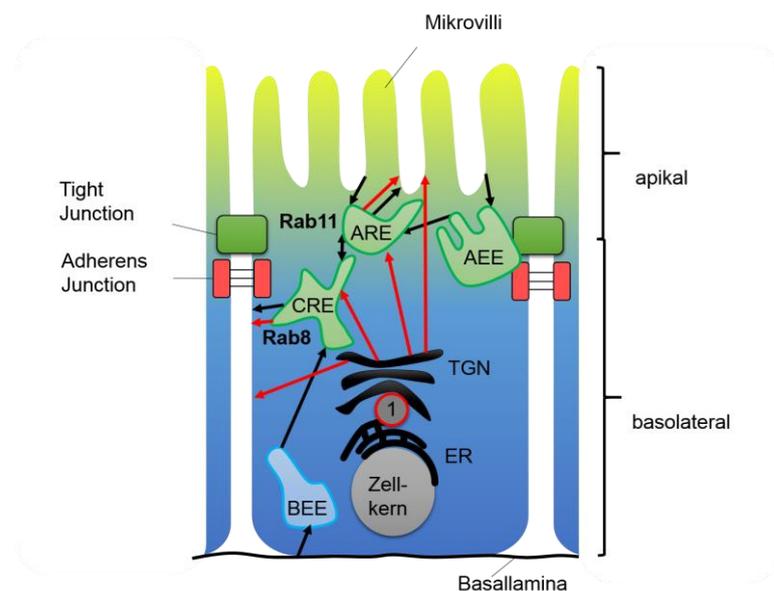


Abb. 1-5: Vesikeltransportprozesse in polarisierten Epithelien

Nach der Proteinsynthese von Transmembranproteinen und zu sekretierenden Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER) gelangen diese über einen COPII-Komplex vermittelten Vesikeltransport zum Golgi-Apparat. Im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) werden intrinsische Sortierungssignale der Proteine erkannt, die zu einem gerichteten vesikulären Weitertransport der Proteine entweder direkt zur apikalen oder basolateralen Membrandomäne führen oder indirekt durch die Einbindung von Recyclingendosomen. Es wird zwischen Rab11-positiven apikalen Recyclingendosomen (ARE) und Rab8-positiven *common recycling endosomes* (CRE) unterschieden. Während der Etablierung der apikal-basolateralen Zellpolarität kommt es u. a. auch zur Transzytose von Transmembranproteinen. Diese lokalisieren zunächst vorübergehend in apikalen oder basalen *early endosomes* (AEE bzw. BEE), bevor sie durch die Recyclingendosomen an ihre Zielmembrandomänen gelangen. Rote Pfeile geben den biosynthetischen Weg von Transmembranproteinen und zu sekretierenden Proteinen an. Schwarze Pfeile stellen Recyclingwege für endozytierte Proteine dar. Die rot eingekreiste Zahl 1 steht an der Stelle, wo der COPII-vermittelte Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat stattfindet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Apodaca *et al.*, 2012.

Der biosynthetische Weg von Transmembranproteinen, die u. a. wichtige Funktionen an den Zell-Zell-Kontakten und innerhalb der Polaritätskomplexe ausüben, beginnt mit der Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) (siehe Abb. 1-5, S. 19). Von dort gelangen sie über einen COPII-vermittelten Vesikeltransport zum Golgi-Apparat. Im trans-Golgi-Netzwerk werden dann intrinsische Sortierungssignale der Proteine erkannt, die zu einem gerichteten vesikulären Weitertransport zu ihrer Ziellmembrandomänen führen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Transport zur apikalen bzw. basolateralen Membrandomänen in Epithelzellen dabei nicht zwangsläufig direkt erfolgt, sondern zum Teil auch indirekt über Recyclingendosomen. Dabei unterscheidet man apikale Rab11-positive Recyclingendosomen (ARE) und *common recycling endosomes* (CRE). Letztere stellen Rab8-positive Vesikel dar. Die Rab GTPasen repräsentieren eine große Proteinfamilie, die die Cargoselektion, die Reifung, die Bewegung und das Andocken sowie die Fusion von Vesikeln mit der Ziellmembran reguliert (Apodaca *et al.*, 2012).

Als intrinsische Sortierungssignale konnte v. a. im zytoplasmatischen Teil von Proteinen, die basolateral lokalisieren, Tyrosin- und Dileucin-Motive identifiziert werden. In Proteinen, die apikal lokalisieren, dienen oft extrazelluläre gebundene Oligosaccharidketten oder in der Transmembranregion befindliche Glykosylinositol-lipidanker (GPI) als intrinsische Sortierungssignale.

Das Transmembranprotein E-Cadherin weist ein Dileucin-Motiv auf (Miranda *et al.*, 2001) und wird mittels Rab11-positiver Recyclingendosomen zur basolateralen Membrandomäne transportiert (Desclozeaux *et al.*, 2008; Lock *et al.*, 2005).

Während der Etablierung der Zellpolarität kommt es auch zur Transzytose verschiedener Transmembranproteine. Dabei gelangen diese Proteine nach der Endozytose zunächst in apikale oder basale *early endosomes* (AEE bzw. BEE), bevor sie über die Recyclingendosomen ihre neue definierte Membrandomäne erreichen. Die Transzytose wurde in den MDCK-Zellen zum Beispiel am Protein Podocalyxin untersucht und festgestellt, dass dieser Vorgang notwendig ist um neue apikale Membrandomänen zu definieren (Bryant *et al.*, 2010).

Der *coatamer protein complex II* (COPII) spielt eine essentielle Rolle bei den Transportvorgängen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat (Barlowe *et al.*, 1994). Der COPII-Komplex besteht aus fünf verschiedenen Proteinen: den Sec-

Proteine 23, 24, 13 und 31 sowie der kleinen GTPase Sar1. Die Sec-Proteine 23 und 24 bilden Heterodimere und lagern sich als innere Hülle um die vom ER zu transportierenden Proteine herum. Die Sec-Proteine 13 und 31 bilden hingegen Heterotetramere und lagern sich als äußere Hülle um die am ER entstehenden Vesikel für den Weitertransport zum Golgi-Apparat an (Jensen *et al.*, 2011) (siehe Abb. 1-6, S. 21). Die kleine GTPase Sar1 katalysiert schließlich an der ER-Membran in ihrem aktiven GTP-gebundenen Zustand die Abschnürung der COPII-bedeckten Vesikel (Kuge *et al.*, 1994). Die Aktivität der kleinen GTPase Sar1 wird durch das GEF Sec12 direkt an der ER-Membran reguliert (Weissman *et al.*, 2001). Die COPII-besetzten Vesikel gelangen dann über das Tubulin-Zytoskelett zum Golgi-Apparat und fusionieren dort mit den Golgi-Zisternen (Mizuno *et al.*, 1994).

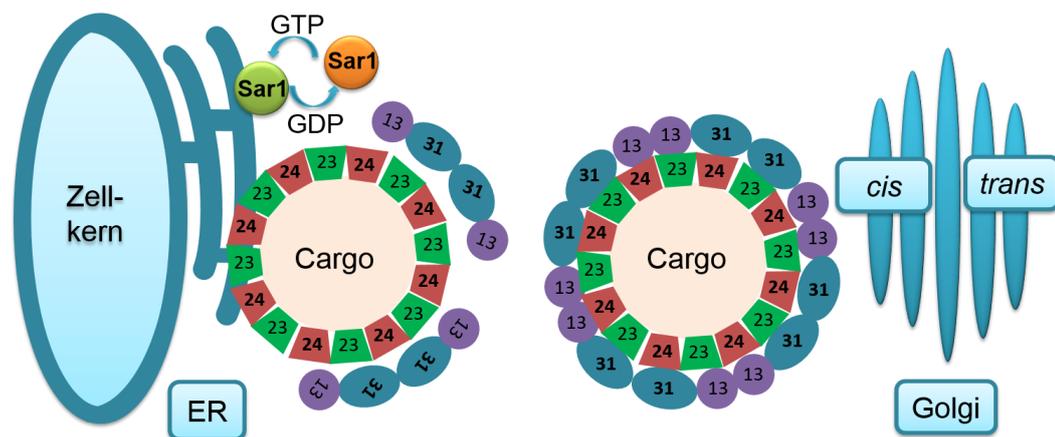


Abb. 1-6: Der COPII-vermittelte Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat  
Im endoplasmatischen Retikulum (ER) neu synthetisierte Proteine verlassen es über COPII-besetzte Vesikel in Richtung Golgi-Apparat. Heterodimere, bestehend aus Sec23 und Sec24 Proteinen, lagern sich um das zu transportierende Cargo an der ER-Membran an. Anschließend wird eine äußere Hülle aus Sec13 und Sec31 Heterotetrameren gebildet. Zur Abschnürung der gebildeten Vesikel von der ER-Membran ist die kleine GTPase Sar1 notwendig.

Nach weiteren Modifizierungen der Proteine und dem Sortieren in neue Vesikel innerhalb des Golgi-Apparates gelangen die Membranproteine schließlich zur Plasmamembran. Dort hilft u. a. der Exozyst-Komplex bei der Lokalisation von basolateral anzuordnenden Membranproteinen (Mellman *et al.*, 2008).

## 1.9 Verschiedene Modelle zur Untersuchung der Zellpolarität

Für Untersuchungen zur Ausbildung der Zellpolarität werden v. a. MDCK- und Caco-2 Zellen benutzt. Bei MDCK-Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen vom Hund; bei den Caco-2 Zellen um humane Colonkarzinomazellen. Beide Zelllinien differenzieren in apikal-basolateral polarisierte Epithelzellen während der 2D Zellkultivierung nach Erreichen der Konfluenz. Zudem bilden sie auch während der 3D Zellkultivierung apikal-basolateral polarisierte Zellstrukturen aus, sogenannte Zysten (siehe Abb. 1-7, S. 22).

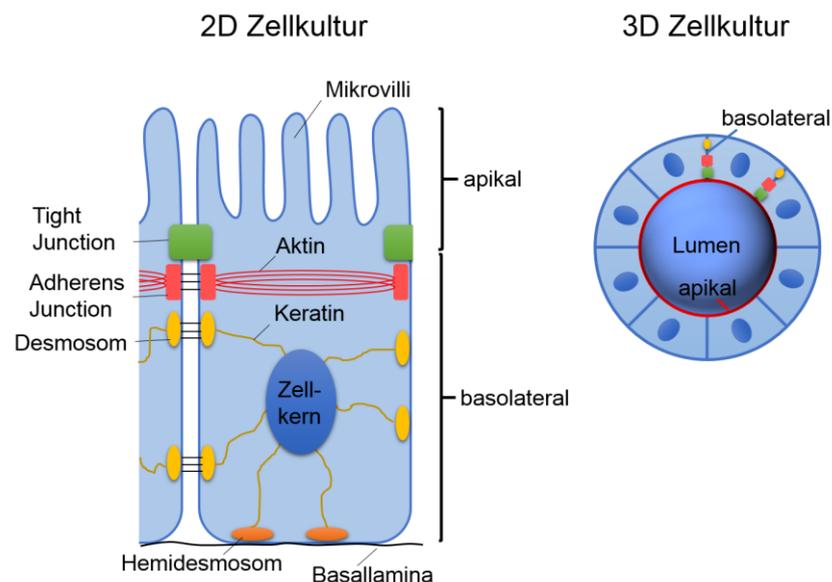


Abb. 1-7: Die Zellpolarisierung von Epithelzellen in der 2D sowie 3D Zellkultur  
In der 2D Zellkultur differenzieren einige Epithelzellen in apikal-basolateral polarisierte Zellen. In der 3D Zellkultur bilden zudem einige Epithelzellen kugelförmige Zysten. Die zystenbildenden Zellen weisen ebenfalls eine apikal-basolaterale Zellpolarität auf.

Zysten – auch als Acini in der Brustdrüse, Alveoli in der Lunge bzw. als Follikel in der Schilddrüse bezeichnet – bestehen aus kugelförmigen Zellmonolayern, die ein zentrales Lumen umschließen. Jede Zyste kann durch Proliferation aus einer einzelnen Zelle entstehen. Der Antrieb der Epithelzellen solche Strukturen zu bilden, besteht darin der Zellpolarisierung folgend eine apikale und eine basolaterale Membrandomäne auszubilden (O'Brien *et al.*, 2002). In der Literatur wird oftmals angeführt, dass die 3D Zellkultivierung viele Aspekte der *in vivo* Epithelbildung besser widerspiegelt als die 2D Zellkultur (Debnath *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2002). Aufgrund der unterschiedlich starken Polarisierungssignale in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode, konnten

einige Effekte auf die Zellpolarität nur bei der 3D Zellkultivierung beobachtet werden und nicht mit der 2D Zellkultur (Martin-Belmonte *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2001).

Für die 3D Zellkultivierung werden einzelne Zellen in einer extrazellulären Matrix eingebettet. Die Matrix kann entweder aus Zellen des murinen Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors oder aus einer Collagenmischung bestehen. Darüber hinaus kommen zum Teil auch synthetische Produkte zum Einsatz.

Für die Lumenbildung in den Zysten sind verschiedenen Mechanismen beschrieben. In Abhängigkeit von der verwendeten 3D Matrix bilden z. B. MDCK-Zellen ihr Lumen auf die eine oder andere Weise: Bei in einer Collagenmischung kultivierten MDCK-Zellen erfolgt die Ausbildung der Zellpolarität langsam und die Lumenbildung wird durch die Apoptose der zentralen Zellen, die keine Zell-Zell-Kontakte aufweisen, erreicht. Werden die MDCK-Zellen hingegen in einer 3D Matrix, die aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm Tumor gewonnen wurde, kultiviert, erfolgt die Ausbildung der Zellpolarität schnell und das zentrale Lumen in den Zysten bildete sich durch die Exozytose von apikalem Membranmaterial mittels Vesikeln (Martin-Belmonte *et al.*, 2008). In den Zysten, bestehend aus Caco-2 Zellen, entsteht das Lumen an der apikalen Membrandomäne durch einen Ionentransport-getriebenen Flüssigkeitsstrom aus den Zellen in das so expandierende Lumen (Jaffe *et al.*, 2008).

## 1.10 Die Zielstellung der Arbeit

Die Ausbildung der Zellpolarität ist ein fundamentaler biologischer Prozess, den fast alle Zellen durchlaufen. Dabei besitzen unter anderem die Zell-Zell-Kontakte, das Zytoskelett und der gerichtete Proteintransport eine entscheidende Bedeutung. Für die genannten Aspekte konnte für das Armadilloprotein p0071 bereits ein Einfluss gezeigt werden. Es wurde aber bisher noch nie untersucht wie groß der Einfluss von p0071 auf die Ausbildung der Zellpolarität ist. Aus diesem Grund wurde die vorliegende Arbeit angefertigt und dieser Sachverhalt in verschiedenen Modellsystemen untersucht.

In Hinblick auf die Rolle der Zell-Zell-Kontakte bei der Ausbildung der Zellpolarität sollten vergleichende Studien zwischen p0071 und dem verwandten p120 Catenin angefertigt werden, um Rückschlüsse über redundante Funktionen innerhalb dieser Proteinunterfamilie ziehen zu können.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob p0071 für die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität in Epithelzellen von Bedeutung ist. Störungen der Zellpolarität können zur Tumorentstehung beitragen und werden unter anderem durch eine falsche Orientierung der mitotischen Spindel verursacht. Der Einfluss von p0071 auf diesen und andere Faktoren bei der Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität wurde daher nähergehend untersucht.

Zusätzlich sollte auf der Suche nach neuen putativen Interaktionspartnern für p0071 noch ein *Yeast Two Hybrid* (Y2H) *Screening* durchgeführt werden sowie ein funktioneller Zusammenhang zwischen p0071 und einigen der im Y2H Screening gefundenen Interaktionspartner hergestellt werden. Ziel war es hier mögliche neue Funktionen von p0071 aufzudecken, die es von den anderen Mitgliedern seiner Proteinunterfamilie abgrenzt bzw. seine zeitgleiche Lokalisation im Zytoplasma sowie an der Plasmamembran in vielen Zellen erklärt.

## 2 Ergebnisse

Um den Einfluss von p0071 auf die Zellpolarität zu klären, wurden verschiedene Aspekte der Zellpolarität in unterschiedlichen Zellmodellen untersucht.

Zum einen wurde durch Calcium-Switch Experimente in Mauskeratinozyten untersucht, welchen Einfluss eine verringerte p0071 Proteinmenge auf den Prozess der Zell-Zell-Kontaktbildung und damit auf die Zellpolarität besitzt. Zum anderen wurde der Einfluss von p0071 auf die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität in den Colonkarzinomazellen Caco-2 untersucht. Diese Zelllinie bildet nicht nur in der 2D Zellkultur apikal-basolateral polarisierte Enterozyten aus, sondern auch bei der 3D Zellkultivierung. Auf diese Weise wurde analysiert, ob der Einfluss von p0071 auf die Ausbildung der Zellpolarität womöglich in Abhängigkeit von der Kultivierungsmethode unterschiedlich ausfällt. Durch Knockdown-Experimente wurde zudem versucht einen funktionellen Zusammenhang zwischen p0071 und den COPII-vermittelten Vesikeltransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat in HeLa- und MCF-7 Zellen herzustellen. Da der gerichtete Vesikeltransport für die Ausbildung der Zellpolarität von großer Bedeutung ist, wurde untersucht, ob p0071 darüber einen Einfluss auf die Zellpolarität besitzt.

### 2.1 Die Lokalisation von p0071 in der murinen Haut

Die Haut besteht aus einem mehrschichtigen Epithel um den Körper vor schädlichen Umwelteinflüssen und vor der Austrocknung zu schützen. Um diese Barrierefunktion erfüllen zu können, bilden die Epithelzellen der Haut, die auch als Keratinozyten bezeichnet werden, einen sehr kompakten Zellverband. Dieser kompakte Zellverband zeichnet sich u. a. durch die Formation verschiedener Arten von Zell-Zell-Kontakten, wie z. B. den Adherens Junctions aus (siehe Abschnitt 1.4, S. 13).

In der humanen und murinen Haut werden ausschließlich die beiden klassischen Cadherine E-Cadherin und P-Cadherin exprimiert (Furukawa *et al.*, 1997; Nose *et al.*, 1986). An den zytoplasmatischen Teil der Cadherine binden verschiedene Catenine wie  $\beta$ -Catenin, p0071 und p120. Die detaillierte Zusammensetzung der Adherens Junctions Komplexe in der humanen und murinen Haut wurde bisher nicht untersucht. Aufgrund der Expression der beiden unterschiedlichen klassischen Cadherine sowie einer Vielzahl

von möglichen Interaktionspartnern für den zytoplasmatischen Teil der Cadherine, wird jedoch eine Heterogenität der Adherens Junctions Komplexe in der Haut angenommen, die womöglich unterschiedliche Funktionen wahrnehmen.

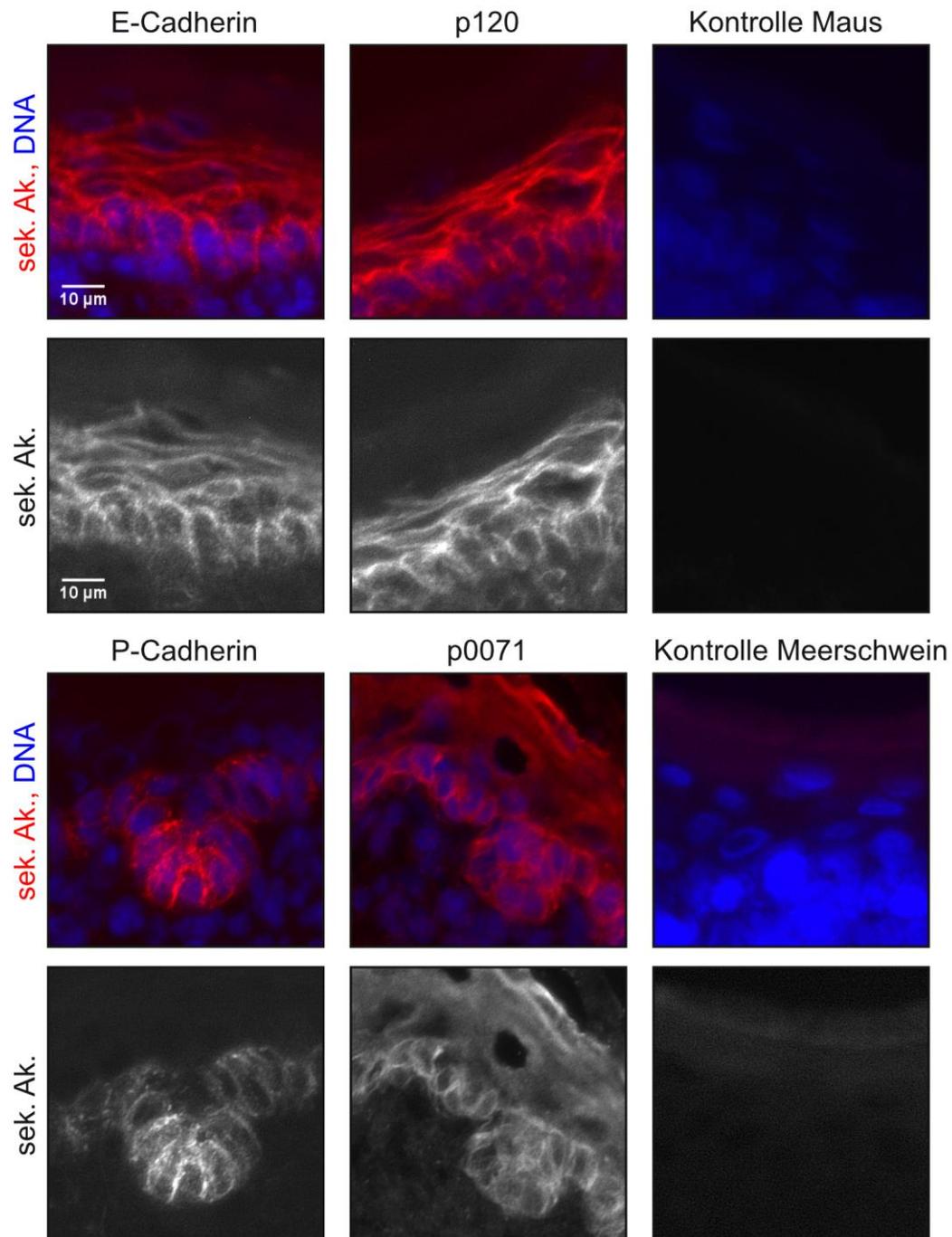


Abb. 2-1: Die Lokalisation der Adherens Junctions Proteine in der murinen Haut  
Die endogene Lokalisation von E- und P-Cadherin sowie von p120 und p0071 wurde in Gewebeschnitte der murinen Haut mittels immunhistochemischen Färbungen untersucht. In den farbigen Bildern ist die Mehrschichtigkeit der Haut durch die blaue DNA-Färbung der Zellkerne zu erkennen. Die Lokalisation des über dem jeweiligen Bild angegebenen Proteins ist Rot in den farbigen Bildern dargestellt und darunter noch einmal als Einzelbild in Weiß. Als Kontrollen sind die Signale der verwendeten sekundären Antikörper (sek. Ak.) ohne vorheriger Inkubation mit einem primären Antikörper gezeigt. Der eingezeichnete Maßstab von 10 µm in den Bildern zu E-Cadherin gilt für alle hier gezeigten Bilder.

Bekannt ist, dass die Expression von P-Cadherin auf die basale Zellschicht der Epidermis beschränkt ist, wohingegen E-Cadherin auch in den suprabasalen Zellschichten vorkommt (Furukawa *et al.*, 1997; Nose *et al.*, 1986). Dieses Lokalisationsmuster für die beiden klassischen Cadherine konnte in den angefertigten Gewebeschnitten der murinen Haut mit verschiedenen Antikörpern bestätigt werden (siehe Abb. 2-1, S. 26). Dazu wurden Gewebegefrierschnitte der murinen Haut in Aceton fixiert und permeabilisiert, so dass anschließend primäre Antikörper an ihre Epitope im Gewebe binden konnten. Die Lokalisation der primären Antikörper wurde dann durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes dokumentiert.

Erstmals wurde so auch die Lokalisation von p0071 in der murinen Haut untersucht. Dabei konnte mit zwei unterschiedlichen primären Antikörpern eine Lokalisation von p0071 ausschließlich an den Zellmembranen der basalen Zellschicht, wie für P-Cadherin auch, beobachtet werden (siehe Abb. 2-1, S. 26). In den Suprabasalzellen zeigte p0071 eine diffuse Lokalisation. Ob dieses zytoplasmatische Signal eine veränderte Lokalisation von p0071 in diesen Zellen im Vergleich zu den Basalzellen repräsentiert oder durch eine unspezifische bzw. eine Kreuzreaktion des Antiserums hervorgerufen wird, bleibt im Moment unklar. Die Epitope der verwendeten polyclonalen Antikörper befinden sich im N-Terminus bzw. innerhalb der Armadillo-Motive von p0071.

Das p120 Catenin lokalisiert hingegen ähnlich wie E-Cadherin in der basalen sowie in den suprabasalen Zellschichten der Epidermis (siehe Abb. 2-1, S. 26). Keines der untersuchten Proteine war in der zellkernlosen, superfiziellen Hornschicht nachweisbar.

Der Funktionsbereich von p0071 und P-Cadherin scheint somit im Gegensatz zu dem von p120 und E-Cadherin auf die basale Zellschicht der Epidermis beschränkt zu sein. Dies deutet auf verschieden aufgebaute Adherens Junctions Komplexe in der Haut hin, die möglicherweise z. B. den Differenzierungsgrad der Zellen mitbestimmen. So entstehen die Keratinozyten in der Haut durch die asymmetrische Zellteilung adulter Stammzellen in der Basalzellschicht. Sie differenzieren zu zellkernlosen Hornzellen während ihrer Wanderung durch die verschiedenen Hautschichten von basal nach superfiziell. Vorstellbar ist, dass die Keratinozyten in der Basalzellschicht Adherens Junctions Komplexe bestehend aus E-Cadherin sowie P-Cadherin und p0071 sowie p120

bilden, während in den suprabasalen Zellschichten Adherens Junctions Komplexe bestehend aus E-Cadherin und p120 vorherrschend sind und diese die Differenzierung der Keratinozyten in zellkernlose Hornzellen stimulieren. Das Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte die Differenzierung von Keratinozyten beeinflussen können, ist bereits gezeigt worden (Charest *et al.*, 2009).

Um die Heterogenität der Adherens Junctions Komplexe zwischen den Keratinozyten zu belegen, wurden verschiedene Experimente einerseits mit Keratinozyten durchgeführt, die aus einer murinen Haut isoliert wurden und hiernach immer als Mauskeratinozyten bezeichnet werden und andererseits mit der etablierten humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (*human adult low calcium high temperature*).

## 2.2 Der Aufbau der Adherens Junctions Komplexe in Keratinozyten

Zuerst wurden Immunpräzipitationen mit den Mauskeratinozyten im Vergleich zu den HaCaT-Zellen durchgeführt, um Hinweise auf die Zusammensetzung der Adherens Junctions Komplexe in den Keratinozyten zu erhalten. Dazu wurden Zellysate der entsprechenden Zelllinien hergestellt und mit an Agarosebeads gebundenen Antikörpern inkubiert. An die immobilisierten Antikörper können einerseits die Proteine, deren Epitop vom Antikörper erkannt wird, binden und andererseits möglicherweise mit diesen Proteinen interagierende Partner. Mittels SDS-PAGE und Western Blot können diese Proteininteraktionen dann nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.19, S. 111). Bezüglich den Zellysaten der Mauskeratinozyten wurde zwischen unstimulierten und mit calciumstimulierten Zellen unterschieden. So sollte untersucht werden, ob die Adherens Junctions Komponenten auch schon im unstimulierten Zustand, in dem die Zellen noch keine Zell-Zell-Kontakte besitzen, bereits einen Komplex bilden. Durch die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  (= unstimulierter Zustand) auf 1,2 mM kann in den Mauskeratinozyten die *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung initiiert werden. Die verwendeten HaCaT-Zellen bilden hingegen auch ohne Calciumstimulation Zell-Zell-Kontakte aus, sobald es zum Kontakt zwischen benachbarten Zellen kommt.

In Abb. 2-2 (S. 30) sind die Ergebnisse der Immunpräzipitationen mit den Mauskeratinozyten und den HaCaT-Zellen dargestellt, bei denen entweder p0071 oder p120 mittels spezifischer Antikörper präzipitiert und damit immobilisiert wurden. Als Kontrolle wurde Maus IgG eingesetzt, da die verwendeten p0071 und p120 Antikörper

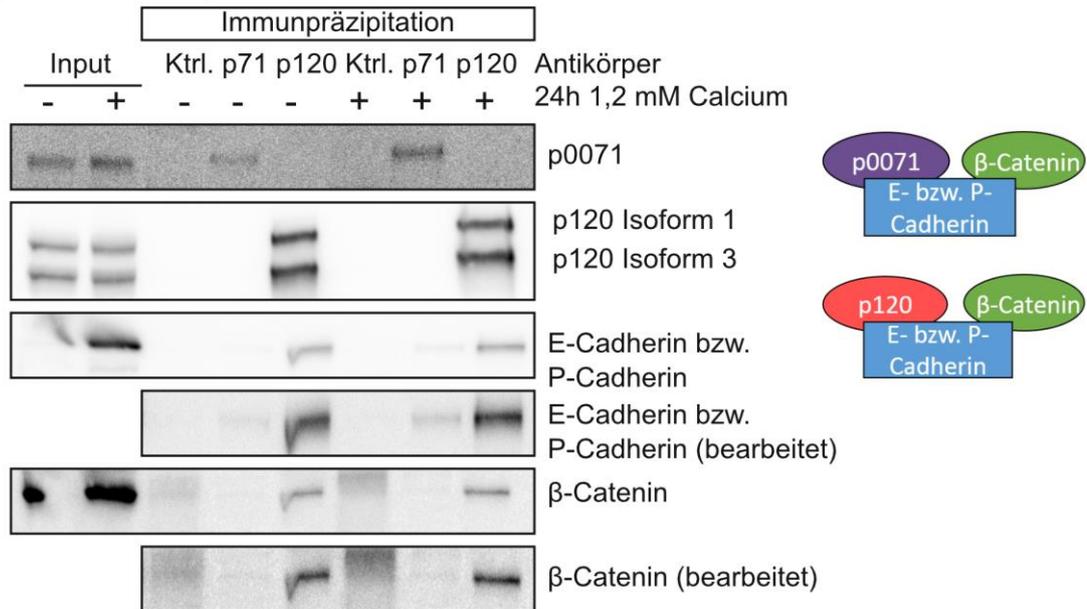
aus der Maus stammten. Unabhängig von der verwendeten Zelllinie konnte am präzipitierten p0071 und p120 jeweils E-Cadherin als Bindungspartner nachgewiesen werden sowie  $\beta$ -Catenin. In den Mauskeratinozyten war dies im unstimulierten Zustand sowie nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1,2 mM Calcium zur Ausbildung von *de novo* Zell-Zell-Kontakten möglich. Im Vergleich zu den p120 Immunpräzipitationen fiel die kopräzipitierte Menge an E-Cadherin und vor allem von  $\beta$ -Catenin bei den p0071 Immunpräzipitationen sehr gering aus. Dies könnte einerseits an der geringeren Menge an endogenem p0071 im Vergleich zu p120 in den verwendeten Zelllinien liegen, andererseits an der Effektivität der Immunpräzipitation, die u. a. von den verwendeten Antikörpern abhängt. Um die schwachen Signale für E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin bei den p0071 Immunpräzipitationen in den Abbildungen besser sichtbar zu machen, wurden Ausschnitte der entwickelten Western Blots mittels des Programms ImageJ und den Optionen Helligkeit sowie Kontrast bearbeitet

Der Nachweis von gebundenem E-Cadherin in den Mauskeratinozyten erfolgte mit einem Antikörper, bei dem der Hersteller nachträglich darauf hingewiesen hat, dass dieser auch mit P-Cadherin kreuzreagieren kann. Ob das im Western Blot nachgewiesene E-Cadherin somit auch einen gewissen Anteil ebenfalls gebundenes P-Cadherin darstellt, ist unklar, da beide Cadherine ein sehr ähnliches Molekulargewicht aufweisen. Der spezifische Nachweis von P-Cadherin im Western Blot gelang nur in den HaCaT-Zelllysaten, trotz des Austestens von drei verschiedenen Antikörpern. Für die Immunfluoreszenzstudien konnten die verschiedenen P-Cadherin Antikörper hingegen für die murinen sowie für die humanen Proben benutzt werden (siehe Abb. 2-5, S. 37).

In den HaCaT-Zellen konnte mittels den Immunpräzipitationen keine Bindung von P-Cadherin an p0071 oder p120 nachgewiesen werden (siehe Abb. 2-2, S. 30).

Zur Überprüfung der gefundenen Ergebnisse wurden weitere Immunpräzipitationen durchgeführt, bei denen diesmal die klassischen Cadherine durch Antikörper an Agarosebeads immobilisiert wurden und nach kopräzipitierten Cateninen mittels SDS-PAGE und Western Blot geschaut wurde (siehe Abb. 2-3, S. 31).

## A) Mauskeratinozyten:



## B) HaCaT-Zellen:

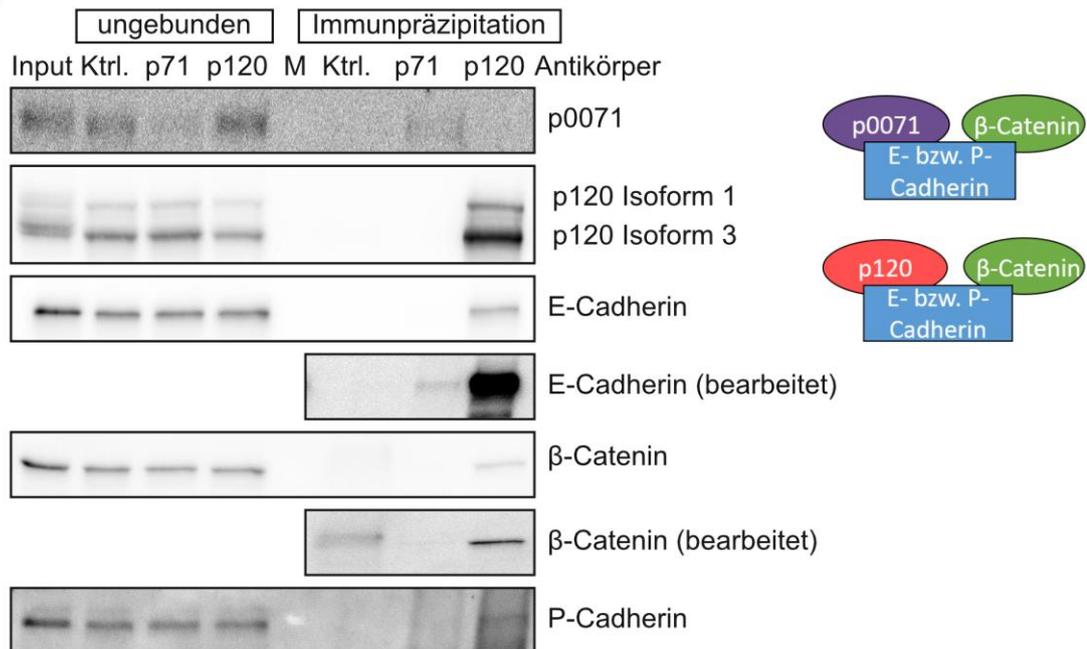
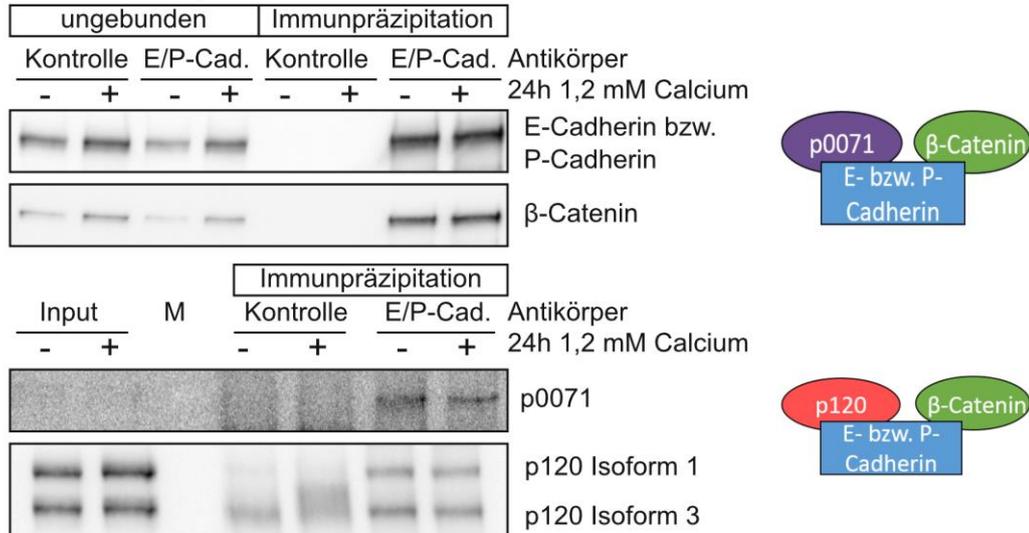


Abb. 2-2: Immunpräzipitationen der Catenine in Keratinozyten

A) zeigt die Ergebnisse aus Immunpräzipitationen (IPs) mit Zelllysaten von Mauskeratinozyten im unstimulierten (-) und im calciumstimulierten (+) Zustand. Im unstimulierten Zustand verfügen die Mauskeratinozyten noch über keine ausgebildeten Zell-Zell-Kontakte. B) zeigt die Ergebnisse der IPs mit HaCaT- Zelllysaten.

Für die IPs wurden Antikörper gegen die Epitope von p0071 (p71), p120 (p120) oder Maus IgG (Ktrl.) eingesetzt. Daran gebundenen Proteinen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert (Immunpräzipitationen). Gleichzeitig wurden so auch die endogenen Mengen der analysierten Proteine (Input) bzw. der ungebundene Anteil nach erfolgter Immunpräzipitation (ungebunden) nachgewiesen. Um sehr schwache Signale deutlicher darstellen zu können, wurden Ausschnitte der entwickelten Western Blot mit dem Programm ImageJ und den Optionen Helligkeit und Kontrast verändert (bearbeitet). Die möglichen aus den jeweiligen IPs abzuleitenden Adherens Junctions Komplexe sind seitlich farblich dargestellt. M steht für den Proteinmarker.

## A) Mauskeratinozyten:



## B) HaCaT-Zellen:

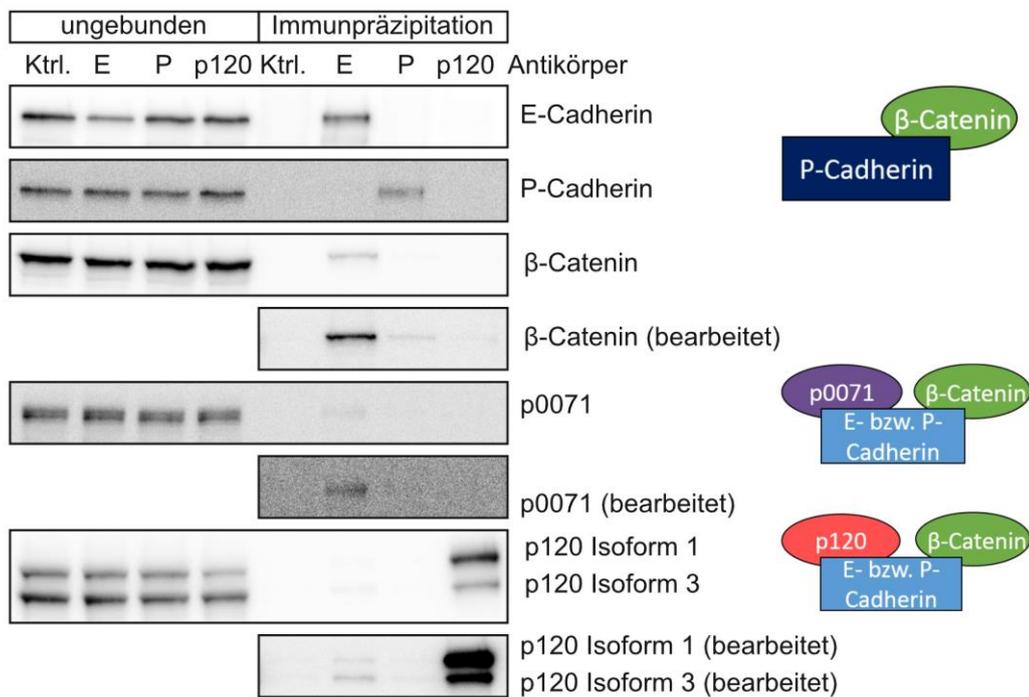


Abb. 2-3: Immunpräzipitationen der Cadherine in Keratinozyten

A) zeigt die Ergebnisse aus Immunpräzipitationen (IPs) mit Zelllysaten von Mauskeratinozyten im unstimulierten (-) und im calciumstimulierten (+) Zustand. Im unstimulierten Zustand verfügen die Mauskeratinozyten noch über keine ausgebildeten Zell-Zell-Kontakte. B) zeigt die Ergebnisse der IPs für HaCaT-Zellen.

Für die IPs wurden Antikörper gegen die Epitope von E-Cadherin (E), P-Cadherin (P) und p120 (p120) eingesetzt. Als Kontrolle (Ktrl.) wurde entweder Maus IgG bei den Mauskeratinozyten bzw. Kaninchen IgG bei den HaCaT-Zellen verwendet. An die immobilisierten Proteine gebundene Partner wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert (Immunpräzipitationen). Gleichzeitig wurden auch die endogenen Mengen der analysierten Proteine (Input) bzw. der ungebundene Anteil nach erfolgter IP (ungebunden) so nachgewiesen. Um sehr schwache Signale deutlicher darstellen zu können, wurden Ausschnitte der entwickelten Western Blot mit dem Programm ImageJ und den Optionen Helligkeit und Kontrast verändert (bearbeitet). Die möglichen aus den jeweiligen IPs abzuleitenden Komplexe sind seitlich farblich dargestellt. M steht für den Proteinmarker.

Die Immunpräzipitationen der Cadherine (siehe Abb. 2-3, S. 31) haben die Ergebnisse der vorher durchgeführten Immunpräzipitationen der Catenine (siehe Abb. 2-2, S. 30) weitestgehend bestätigt. Das bedeutet, dass in den Mauskeratinozyten und HaCaT-Zellen eine Bindung von  $\beta$ -Catenin sowie p0071 und p120 an E-Cadherin nachgewiesen werden konnte. Die gezeigte Bindung zwischen den Cadherinen und Cateninen konnte im unstimulierten Zustand sowie nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1,2 mM Calcium in den Mauskeratinozyten nachgewiesen werden.

Es gelang jedoch nicht einen Adherens Junctions Komplex bestehend aus P-Cadherin und  $\beta$ -Catenin sowie einem der beiden Catenine p0071 oder p120 in den HaCaT-Zellen nachzuweisen. Aus diesem Grund ist die Schlussfolgerung, ob p0071 an P-Cadherin binden kann, wie es die Lokalisationsstudien in der murinen Haut nahelegen, nicht möglich. Der Grund für den fehlenden Nachweis einer Bindung an P-Cadherin könnte erneut einerseits an der geringeren Menge an endogenem P-Cadherin im Vergleich z. B. zu E-Cadherin liegen, andererseits an der Effektivität der Immunpräzipitation, die unter anderem von den verwendeten Antikörpern abhängt. So ist im Fall der P-Cadherin Immunpräzipitation auch die Menge an präzipitierten  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur E-Cadherin Immunpräzipitation sehr gering (siehe Abb. 2-3, S. 31).

Die Immunpräzipitationen der Catenine weisen jedoch darauf hin, dass es zu keiner gleichzeitigen Bindung von p0071 und p120 an die Cadherine kommt, so dass daraus geschlossen werden kann, dass p0071 und p120 in unterschiedlichen Adherens Junctions Komplexen vorkommen. Bezüglich VE (vaskulär-endothelial)-Cadherin wurde dies bereits auch durch Studien mit Proteinvarianten, bei denen die Bindungsstelle für p0071 und p120 im VE-Cadherin verändert war, belegt (Calkins *et al.*, 2003). Dieser Sachverhalt trifft höchstwahrscheinlich auch auf die anderen klassischen Cadherine zu, da die Juxtamembrandomäne der Cadherine, an die p120 und p0071 binden, hochkonserviert zwischen den klassischen Cadherinen ist (Nanes *et al.*, 2012).

Zusammenfassend konnte die Bindung von  $\beta$ -Catenin sowie p0071 und p120 an E-Cadherin in zwei unterschiedlichen Keratinozyten-Zelllinien gezeigt werden. Diese Bindung erfolgt möglicherweise unabhängig davon, ob die Zellen bereits Zell-Zell-Kontakte ausgebildet haben, da der Nachweis auch in unstimulierten Mauskeratinozyten ohne vorhandene Zell-Zell-Kontakte möglich war. Bezüglich P-Cadherin konnte lediglich eine Bindung mit  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden.

Als nächstes wurde durch Lokalisationsstudien der einzelnen Proteine untersucht, ob die durch die Immunpräzipitationen aufgezeigten möglichen Adherens Junctions Komplexe in den Mauskeratinozyten im unstimulierten sowie im calciumstimulierten Zustand belegt werden können.

### **2.3 Die *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung in Mauskeratinozyten**

Die verwendeten Mauskeratinozyten sind für Untersuchungen zur Dynamik bei der Zell-Zell-Kontaktbildung besonders geeignet, da sie im Gegensatz zu den anderen Zellsystemen, mit denen Calcium-Switch Experimente durchgeführt werden, noch über keine ausgebildeten Zell-Zell-Kontakte verfügen bis erstmals die extrazelluläre Calciumkonzentration im Kultivierungsmedium der Zellen erhöht wird.

Die Lokalisation der Adherens Junctions Proteine E-Cadherin, P-Cadherin, p0071 und p120 sowie des desmosomalen Proteins Desmoplakin wurde in den Mauskeratinozyten mittels Immunfluoreszenzstudien analysiert. Die Zellen wurden dazu im unstimulierten Zustand oder zu bestimmten Zeitpunkten nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte ein Permeabilisierungsschritt, damit die verwendeten Antikörper ihre Epitope in der Zelle erreichen konnten. Mittels fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper konnte danach mikroskopisch die Lokalisation der Proteine dokumentiert werden. Auf diese Weise wurde bestimmt, ob p0071 und das verwandte p120 zu unterschiedlichen Zeitpunkten an die Zellmembran gelangen, um dort möglicherweise an verschiedenen Phasen der Adherens Junctions Bildung mitzuwirken.

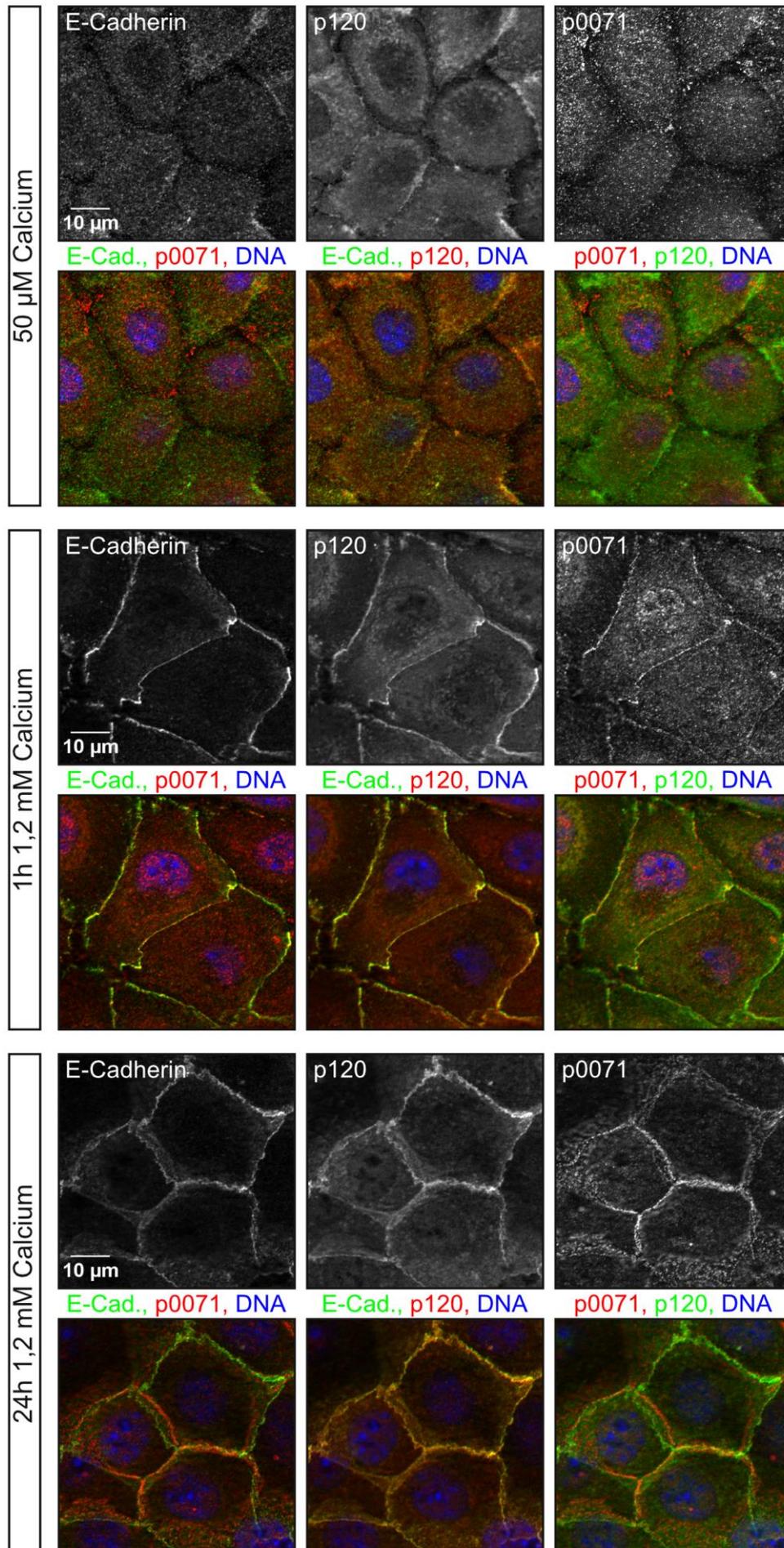


Abb. 2-4: Die Lokalisation von E-Cadherin, p120 und p0071 bei der *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung in den Mauskeratinozyten

Die Lokalisation von endogenem E-Cadherin (E-Cad.), p120 und p0071 wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode in Methanol-fixierten Zellen sichtbar gemacht. Diese wurden zuvor entweder in 50  $\mu$ M Calcium enthaltendem Medium kultiviert oder für die angegebene Zeit mit 1,2 mM Calcium zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung stimuliert. Die Schwarz-Weiß Bilder zeigen die Lokalisation der einzelnen betitelten Proteine, während die Farbbildungen Überlagerungen der angegebenen Zellkomponenten darstellen. Der eingezeichnete Maßstab gilt für alle Bilder in dieser Abbildung.

Wie in Abb. 2-4 (S. 35) zu erkennen ist, lokalisieren E-Cadherin, p120 und p0071 zunächst diffus im Zytoplasma, wenn die Mauskeratinozyten in Medium mit 50  $\mu$ M Calcium kultiviert werden, d. h. im unstimulierten Zustand, der keine Bildung von Zell-Zell-Kontakten ermöglicht. Aufgrund dieses ähnlichen Lokalisationsmusters der untersuchten Proteine ist eine Komplexbildung wie sie in den Immunpräzipitationen im Abschnitt 2.2 (S. 28) gezeigt ist, denkbar.

Bereits eine Stunde nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration zur Induktion der *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung lokalisieren die drei Adherens Junctions Proteine an der Zellmembran. Ihre Lokalisation dort verstärkte sich über den weiteren beobachteten Zeitraum. Bei der Überlagerung der Einzelkanäle fällt auf, dass die Lokalisationsmuster zwischen p120 und E-Cadherin am ähnlichsten sind, was an den gelb gefärbten Zellbereichen zu erkennen ist, an denen die beiden Proteine kolokalisieren. Vereinzelt findet man diese Kolokalisation auch zwischen p0071 und E-Cadherin und zu einem noch geringeren Ausmaß zwischen p0071 und p120 (siehe Abb. 2-4, S. 35). Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass die beiden Catenine in unterschiedlichen Zell-Zell-Kontakten an der Plasmamembran vorkommen.

Zusätzlich wurden auch Kofärbungen zwischen P-Cadherin mit p0071 und dem desmosomalen Marker Desmoplakin angefertigt, um zu analysieren, ob vielleicht P-Cadherin mit p0071 in dem gleichen Ausmaß identische Lokalisationsmuster aufweist, wie es im vorherigen Bild zwischen E-Cadherin und p120 gezeigt ist. Der desmosomale Marker Desmoplakin wurde dabei mit untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, inwiefern sich die Dynamik der Adherens Junctions Bildung von der der Desmosomen unterscheidet.

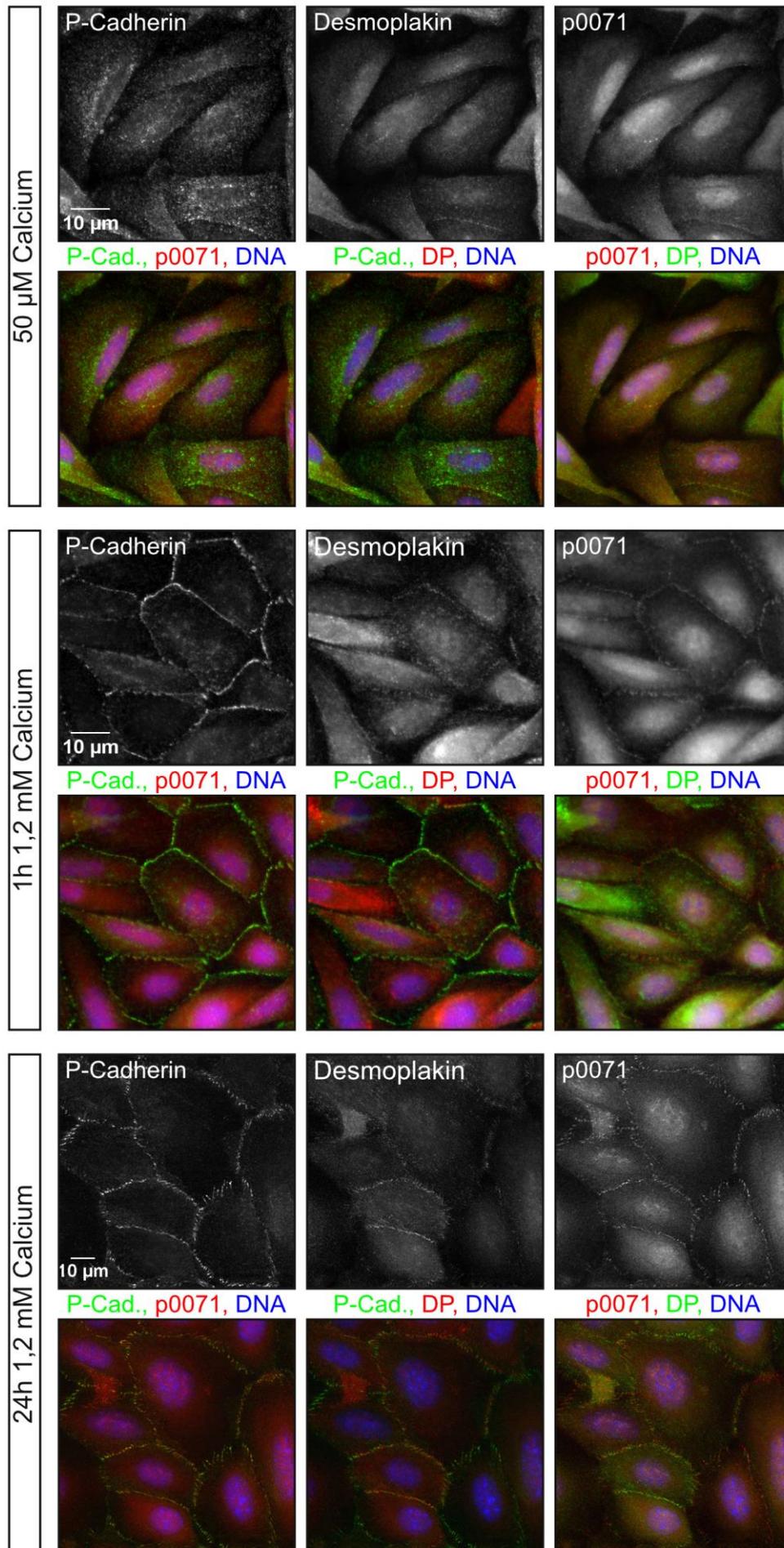


Abb. 2-5: Die Lokalisation von P-Cadherin, Desmoplakin und p0071 bei der *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung in den Mauskeratinozyten

Analog zu Abb. 2-4 wurden hier die endogene Lokalisation von P-Cadherin (P-Cad.), Desmoplakin (DP) und p0071 bei der *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung in den Mauskeratinozyten sichtbar gemacht. Die p0071 Färbung sieht im Vergleich zur vorhergehenden Abbildung anders aus, weil an dieser Stelle ein polyklonaler Antikörper verwendet wurde im Gegensatz zu den Bildern aus Abb. 2-4. Der eingezeichnete Maßstab gilt für alle Bilder in dieser Abbildung.

Wie in Abb. 2-5 (S. 37) zu sehen, lokalisieren P-Cadherin, Desmoplakin und p0071 diffus im Zytoplasma, wenn die Mauskeratinozyten in Medium mit 50  $\mu$ M Calcium kultiviert werden, was nicht ausreicht um die Bildung von Zell-Zell-Kontakten einzuleiten. Erfolgt eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1,2 mM lokalisiert neben p0071 auch P-Cadherin innerhalb von einer Stunde an der Zellmembran. Desmoplakin benötigt hingegen deutlich mehr Zeit um an die Zellmembran zu gelangen. Damit ist gezeigt, dass die Desmosomen erst nach den Adherens Junctions in den Mauskeratinozyten gebildet werden. Dieser Sachverhalt wurde auch bereits in der Literatur beschrieben (O'Keefe *et al.*, 1987). Zwischen P-Cadherin und p0071 konnte nur eine teilweise Kolo-kalisation an der Zellmembran festgestellt werden.

Zusammenfassend wurde durch die Immunfluoreszenzstudien gezeigt, dass alle untersuchten Adherens Junctions Komponente - E-Cadherin sowie P-Cadherin und p0071 sowie p120 - etwa zur gleichen Zeit die Plasmamembran in den Mauskeratinozyten nach Stimulation zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung erreichen, wohingegen der desmosomale Marker Desmoplakin dort deutlich später lokalisierte. Das p0071 und p120 somit an unterschiedlichen Phasen der Adherens Junctions Bildung beteiligt sind, lässt sich mit diesen Untersuchungen nicht belegen. Die zuvor aus den Immunpräzipitationen abgeleiteten möglichen Adherens Junctions Komplexe konnten durch diese Lokalisationsstudien in den Mauskeratinozyten im unstimulierten sowie calcium-stimulierten Zustand zu einem gewissen Maß belegt werden. Anschließende Knock-down-Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob p0071 und p120 für die Bildung von Adherens Junctions notwendig sind und somit einen Einfluss auf einen wichtigen Aspekt der Zellpolarität besitzen.

## 2.4 Der Einfluss von p0071 und p120 auf die Cadherin-Lokalisation

Um den Einfluss von p0071 und p120 auf die Lokalisation von E- und P-Cadherin zu untersuchen, wurde das Proteinlevel der beiden Catenine durch siRNAs in den Mauskeratinozyten reduziert. Danach wurden die Zellen mit einer erhöhten extrazellulären Calciummenge zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung stimuliert und analysiert, ob die Dynamik der Adherens Junctions Ausbildung wie im Abschnitt 2.3 beschrieben, beeinflusst ist. Zusätzlich wurde die Lokalisation von Desmoplakin untersucht, um Rückschlüsse ziehen zu können, ob mögliche Veränderungen bei den Adherens Junctions auch Auswirkungen auf die Desmosomen haben.

Die Knockdown-Effizienz der Catenine wurde in diesen Experimenten durch ihre fehlende Membranlokalisierung nach Calciumstimulation im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, beurteilt.

Eine Stunde nach Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1,2 mM konnten die Adherens Junctions Proteine E- und P-Cadherin sowie p120 und p0071 in den Kontroll-Zellen an der Zellmembran nachgewiesen werden. In den jeweiligen Knockdown-Zellen war dies nicht der Fall (siehe Abb. 2-6, S. 39). Somit ist die Adherens Junctions Bildung in den Mauskeratinozyten, bei denen das p0071 und/ oder p120 Proteinlevel verringert wurde, beeinflusst. Da sich die Desmosomen generell erst später bilden, ist zu diesem frühen Zeitpunkt der Zell-Zell-Kontaktbildung eine Aussage auf einen möglichen Effekt auf die Desmosomen nicht möglich.

Sieht man sich nun die gebildeten Zell-Zell-Kontakte nach 24 Stunden 1,2 mM Calciuminkubation an (siehe Abb. 2-7, S. 40), so lokalisieren E- und P-Cadherin sowie p120 in den Kontroll- als auch in den p0071 Knockdown-Zellen an der Plasmamembran. Damit scheint die Adherens Junctions Bildung in den p0071 Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen verzögert, aber weiterhin möglich. p0071 scheint auch einen leichten Einfluss auf Integrität der Adherens Junctions und Desmosomen zu besitzen, da in den p0071 Knockdown-Zellen die Membranlokalisationen von E- und P-Cadherin sowie p120 und Desmoplakin nicht mehr so kontinuierlich nach 24 h Calciumstimulation ist wie in den Kontroll-Zellen.

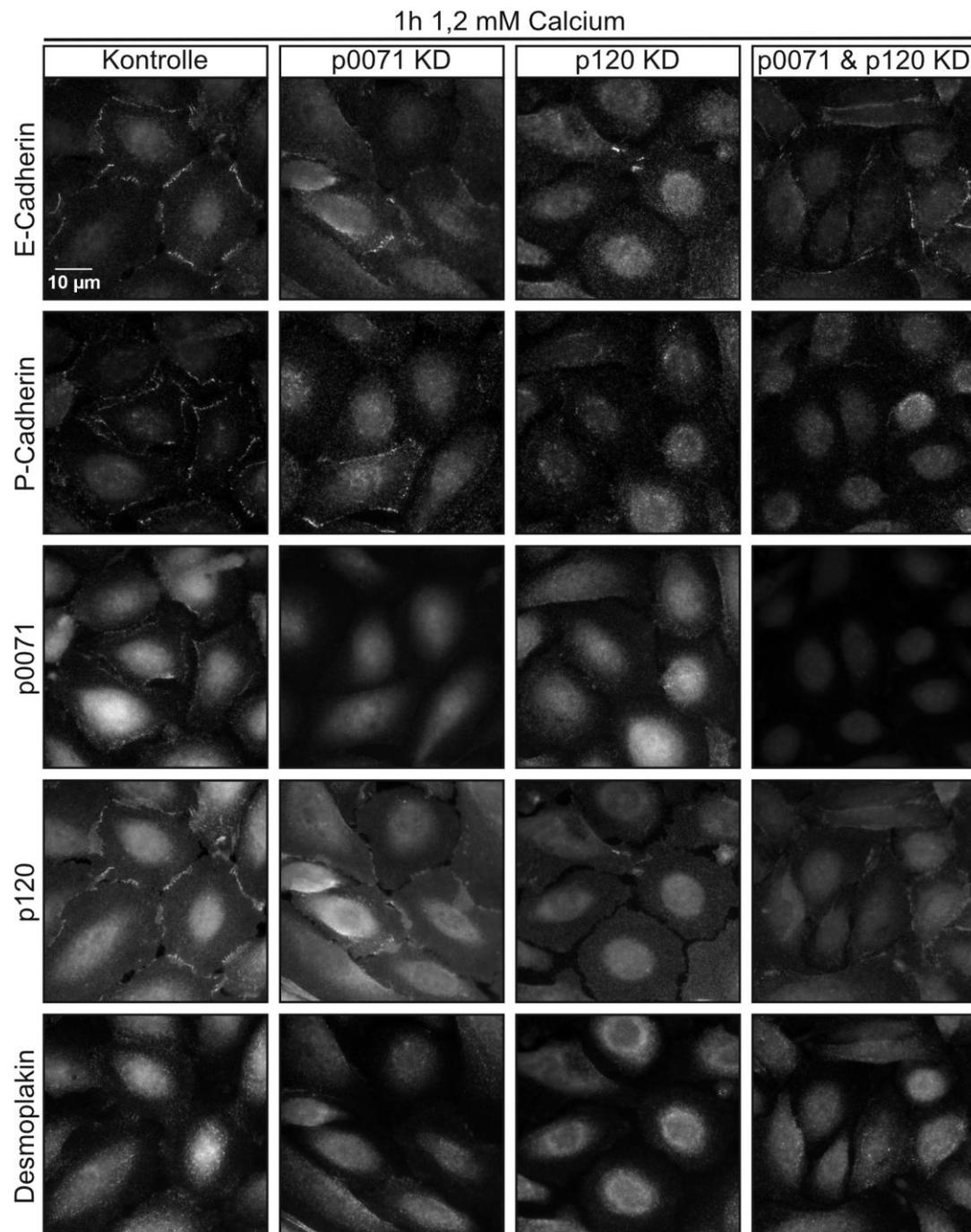


Abb. 2-6: Der Einfluss der Catenine auf die *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung nach einer Stunde Calciumstimulation in den Mauskeratinozyten

Die Lokalisation von endogenem E- und P-Cadherin sowie p0071, p120 und Desmoplakin wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode in Methanol-fixierten Zellen sichtbar gemacht. Die Zellen wurden zuvor für eine Stunde durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1,2 mM zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung angeregt. 72 Stunden vor den Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen zudem mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder mit siRNA gegen p0071 (p0071 KD) bzw. p120 (p120 KD) oder mit einem siRNA Mix, der gegen p0071 und p120 gerichtet war (p0071 & p120 KD), transfiziert. Der eingezeichnete Maßstab von 10 µm im ersten Bild von E-Cadherin gilt für alle hier gezeigten Bilder.

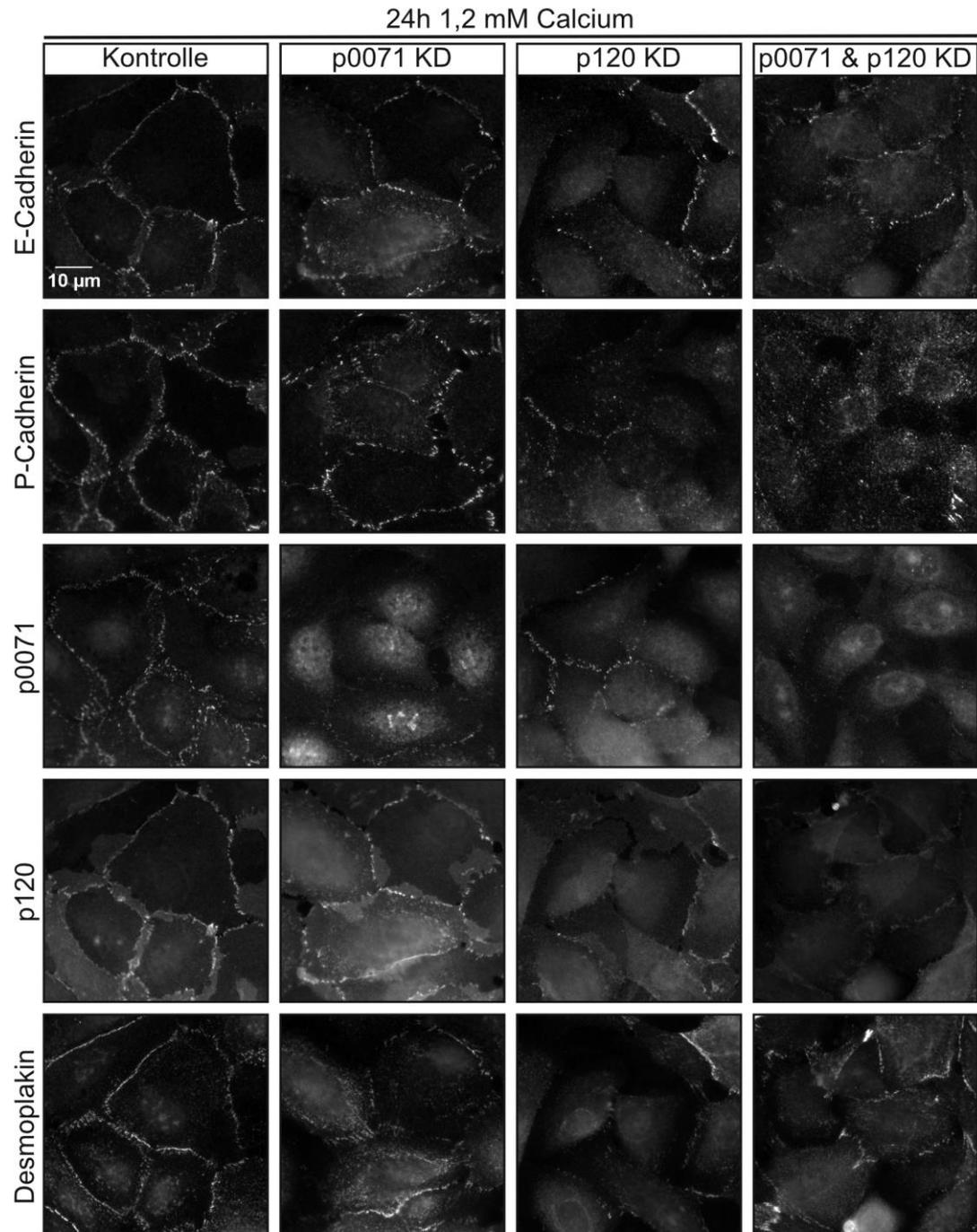


Abb. 2-7: Der Einfluss der Catenine auf die *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung 24 Stunden nach Calciumstimulation in den Mauskeratinozyten

Die Lokalisation von endogenem E- und P-Cadherin sowie p0071, p120 und Desmoplakin wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode in Methanol-fixierten Zellen sichtbar gemacht. Die Zellen wurden zuvor für 24 Stunden durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1,2 mM zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung angeregt. 72 Stunden vor den Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen zudem mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder mit siRNA gegen p0071 (p0071 KD) bzw. p120 (p120 KD) oder mit einem siRNA Mix, der gegen p0071 und p120 gerichtet war (p0071 & p120 KD), transfiziert. Der eingezeichnete Maßstab von 10  $\mu$ m im ersten Bild von E-Cadherin gilt für alle hier gezeigten Bilder.

Der p120 Knockdown hat einen deutlich stärkeren Effekt auf die Zell-Zell-Kontaktbildung in den Mauskeratinozyten wie der p0071 Knockdown, da in den p120 Knockdown-Zellen weder E-Cadherin noch Desmoplakin 24 Stunden nach der 1,2 mM Calciuminkubation an der Zellmembran zu finden sind. Und auch p0071 sowie P-Cadherin sind in ihrer Membranlokalisation in den p120-Knockdown Zellen beeinflusst im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 2-7, S. 40).

Der gleichzeitige Knockdown der beiden Catenine p0071 und p120 führt dazu, dass E- und P-Cadherin sowie Desmoplakin nicht mehr an der Zellmembran lokalisieren können. Ob der Effekt bezüglich Desmoplakin direkt durch die Catenine verursacht wird oder indirekt durch die Störungen bei der Adherens Junctions Bildung, bleibt zu klären. Für einen direkten Effekt spricht, dass für p0071 eine direkte Interaktion mit Desmoplakin beschrieben ist und für p120 mit Desmoglein, einem weiteren desmosomalen Protein (Kanno *et al.*, 2008; Setzer *et al.*, 2004).

Zusammenfassend wurde durch die Immunfluoreszenzstudien gezeigt, dass die beiden Catenine p0071 und p120 für die Membranlokalisation von E- und P-Cadherin notwendig sind und darüber einen Einfluss auf die Ausbildung von Adherens Junctions besitzen. Darüber hinaus beeinflussen sie sich auch gegenseitig in ihrer Lokalisation, d. h. fehlt das eine Catenin ist auch die Membranlokalisation des anderen Catenins beeinflusst. Des Weiteren sind auch die Desmosomen in ihrer Ausbildung nach einem Catenin-Knockdown gestört. Ein gravierender möglicherweise additiver Effekt eines Doppelknockdowns von p0071 und p120 konnte nicht festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob die verringerten Catenin-Mengen nach Knockdown und die hier gezeigte damit einhergehende beeinträchtigte Integrität der Adherens Junctions und Desmosomen auch einen funktionellen Einfluss auf die Zellen haben, wurde ein Dispase-Test durchgeführt. Mittels dieses Tests kann eine Aussage über die Stärke der interzellulären Adhäsion getroffen werden.

## 2.5 Der Einfluss von p0071 und p120 auf die interzelluläre Adhäsion

Beim Dispase-Test werden mittels des Enzyms Dispase, einer Collagenase, die konfluenten Zellen von der Zellkulturschale abgelöst ohne dabei die durch Calciumstimulation gebildeten Zell-Zell-Kontakte zu beeinflussen. Der so abgelöste intakte Zellmonolayer wurde anschließend mechanischem Stress durch Rotation auf einem Rotationsschüttler ausgesetzt und es wurde analysiert, wann der Zellmonolayer begann in Fragmente zu zerfallen. Der Test wurde mit transient siRNA transfizierten Mausepithelzellen durchgeführt, die für 24 Stunden mit einer erhöhten extrazellulären Calciumkonzentration zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung angeregt wurden. Die Zellen wurden zudem 72 Stunden davor mit Kontroll-siRNA oder mit siRNA gegen p0071 bzw. p120 oder mit einem siRNA Mix, der gegen p0071 und p120 gerichtet war, transfiziert. Die Knockdown-Effizienz wurde mittels Western Blot Analysen überprüft (siehe Abb. 2-8, S. 44).

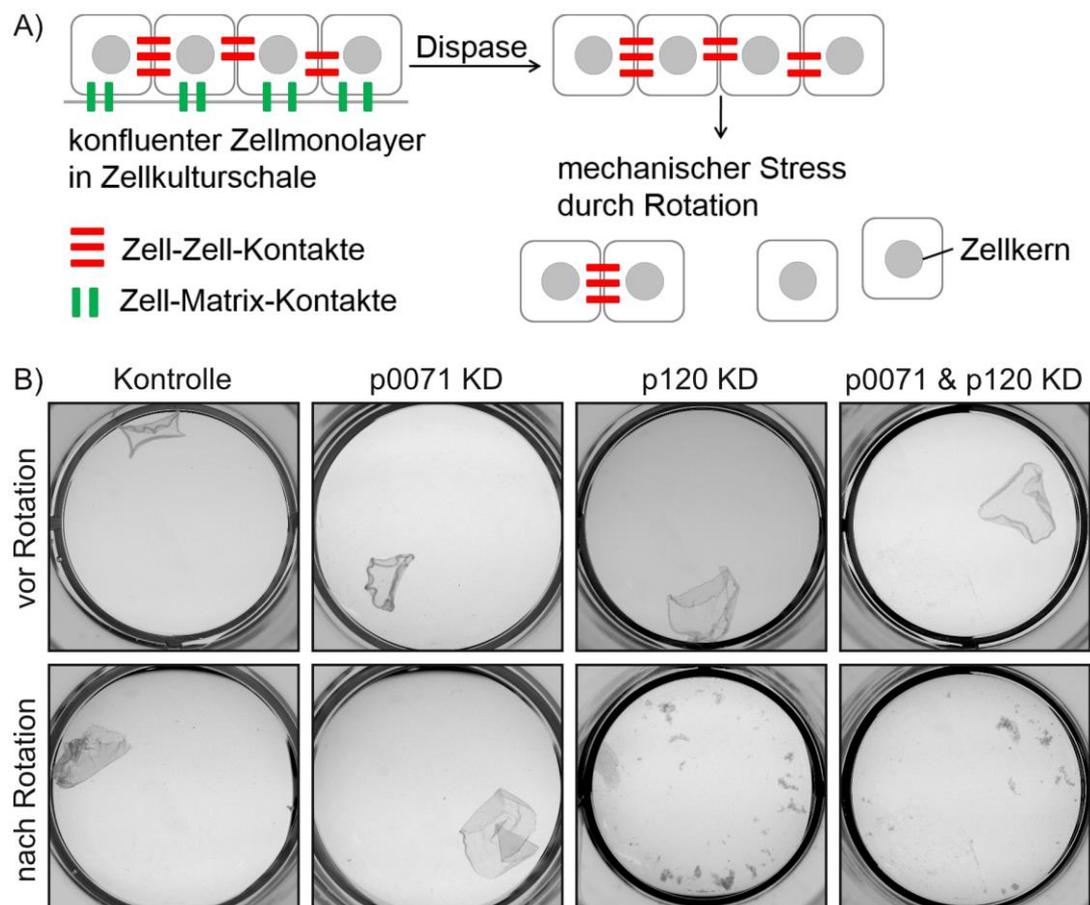


Abb. 2-8: Der Einfluss der Catenine auf die interzelluläre Adhäsion

A) zeigt ein Schema zur Durchführung eines Dispase-Tests. Durch das Enzym Dispase, einer Collagenase, ist es möglich konfluente Zellen ohne Beeinträchtigung der Integrität der Zell-Zell-Kontakte von der Zellkulturschale abzulösen. Der abgelöste Zellmonolayer wird anschließend mechanischem Stress durch Schütteln auf einem Rotationschüttler ausgesetzt, bis er in Fragmente zerfällt, aufgrund nicht mehr intakter Zell-Zell-Kontakte. Auf diese Weise ist ein Rückschluss auf die Stärke der interzellulären Adhäsion, die durch Zell-Zell-Kontakte vermittelt wird, möglich.

B) zeigt die Ergebnisse eines Dispase-Tests mit Mauskeratinozyten. 72 Stunden vor dem Dispase-Test wurden die Mauskeratinozyten mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder mit siRNA gegen p0071 (p0071 KD) bzw. p120 (p120 KD) oder mit einem siRNA Mix, der gegen p0071 und p120 gerichtet war (p0071 & p120 KD), transfiziert. 24 h Stunden vor dem Dispase-Test wurden die Zellen zudem mit 1,2 mM extrazellulärem Calcium zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung stimuliert.

Der Dispase-Test zeigte, dass nach Reduktion des p120 Proteinlevels in den Mauskeratinozyten die interzelluläre Adhäsion verringert ist, da diese Knockdown-Zellen gegenüber dem induzierten mechanischen Stress nicht so resistent waren wie die Kontroll-Zellen (siehe Abb. 2-9, S. 44). Gleiches gilt für die Zellen, in denen die Proteinmenge von p0071 simultan zu der Proteinmenge von p120 reduziert war (p0071 & p120 KD). Die verringerte interzelluläre Adhäsion ist sehr wahrscheinlich auf die beobachteten Defekte bei der Ausbildung der Adherens Junctions und Desmosomen zurückzuführen, wie sie im Abschnitt 2.4 (S. 38) beschrieben wurden. Der alleinige p0071 Knockdown besitzt hingegen keinen starken Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion, da diese Knockdown-Zellen dem mechanischen Stress widerstanden, ähnlich wie die Kontroll-Zellen auch. Somit reichen die gebildeten Adherens Junctions und Desmosomen, wie sie in der Abb. 2-7 (S. 40) für die p0071 Knockdown-Zellen nach 24 Stunden Calciumstimulation zu sehen sind, aus, um eine mit den Kontroll-Zellen vergleichbare interzelluläre Adhäsion auszubilden.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass p120 einen stärkeren Einfluss auf die interzelluläre Adhäsion besitzt als p0071. Die Zelllysate zur Bestimmung der Knockdown-Effizienz für diesen Test wurden mittels Western Blot Analysen auch gleichzeitig bezüglich der Proteinlevel von anderen Adherens Junctions Komponenten hin untersucht. Damit wurde analysiert, ob die beiden Catenine p0071 und p120 einen Einfluss darauf haben und womöglich so die beobachteten Veränderungen bei den Immunfluoreszenzstudien unter Abschnitt 2.4 (S. 38) zu erklären sind.

## 2.6 Der Einfluss von p0071 und p120 auf die Proteinlevel von Adherens Junctions Komponenten

Zelllysate von Mauskeratinozyten und HaCaT-Zellen wurden durch Western Blot Analysen hinsichtlich der Proteinlevel der Adherens Junctions Komponenten E-Cadherin, P-Cadherin,  $\beta$ -Catenin und p0071 sowie p120 untersucht. Für p120 ist aus anderen Modellsystemen bereits eine stabilisierende Wirkung auf das Proteinlevel der klassischen Cadherine bekannt (Davis *et al.*, 2003; Ireton *et al.*, 2002; Nanes *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2005). Dies konnte in den beiden untersuchten Keratinozyten-Zelllinien bestätigt werden. So führte ein siRNA-vermittelter p120 Knockdown in den Mauskeratinozyten wie auch in den HaCaT-Zellen zu einer Abnahme der Proteinmenge an E-Cadherin und in den HaCaT-Zellen zusätzlich auch von P-Cadherin im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (siehe Abb. 2-9, S. 44). Das Proteinlevel von  $\beta$ -Catenin ist in diesen Fällen ebenfalls reduziert, da es zusammen mit E-Cadherin von der Plasmamembran endozytiert und abgebaut wird, wenn p120 zur Stabilisierung des Komplexes fehlt (Davis *et al.*, 2003).

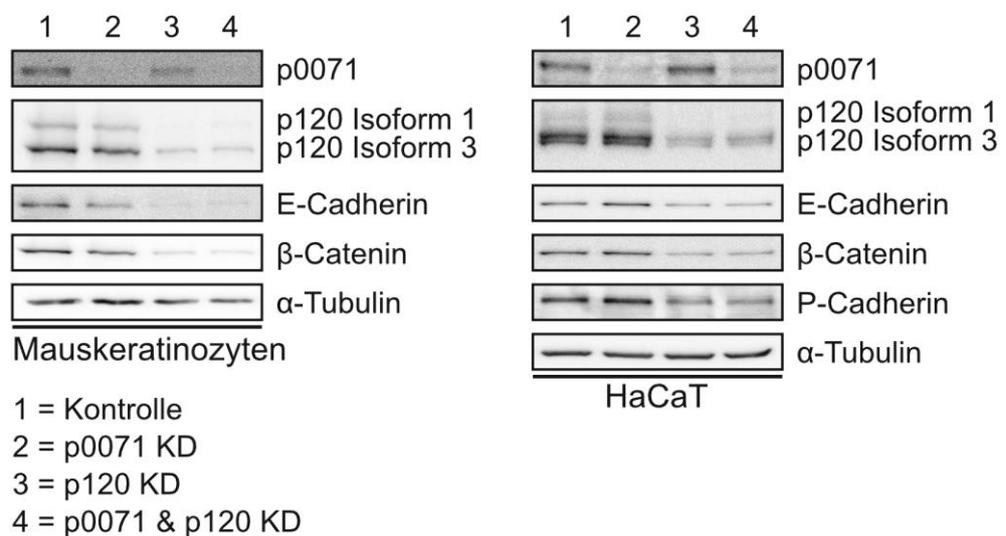


Abb. 2-9: Der Einfluss der Catenine auf das Proteinlevel der Adherens Junctions  
Links sind Western Blot Analysen von Zelllysaten aus Mauskeratinozyten gezeigt, rechts welche von HaCaT-Zellen. Beide Zelllinien wurden 72 Stunden zuvor mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder mit siRNA gegen p0071 (p0071 KD) bzw. p120 (p120 KD) oder mit einem siRNA Mix, der gegen p0071 und p120 gerichtet war (p0071 & p120 KD), transfiziert. Die Mauskeratinozyten wurden zudem 24 Stunden vor der Zellyse mit 1,2 mM extrazellulärem Calcium zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung stimuliert. Das  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle das gleiche Proteinnengen aufgetragen worden sind. Eine Quantifizierung der Ergebnisse war aufgrund des starken Hintergrundes in den p0071 Western Blots nicht möglich.

Es konnte kein möglicher additiver Effekt nach dem gleichzeitigen Knockdown von p0071 und p120 beobachtet werden. Die Reduktion der Proteinmengen von E-Cadherin, P-Cadherin und  $\beta$ -Catenin war in diesem Fall vergleichbar mit dem alleinigen p120 Knockdown.

Nach einem alleinigen p0071 Knockdown konnte keine starke Abnahme der Proteinlevel der anderen Adherens Junctions Komponenten im Vergleich zu den Kontroll-Zellen beobachtet werden. Eine Quantifizierung der Western Blot Signale war aufgrund des starken Hintergrundes mit dem p0071 Antikörper nicht möglich. Eine gegenseitige Beeinflussung der Proteinmengen bezüglich der beiden Catenine p0071 und p120 konnte sich in drei unabhängig durchgeführten Experimenten nicht erhärten, auch wenn es in den hier gezeigten Western Blots zum Teil danach aussieht.

Zusammenfassend wurde mit diesen Western Blot Analysen gezeigt, dass p120 einen Einfluss auf die Proteinlevel der klassischen Cadherine E- und P-Cadherin sowie auf  $\beta$ -Catenin in den Keratinozyten besitzt. Diese Funktion scheint im Gegensatz dazu p0071 nicht zu besitzen oder in einem sehr viel geringeren Maße als p120. Die verringerten Proteinmengen an E- und P-Cadherin sowie  $\beta$ -Catenin nach dem p120 Knockdown können die fehlende Membranlokalisierung von E- und P-Cadherin in den Immunfluoreszenzstudien unter Abschnitt 2.4 (S. 38) erklären.

Für p120 ist bereits auch bekannt, dass es, um an der Membran zu lokalisieren dort E-Cadherin bindet. Fehlt E-Cadherin an der Plasmamembran lokalisiert p120 im Zytoplasma (Thoreson *et al.*, 2000). Da p0071 an derselben Stelle im Cadherinmolekül bindet wie p120, stand die Frage im Raum, ob sich p0071 ähnlich verhält und ein verändertes Lokalisationsmuster nach einem Cadherin-Knockdown aufweist. Aus diesem Grund wurden Immunfluoreszenzstudien mit den Mauskeratinozyten durchgeführt, in denen die Cadherin-Proteinlevel durch siRNAs reduziert waren.

## 2.7 Der Einfluss der Cadherine auf die p0071 und p120 Lokalisation

Um zu untersuchen, ob die klassischen Cadherine E- und P-Cadherin einen Einfluss auf die Lokalisation von p0071 und p120 haben, wie es im Fall für p120 und E-Cadherin bereits bekannt ist (Thoreson *et al.*, 2000), wurde ein transienter siRNA-vermittelter Knockdown in den Mauskeratinozyten durchgeführt. Die Zellen wurden 72 Stunden vor dem Anfertigen der Immunfluoreszenzstudien mit Kontroll-siRNA transfiziert oder mit siRNA gegen E-Cadherin bzw. P-Cadherin oder mit einem siRNA Mix, der gegen E-Cadherin und P-Cadherin gerichtet war. Zudem wurden die Mauskeratinozyten für 24 Stunden vor der Fixierung durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciummenge auf 1,2 mM zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung angeregt. Zu diesem Zeitpunkt lokalisierten dann E- und P-Cadherin sowie p0071, p120 und der desmosomale Marker Desmoplakin kontinuierlich verteilt an der Zellmembran in den Kontroll-Zellen, was für die Ausbildung intakter Adherens Junctions und Desmosomen spricht. Die Lokalisation von Desmoplakin wurden bei diesen Knockdown-Experimente mit analysiert, um die Aussage treffen zu können, ob die nach den Catenin-Knockdown gezeigte beeinflusste Desmoplakin-Lokalisation (siehe Abb. 2-7, S. 40) spezifisch für diese ist oder generell durch beeinträchtigte Adherens Junctions hervorgerufen wird.

Die Knockdown-Effizienz wurde bei diesen Immunfluoreszenzstudien wieder anhand der fehlenden Signale an der Zellmembran für die durch die siRNA herunterregulierten Cadherine beurteilt. Wie in der Abb. 2-10 (S. 47) zu sehen, fehlt nach der Transfektion der Zellen mit siRNA, die gegen E-Cadherin gerichtet ist, nicht nur E-Cadherin an der Zellmembran, sondern auch P-Cadherin und *vice versa*, so dass die Spezifität der verwendeten siRNA gegenüber den einzelnen Cadherin-Arten in Frage zu stellen ist, da in der Literatur solch ein Einfluss der Cadherine untereinander bisher nicht dokumentiert ist (Michels *et al.*, 2009).

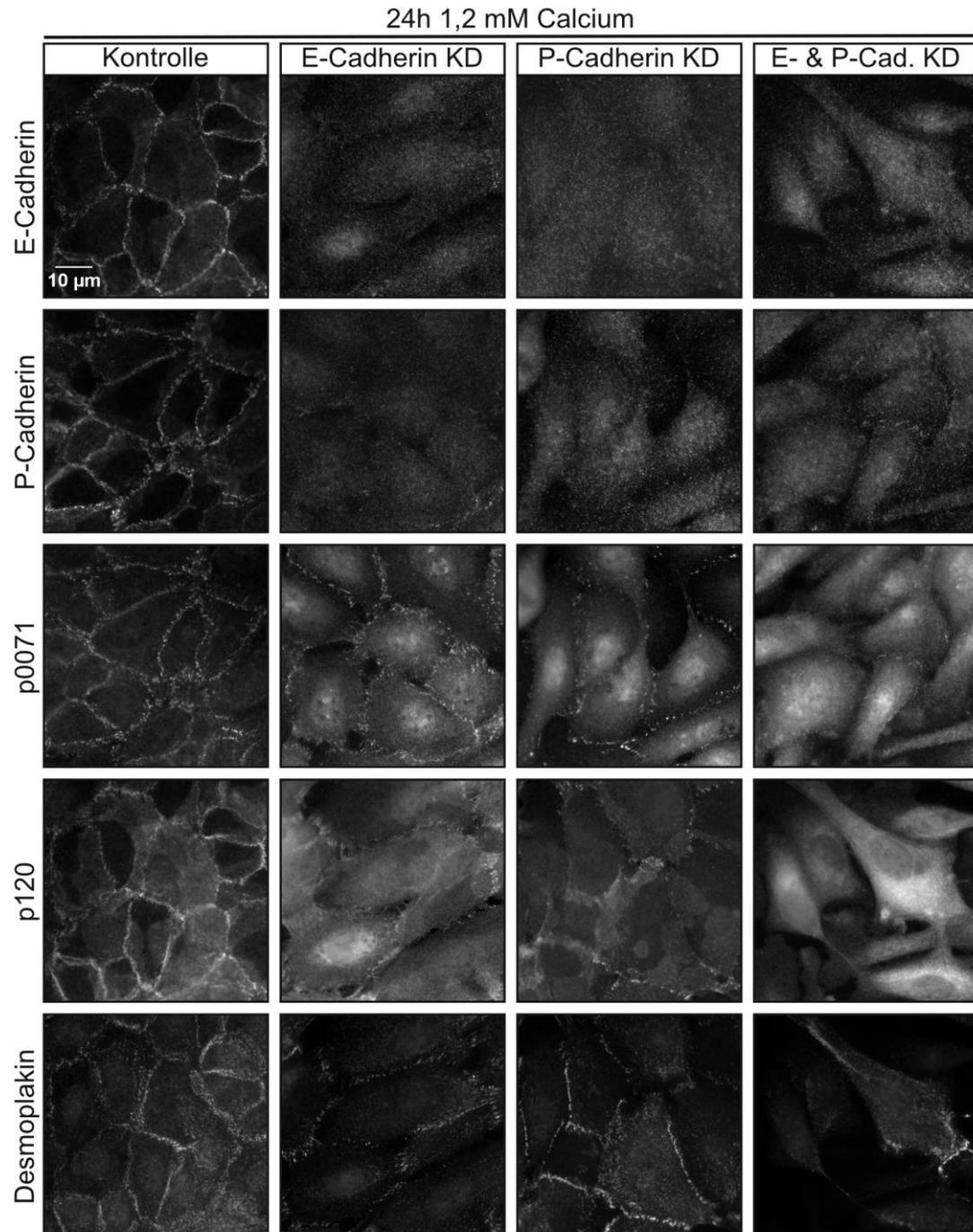


Abb. 2-10: Der Einfluss der Cadherine auf die *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung 24 Stunden nach Calciumstimulation in den Mauskeratinozyten

Die Lokalisation von endogenem E- und P-Cadherin sowie p0071, p120 und Desmoplakin wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode in Methanol-fixierten Zellen sichtbar gemacht. Die Zellen wurden zuvor für 24 Stunden durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1,2 mM zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung angeregt. 72 Stunden vor den Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen zudem mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder mit siRNA gegen E-Cadherin (E-Cadherin KD) bzw. P-Cadherin (P-Cadherin KD) oder mit einem siRNA Mix, der gegen E-Cadherin und P-Cadherin gerichtet war (E- & P-Cadherin KD), transfiziert. Der eingezeichnete Maßstab von 10 µm im ersten Bild von E-Cadherin gilt für alle hier gezeigten Bilder.

Während p120 in den Knockdown-Zellen nicht mehr an der Membran lokalisiert, gelingt dies p0071 noch zu einem gewissen Ausmaß in den Einzelknockdown-Zellen (siehe Abb. 2-10, S. 47). Zwar ist p0071 in den Knockdown-Zellen bei weitem nicht so kontinuierlich an der Zellmembran verteilt wie in den Kontroll-Zellen, doch lokalisiert es merklich an der Plasmamembran, wie es auch für Desmoplakin zu beobachten ist. Dies ändert sich dramatisch, wenn man die Doppelknockdown-Zellen betrachtet. Sie weisen im Gegensatz zu den Kontroll- und Einzelknockdown-Zellen eine spindelförmige Zellmorphologie auf, wie sie auch in den unstimulierten Mauskeratinozyten vorkommt (Vgl. Abb. 2-4, S. 35). In diesen Zellen können weder p0071, p120 noch Desmoplakin an der Zellmembran nachgewiesen werden. Die Bildung intakter Adherens Junctions und Desmosomen ist unter diesen Bedingungen scheinbar nicht mehr möglich.

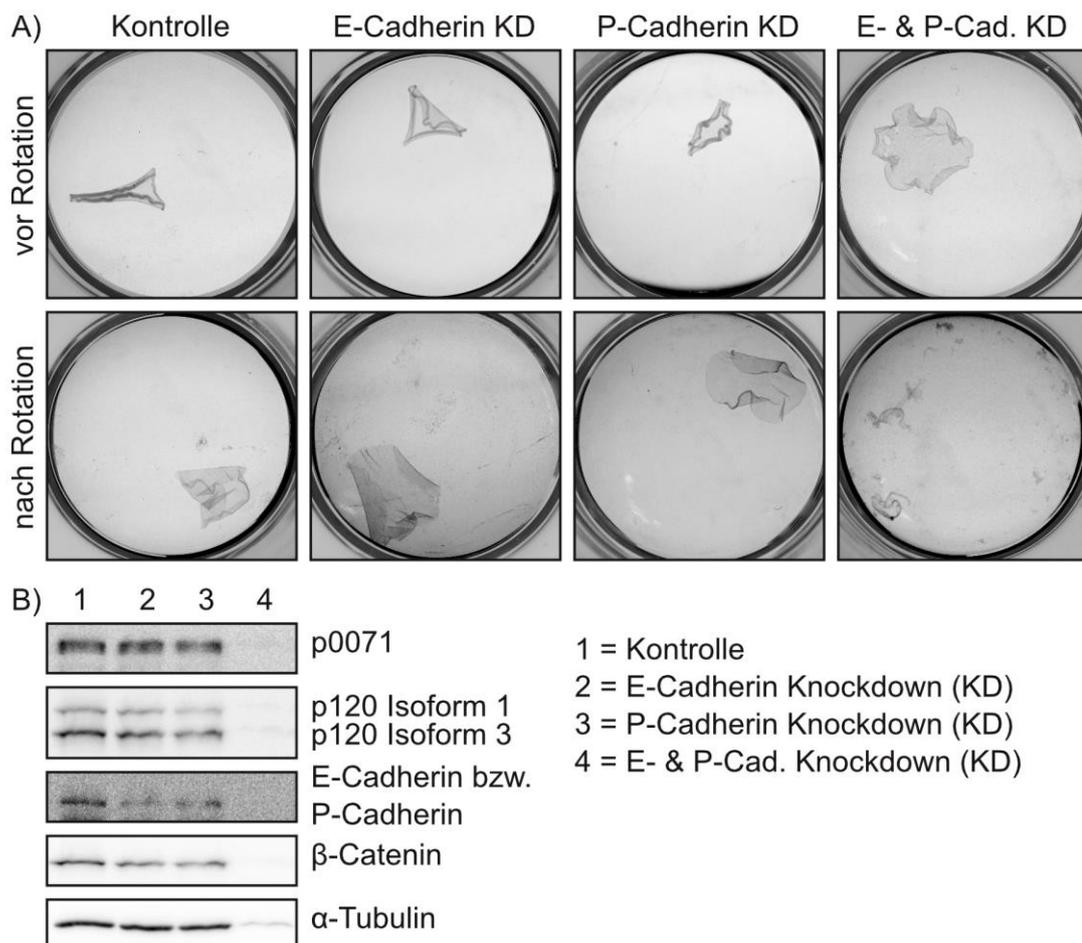


Abb. 2-11: Der Einfluss der Cadherine auf die interzelluläre Adhäsion

A) zeigt die Ergebnisse eines Dispase-Tests mit Mauskeratinozyten, die für 24 Stunden mit einer erhöhten extrazellulären Calciummenge von 1,2 mM zur *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung angeregt wurden. 72 Stunden vor dem Dispase-Test wurden die Zellen zudem mit Kontroll-siRNA (Kontrolle) oder mit siRNA gegen E-Cadherin (E-Cadherin KD) bzw. P-Cadherin (P-Cadherin KD) oder mit einem siRNA Mix, der gegen E-Cadherin und P-Cadherin gerichtet war (E- & P-Cadherin KD), transfiziert.

B) zeigt exemplarische Western Blot Analysen für die Knockdown-Effizienzen in den für den Dispase-Test verwendeten Mauskeratinozyten. Der hier verwendete E-Cadherin Antikörper kann laut Herstellerangaben mit P-Cadherin kreuzreagieren. Das  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle das gleiche Proteinnengen aufgetragen worden sind. Eine Quantifizierung der Ergebnisse war aufgrund des z.T. starken Hintergrundes in den Western Blots nicht möglich.

Die Cadherin-Doppelknockdown-Zellen zeigen im Dispase-Test eine Schwächung der interzellulären Adhäsion im Vergleich zu den Kontroll- und Einzelknockdown-Zellen (siehe Abb. 2-11, S. 49). Die Einzelknockdowns der Cadherine führten zu keiner Reduktion der interzellulären Adhäsion im Vergleich zu den Kontroll-Zellen. Dies könnte auf die zwar verringerte, aber trotzdem noch vorkommende Lokalisation von p0071 und vor allem von Desmoplakin an der Zellmembran zurück zu führen sein. Das an der Zellmembran lokalisierte Desmoplakin zeigt das Vorhandensein von Desmosomen in diesen Zellen an, die neben den Adherens Junctions für die Stärke der interzellulären Adhäsion verantwortlich sind (Getsios *et al.*, 2004).

Das der Effekt auf die interzelluläre Adhäsion erst in den Doppelknockdown-Zellen so deutlich zu sehen ist, obwohl die Immunfluoreszenzstudien bereits in den Einzelknockdown-Zellen keine Cadherine mehr an der Zellmembran zeigen und damit die Spezifität der verwendeten siRNAs in Frage zu stellen ist, liegt wahrscheinlich an der verwendeten siRNA-Menge. So wurden die siRNA-Konzentrationen, die für die Einzelknockdowns erfolgreich getestet wurden, für den Doppelknockdown kombiniert. Dies bewirkt, dass die Catenine p0071 und p120 nicht länger an der Plasmamembran lokalisieren können und die Zellen dadurch keine intakten Adherens Junctions und Desmosomen mehr bilden können, was zu einer Reduktion der interzellulären Adhäsion führt (siehe Abb. 2-10, S. 47 und Abb. 2-11, S. 49).

Die Proteinlevel von p0071 und p120 sind nach den Cadherin-Knockdowns weitestgehend unbeeinflusst (siehe Abb. 2-11, S. 49), wohingegen die  $\beta$ -Catenin Proteinmenge reduziert aussieht im Vergleich zu den Kontroll-Zellen. Dies wäre in Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen (Capaldo *et al.*, 2007).

Die Auswertung der Proteinlevel von p0071, p120 und  $\beta$ -Catenin nach einem Cadherin-Doppelknockdown und durchgeführtem Dispase-Assay war nicht möglich, da die gesammelten und lysierten Zellfragmente dieses Ansatzes deutlich weniger Zellen enthielten als die Kontrolle. Durch die fehlenden Zell-Zell-Kontakte sind bei der Herstellung der Zellysate wahrscheinlich viele Zellen für die nachfolgende Western Blot Analyse verloren gegangen.

Zusammenfassend wurde durch die gezeigten Experimente bewiesen, dass die klassischen Cadherine E- und P-Cadherin die Membranlokalisierung von p120 beeinflussen, die von p0071 weniger. Der Einfluss der beiden Cadherine auf die Proteinstabilität beschränkt sich auf  $\beta$ -Catenin und nicht noch zusätzlich auf p0071 und p120. Der Doppelknockdown der beiden klassischen Cadherine in den Keratinozyten bewirkt eine veränderte spindelförmige Zellmorphologie und das komplette Fehlen von Adherens Junctions und Desmosomenkomponenten an der Zellmembran. Da aus vorangegangenen Experimenten bekannt ist, dass Desmosomen nach den Adherens Junctions gebildet werden (siehe Abb. 2-5, S. 37), lässt sich nun schlussfolgern, dass funktionelle Adherens Junctions Voraussetzung für die Bildung intakter Desmosomen sind. Fehlen diese Arten von Zell-Zell-Kontakten, kommt es zu einer Reduktion der interzellulären Adhäsion, wie sie im Dispase-Test zu beobachten war.

Um näher zu untersuchen, ob sich die Proteinmengen verschiedener Adherens Junctions und desmosomaler Proteine im Verlauf der Differenzierung verändern, wurden Western Blot Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung in den Keratinozyten durchgeführt. Dies sollte neben den bereits präsentierten Immunfluoreszenzstudien zeigen, dass der Zeitpunkt zur Durchführung des Dispase-Tests 24 Stunden nach Induktion der *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung richtig gewählt war, um einen möglichen Effekt der Adherens Junctions auf die interzelluläre Adhäsion zu analysieren, bevor die Zellen in einen calcium-unabhängigen Desmosomen-vermittelten hyperadhäsiven Zustand übergehen.

## 2.8 Der Differenzierungsprozess in Keratinozyten

Die Proteinlevel verschiedener Adherens Junctions sowie desmosomaler Proteine während der Differenzierung wurden in den Mauskeratinozyten als auch in der etablierten humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT mittels Western Blot Analysen untersucht. Dies geschah, um mögliche Unterschiede zwischen den Zelllinien aufzuzeigen bzw. um allgemeingültigere Aussagen zu den Proteinlevel während der Differenzierung in Keratinozyten treffen zu können. Der Differenzierungsprozess wurde in den Mauskeratinozyten durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1,2 mM eingeleitet. Dadurch werden die Zellen dazu angeregt calciumabhängige Zell-Zell-Kontakte auszubilden und zu differenzieren. Im Gegensatz dazu wird bei den verwendeten HaCaT-Zellen der Differenzierungsprozess nach Erreichen der Konfluenz in der Zellkulturschale eingeleitet.

Wie in Abb. 2-12 (S. 52) zu sehen, sind die Proteinlevel der Adherens Junctions Proteine p0071, p120 und E-Cadherin über den Differenzierungszeitraum von sieben Tagen in den Mauskeratinozyten weitestgehend unverändert, wohingegen eine Zunahme der Proteinlevel in der humanen HaCaT-Zelllinie zu beobachten ist. In den Mauskeratinozyten werden zudem mindestens zwei verschiedene p120 Isoformen gebildet, in den HaCaT-Zellen ist hier dagegen nur eine Isoform nachweisbar. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit am verwendeten Lysepuffer, da mit dem Puffer, der für die Immunpräzipitationen eingesetzt wurde, in den HaCaT-Zellen ebenfalls zwei p120 Isoformen nachzuweisen waren (siehe Abb. 2-2, S. 30). Für die hier gezeigten Ergebnisse wurde hingegen ein SDS-Lysepuffer verwendet. Die p120 Isoform 3 wird als „epitheliale“ Isoform angesehen, da sie überwiegend in Keratinozyten gebildet wird, die p120 Isoform 1 hingegen vor allem in Melanozyten (Aho *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die p120 Isoform 3 in Lungenkarzinomazellen, in denen E-Cadherin nicht länger an der Zellmembran lokalisiert, die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) verhindert, im Gegensatz zur p120 Isoform 1, die die EMT fördert (Zhang *et al.*, 2014).

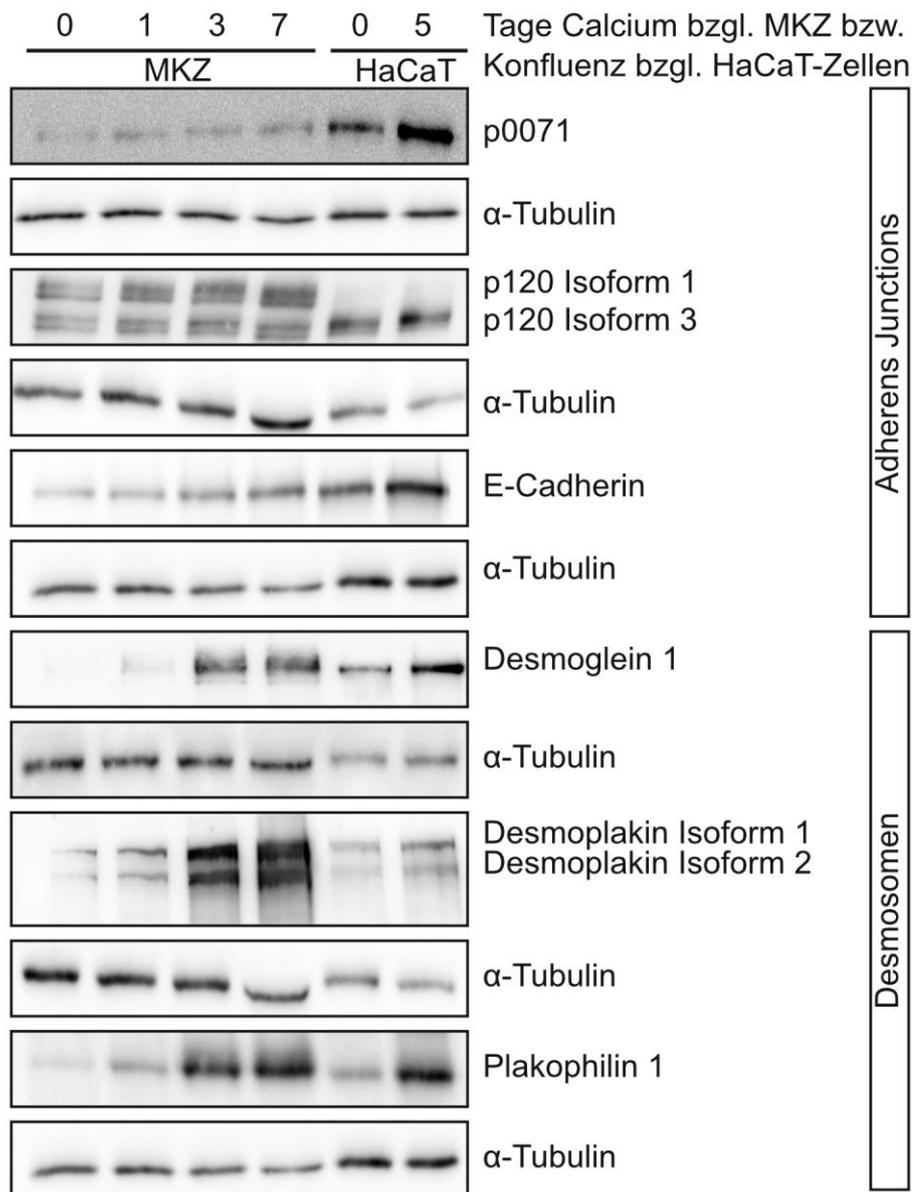


Abb. 2-12: Die Proteinmengen verschiedener Adherens Junctions und desmosomaler Proteine in murinen und humanen Keratinozyten während der Differenzierung. Die Proteinmengen der Adherens Junctions Proteine p0071, p120 und E-Cadherin sowie der desmosomalen Proteine Desmoglein 1, Desmoplakin und Plakophilin 1 wurden mittels Western Blot Analyse während des Differenzierungsprozesses der Keratinozyten untersucht. Die Differenzierung der Mauskeratinozyten (MKZ) wurde durch die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 1,2 mM induziert, indessen die humanen HaCaT-Keratinozyten nach Erreichen der Konfluenz begannen zu differenzieren. Das  $\alpha$ -Tubulin diente erneut als Ladekontrolle. Eine Quantifizierung der Ergebnisse war aufgrund des z.T. starken Hintergrundes in den Western Blots nicht möglich.

Die Proteinlevel der desmosomalen Proteine Desmoglein 1, Desmoplakin und Plakophilin 1 nahmen im Verlauf des Differenzierungsprozesses in den Mauskeratinozyten wie auch in den humanen HaCaT-Keratinozyten zu (siehe Abb. 2-12, S. 52).

Eine Zunahme der desmosomalen Proteinmengen muss nicht zwingend mit der Ausbildung des calcium-unabhängigen Desmosomen-vermittelten hyperadhäsiven Zustandes einhergehen, kann aber ein Indiz dafür sein (Kimura *et al.*, 2007). Daher deuten diese Ergebnisse an, dass es sinnvoll war den Dispase-Test einen Tag nach Erhöhung der extrazellulären Calciummenge in den Mauskeratinozyten durchzuführen. Ein früherer Zeitpunkt war aufgrund der Verzögerung der Adherens Junctions Bildung nach Knockdown, wie es in den angefertigten Immunfluoreszenzstudien gezeigt ist (siehe Abb. 2-6, S. 39), ebenfalls nicht sinnvoll.

Zu denen im Western Blot angeführten Zeiten wurden auch Immunfluoreszenzstudien in den Mauskeratinozyten angefertigt. Da sich jedoch kein Unterschied in den Lokalisationsmustern von E-Cadherin, p120, p0071 und Desmoplakin bezüglich den 1, 3 und 7 Tageswerten zeigte, wurde auf die Abbildung der späteren Zeitpunkte verzichtet. Die Lokalisationsmuster nach einem Tag sind in Abb. 2-4 (S. 35) und Abb. 2-5 (S. 37) zu sehen.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass eine Zunahme der Proteinlevel der desmosomalen Proteine während der Differenzierung in den beiden untersuchten Keratinozyten-Zelllinien auftrat. Veränderungen der Proteinlevel der Adherens Junctions Proteine zeigten sich hingegen nur in den humanen HaCaT-Zellen.

Generell weisen die Experimente in den Mauskeratinozyten darauf hin, dass p0071 für die Zell-Zell-Kontakte nicht so wichtig ist wie p120. Dabei kann es sich aber um zelltyp-spezifische Ergebnisse handeln, so dass keine allgemeingültige Aussage bezüglich der Ausbildung der Zellpolarität durch p0071 oder p120 vermittelte Zell-Zell-Kontakte getroffen werden kann.

## 2.9 Die apikal-basolaterale Zellpolarität in Enterozyten

Um den Einfluss von p0071 auf die Zellpolarität noch anderweitig zu untersuchen, wurde das Modellsystem gewechselt. Darmepithelzellen, auch Enterozyten genannt, zeichnen sich durch eine apikal-basolaterale Zellpolarität aus (siehe Abb. 1-7, S. 22). Die Zellen verfügen apikal über einen Bürstensaum, bestehend aus Mikrovilli, die unter anderem dem Stoffaustausch zwischen dem Darmlumen und der Zelle dienen. Lateral sind u. a. die drei verschiedenen Arten von Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (siehe Abb. 1-7, S. 22). Darmepithelzellen wachsen im Gegensatz zu den Epithelzellen in der Haut als einschichtiges, hochprismatisches Epithel. Dieses Wachstum und die Differenzierung in funktionelle Enterozyten kann in der Zellkultur durch einfache Mittel erreicht werden. Daher eignen sich die Zellen gut für Untersuchungen zur Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität.

Mit Hilfe von stabilen p0071 Knockdown-Linien sollte in Caco-2 Zellen untersucht werden, ob ihre Differenzierung in apikal-basolateral polarisierte Enterozyten gestört ist. Diese Zelllinie differenziert nach Erreichen der Konfluenz in der 2D Zellkultur über einen Zeitraum von 3 Wochen in funktionelle Enterozyten mit einem apikalen Bürstensaum. Die Entwicklung zum hochprismatischen Epithel kann durch die Kultivierung der Zellen auf permeablen Filtermembranen gefördert werden (siehe Abschnitt 4.7, S. 99). Darüber hinaus besitzt diese Zelllinie die Eigenschaft während der 3D Zellkultivierung Zysten zu bilden (siehe Abb. 1-7, S. 22). Die zystenbildenden Zellen weisen ebenfalls eine apikal-basolaterale Polarität auf. Die Untersuchungen zur Zellpolarität wurden daher mit der 2D als auch mit der 3D Zellkultivierungsmethode durchgeführt.

## 2.10 Der Differenzierungsprozess in Enterozyten

Zunächst wurde mit der 2D Zellkultivierung analysiert, ob ein stabiler p0071 Knockdown in den Caco-2 Zellen einen Einfluss auf das Proteinlevel verschiedener Zell-Zell-Kontaktproteine während des Differenzierungsprozesses besitzt bzw. die Proteinmenge des Differenzierungsmarker Villin beeinflusst ist (siehe Abb. 2-13, S. 56). Dies könnte auf eine Störung des Differenzierungsprozesses in funktionelle Enterozyten hinweisen und damit auf Störungen bei der apikal-basolateralen Zellpolarität.

Für die Western Blot Analysen wurden die Caco-2 Zellen mit einem stabilen p0071 Knockdown bzw. die dazugehörigen Kontroll-Zellen vor der Zellyse in Collagenbeschichteten Multiwellplatten für 2, 7 und 21 Tage konfluent kultiviert, um die Differenzierung der Zellen zu fördern.

Die Proteinmengen der Adherens Junctions Proteine p120 und E-Cadherin sowie der desmosomalen Proteine Desmoplakin und Desmoglein 2 und des Differenzierungsmarkers Villin unterschieden sich im analysierten Zeitraum nicht zwischen den p0071 Knockdown-Zellen und den Kontroll-Zellen (siehe Abb. 2-13, S. 56). Generell nahmen die Proteinmenge der desmosomalen Proteine sowie des Differenzierungsmarkers Villin im Verlauf der Differenzierung zu.

Die Zunahme der Villin Proteinmenge über die Zeit dient dabei als Indikator für eine erfolgreiche Differenzierung (Chantret *et al.*, 1988). Villin ist ein F-Aktin-bindendes Protein, das vor allem in den Mikrovilli der Enterozyten vorkommt und dort eine wichtige strukturgebende Funktion für die Ausbildung des Bürstensaums besitzt (George *et al.*, 2007). Da der Bürstensaum erst während der voranschreitenden Differenzierung ausgebildet wird und an Größe gewinnt, dient die Zunahme der Villin Proteinmenge als Indikator für diesen Prozess.

Für die p120 Isoform 1 konnte ebenfalls im Laufe des Differenzierungsprozesses eine Zunahme der Proteinmenge beobachtet werden. Zu dieser Isoform ist bekannt, dass sie zu einem Anstieg des E-Cadherin Proteinlevels führt sowie zur verstärkten Bildung von Zell-Zell-Kontakten in Caco-2 Zellen (Roura *et al.*, 2004). Dies erklärt auch die leichte Zunahme des E-Cadherin Proteinlevels über den analysierten Zeitraum.

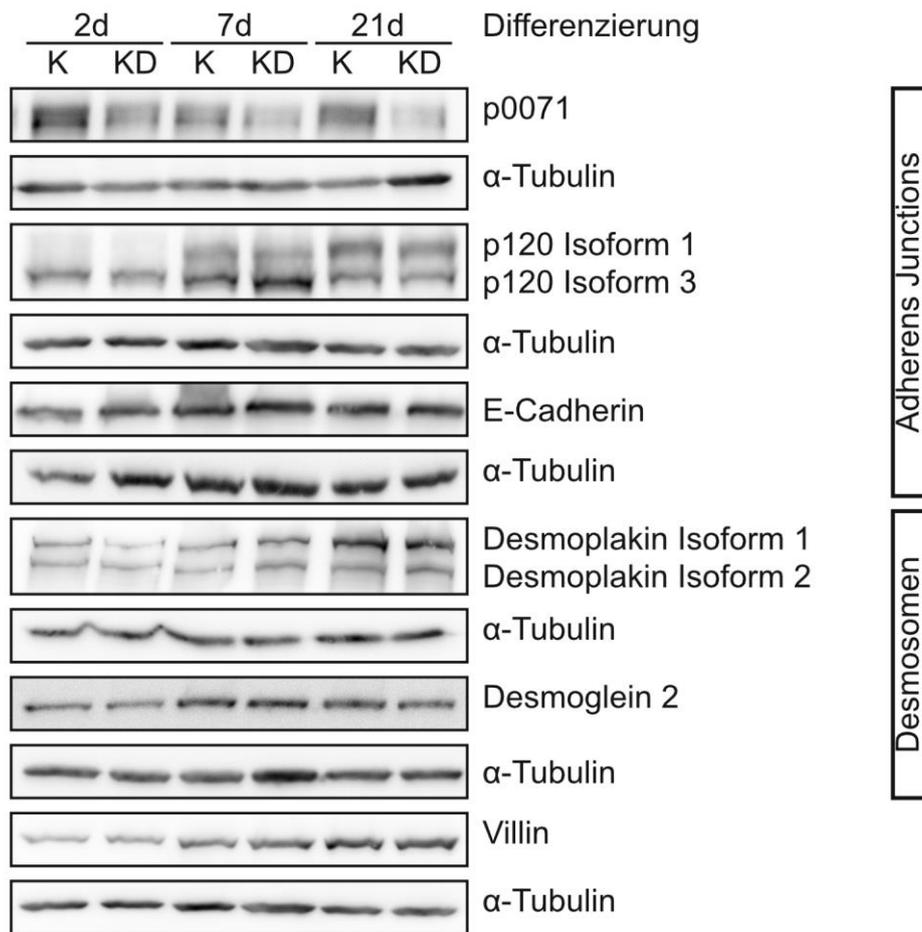


Abb. 2-13: Western Blot Analysen zum Differenzierungsprozess in Caco-2 Zellen  
Caco-2 Zellen mit einem stabilen p0071 Knockdown (KD) bzw. die Kontrolle (K) wurden für 2, 7 oder 21 Tage konfluent kultiviert, um so den Differenzierungsprozess der Zellen in hochprismatische Enterozyten zu ermöglichen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden durch Western Blot Analysen die Proteinlevel der Adherens Junctions Proteine p0071, p120 und E-Cadherin sowie die der desmosomalen Proteine Desmoplakin und Desmoglein 2 und des Differenzierungsmarker Villin untersucht. Das  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen worden sind.

Grundsätzlich zeigen die Western Blot Analysen, dass der p0071 Knockdown in den verwendeten Caco-2 Linien über den gesamten Differenzierungsprozess stabil war. Der Differenzierungsprozess wurde auch mittels Immunfluoreszenzstudien nähergehend untersucht. Dazu wurden die Caco-2 Linien auf Transwelleinsätzen mit permeablen Filtermembranen für maximal 21 Tage kultiviert. Die Filtermembranen wurden zuvor auf der Seite, wo die Zellen später wuchsen, mit einer Collagenmischung beschichtet, die die Basallamina der Zellen simulieren sollte und so den Differenzierungsprozess der Zellen in funktionelle Enterozyten fördern sollte.

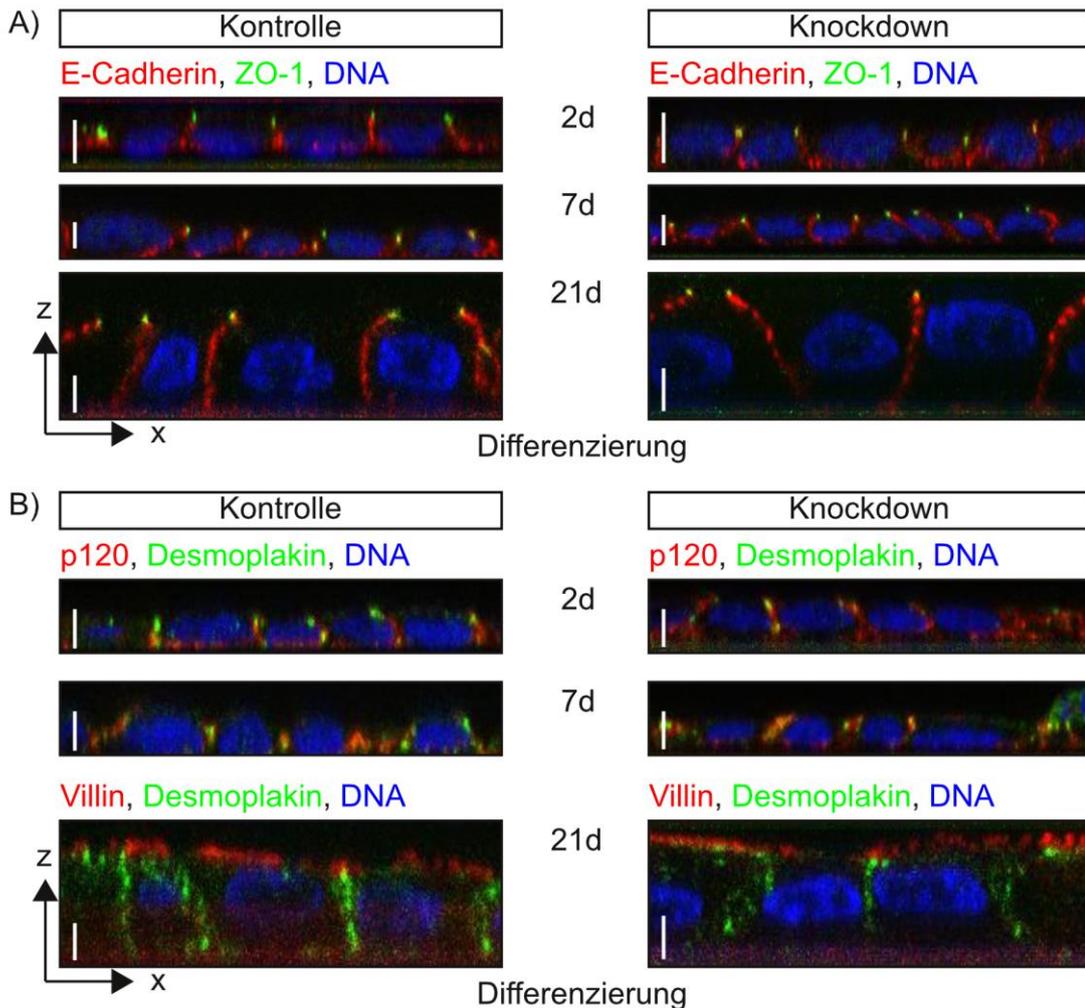


Abb. 2-14: Die Differenzierung von Caco-2 Zellen in hochprismatische Enterozyten. Caco-2 Zellen mit einem stabilen p0071 Knockdown bzw. die Kontrolle wurden für 2, 7 oder 21 Tage konfluent auf Collagen beschichteten permeablen Membranen kultiviert, um so den Differenzierungsprozess der Zellen in hochprismatische Enterozyten zu ermöglichen.

A) zeigt Immunfluoreszenzstudien zu den angegebenen Zeitpunkten bezüglich der Lokalisation des apikalen Markers und Tight Junctions Proteins ZO-1 sowie des basolateralen Markers und Adherens Junctions Proteins E-Cadherin. Dazu wurden die Präparate an einem Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. An diesem Mikroskop können einzelne Ebenen der Zellen gescannt werden und später durch Computertechnik zu einer ganzen Zelle zusammengefügt werden. Dies wurde mit den hier gezeigten Bildern durchgeführt.

B) zeigt Immunfluoreszenzstudien zu den angegebenen Zeitpunkten bezüglich der Lokalisation des Adherens Junctions Proteins p120 sowie des desmosomalen Protein Desmoplakin. 21 Tage nach Start der Differenzierung wurde in den Zellen statt p120 der Differenzierungsmarker Villin mit Desmoplakin durch die indirekte Immunfluoreszenzmethode angefärbt. Der eingezeichnete Maßstab entspricht in jedem Bild 5  $\mu\text{m}$ . Die Pfeile z und x am linken Bildrand von A) und B) sollen die dargestellten Ebenen der Zellen veranschaulichen.

In Abb. 2-14 (S. 57) sind Immunfluoreszenzstudien zu sehen, die den Differenzierungsprozess der Caco-2 Zellen in hochprismatische Enterozyten zeigen. Die für die Zellkultivierung verwendeten Transwelleinsätze mit den permeablen Filtermembranen

ermöglichen die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen aus dem Kultivierungsmedium auf der basalen sowie apikalen Zellseite. Am Ende der Kultivierungszeit wurden die Zellen auf der Filtermembran fixiert und immunzytologische Färbungen angefertigt (siehe Abschnitt 4.13, S. 104). Diese wurden an einem Laser Scanning Mikroskop analysiert. Das Mikroskop ermöglicht es einzelne Zellebenen zu erfassen, die später durch Computertechnik zu einer ganzen Zelle zusammengefasst werden können.

Während des Differenzierungsprozesses in den p0071 Knockdown- sowie in den Kontroll-Zellen lokalisierte der Tight Junctions Marker ZO-1 stets apikal. E-Cadherin hingegen, als Komponente der Adherens Junctions, vor allem an der lateralen Zellmembran unterhalb der Tight Junctions (siehe Abb. 2-14, S. 57). Beide Proteine wurden bereits in anderen Studien als Marker für die korrekte Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität in Enterozyten beschrieben (Halbleib *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde die Lokalisation des apikalen Differenzierungsmarkers Villin und des desmosomalen Markers Desmoplakin in den Zellen nach 21 Tagen konfluentem Zellwachstum analysiert. Die apikale Lokalisation von Villin war in den Knockdown- sowie in den Kontroll-Zellen gut zu sehen. Desmoplakin war hingegen in der Knockdown-Zellen deutlich weniger stark an der lateralen Plasmamembran lokalisiert als in den Kontroll-Zellen. Dies konnte zudem auch schon zu den früheren Zeitwerten (2 und 7 Tagen) beobachten werden. Zu diesen Zeitwerten wurde aufgrund eines sehr gering ausgebildeten Bürstensaums statt Villin p120 mit Desmoplakin kofärbt. Um zu untersuchen, ob die in den Immunfluoreszenzstudien gezeigten Störungen an den Desmosomen zu einer Verminderung der interzellulären Adhäsion führen, wurde der Dispase-Test durchgeführt. Parallel zum Dispase-Test wurden auch noch weitere Immunfluoreszenzstudien angefertigt, um zu analysieren, ob auch die desmosomalen Cadherine Desmocollin 2 und Desmoglein 2 ein verändertes Lokalisationsmuster nach einem p0071 Knockdown aufweisen (siehe Abb. 2-15, S. 59) und damit ein Einfluss von p0071 auf die Desmosomen belegt werden kann.

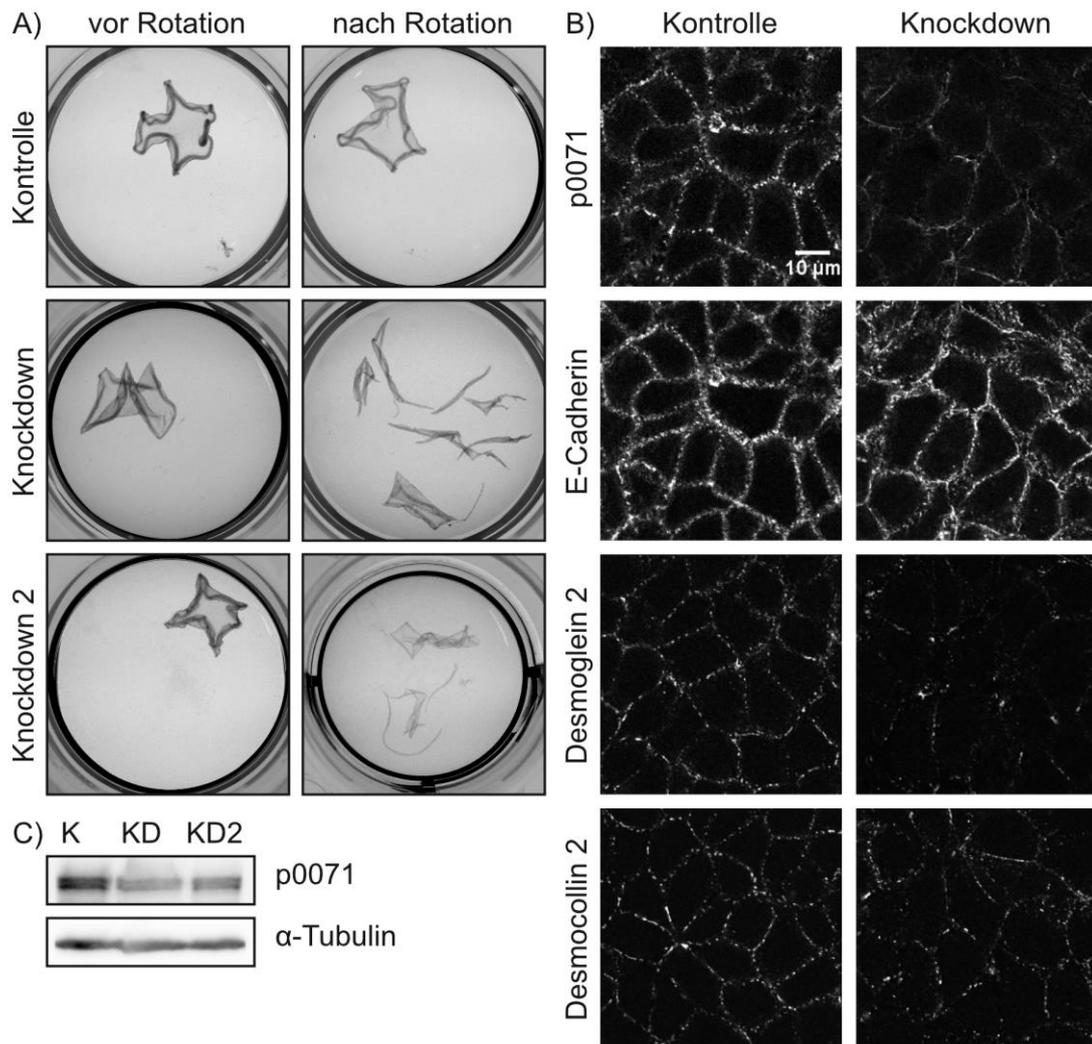


Abb. 2-15: Die interzelluläre Adhäsion in Caco-2 Zellen nach p0071 Knockdown

A) zeigt die Ergebnisse des Dispase-Tests mit Caco-2 Zellen, die über einem stabilen p0071 Knockdown verfügen bzw. die dazugehörige Kontrolle. Für den Dispase-Test wurden zwei verschiedene p0071 Knockdown-Zelllinien verwendet. Vor dem Dispase-Test wurden die Zellen zwei Tage lang konfluent kultiviert.

B) zeigt Immunfluoreszenzstudien, die parallel zum Dispase-Test angefertigt wurden. Durch die indirekte Immunfluoreszenzmethode wurden p0071, E-Cadherin, Desmoglein 2 und Desmocollin 2 in den Zellen sichtbar gemacht. Der eingezeichnete Maßstab im ersten Bild zu p0071 gilt für alle hier gezeigten Immunfluoreszenzstudien.

C) zeigt die Knockdown-Effizienz von p0071 in den für den Dispase-Test verwendeten stabilen Caco-2 Linien. Das  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle, dass gleiche Proteinnengen aufgetragen wurden.

Der Dispase-Test (siehe Abschnitt 4.20, S. 112) wurde durchgeführt nachdem die Caco-2 Zellen zwei Tage lang konfluent kultiviert wurden. Damit sollte festgestellt werden, ob die Desmosomen bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Differenzierung gestört sind und p0071 somit einen Einfluss auf die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte besitzt. Die Ergebnisse des Dispase-Tests belegen, dass die interzelluläre Adhäsion nach

einem p0071 Knockdown in den Caco-2 Zellen verringert ist im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (siehe Abb. 2-15, S. 59). Dass es sich dabei um einen p0071 spezifischen Effekt handelt, kann damit begründet werden, dass zwei unterschiedliche stabile p0071 Knockdown-Zelllinien diesen Phänotyp zeigten. Die Knockdown-Effizienz in den verwendeten Zelllinien wurde einerseits durch Immunfluoreszenzstudien und andererseits durch Western Blot Analysen analysiert (siehe Abb. 2-15, S. 59). In den Knockdown-Linien ist eine Reduktion vom p0071 Proteinlevel zu sehen, jedoch ist auch noch ein gewisser Anteil von p0071 im Western Blot sowie in den Immunfluoreszenzstudien nachweisbar. Es wird vermutet, dass die Zellen, die einen deutlich effizienteren p0071 Knockdown besitzen während der Selektion der stabilen Zelllinien durch den bereits bekannten Zytokinesedefekt beim Fehlen von p0071 absterben (Wolf *et al.*, 2006).

Die parallel zum Dispase-Test angefertigten Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass die Membranlokalisation der desmosomalen Cadherine Desmoglein 2 und Desmocollin 2 stark reduziert ist in den p0071 Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen. Das Adherens Junctions Protein E-Cadherin ist hingegen nur sehr geringfügig in seiner Membranlokalisation nach einem p0071 Knockdown beeinflusst (siehe Abb. 2-15, S. 59).

Zusammenfassend besitzt p0071 somit eine Rolle bei der Ausbildung der Desmosomen in Caco-2 Zellen und beeinflusst darüber die Stärke der interzellulären Adhäsion. Eine Funktion für p0071 bei der Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität konnte mit der angewendeten 2D Zellkultivierung nicht belegt werden, da etablierte apikale sowie basolaterale Marker in den stabilen p0071 Knockdown-Zellen korrekt lokalisierten. Vorangegangene Studien zum Thema apikal-basolaterale Zellpolarität konnten aber zeigen, dass einige Veränderungen bezüglich der Ausbildung der Zellpolarität nicht mit der 2D Zellkultur zu beobachten sind, sondern zum Beispiel erst mit der 3D Zellkultivierung (Martin-Belmonte *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2001). In Kooperation mit Professor Huber vom Institut für Biochemie II in Jena wurde daher eine neuartige 3D Kultivierung der Caco-2 Zellen ausprobiert, die die *in vivo* Bedingungen im Darm deutlich besser widerspiegelt kann als die 2D Zellkultur.

## 2.11 Die Caco-2 Kultivierung auf einem Biochip

Die neuartige Kultivierungsmethode für Darmepithelzellen, die unter anderem in der Arbeitsgruppe von Professor Huber in Jena etabliert wurde, ermöglicht es Caco-2 Zellen in einem gewebeähnlichen Zellverband wachsen zu lassen. Dazu werden die Zellen auf einer Membran mit definierter Porengröße kultiviert und während der Kultivierung über zwei Flüssigkeitsströme - einen auf der apikalen Zellseite, der andere basal auf der Membranseite - mit nährstoffhaltigem Medium versorgt. Die Flüssigkeitsströme werden dabei mit Vakuumpumpen erzeugt, die so eingestellt sind, dass sie den Blutfluss im Darmgewebe auf der basalen Zellseite simulieren und die Darmperistaltik auf der apikalen Zellseite. Auf diese Weise sollen die im Darm vorkommenden *in vivo* Bedingungen simuliert werden.

Den Caco-2 Kontroll- sowie p0071 Knockdown-Zellen gelang es unter den aufgeführten Bedingungen innerhalb von 7 und 14 Tagen einen gewebeähnlichen Zellverband zu bilden (siehe Abb. 2-16, S. 63). Dieser wurde mittels einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung sowie immunhistochemischen Färbungen nähergehend untersucht. Das hier gezeigte Experiment wurde nur einmal durchgeführt. Vorexperimente in der Arbeitsgruppe von Professor Huber hatten bereits gezeigt, dass Caco-2 Zellen nach 14 Tagen ein gewebeähnliches Epithel unter den definierten Kultivierungsbedingungen bilden, so dass zunächst genau dieser Zeitraum gewählt, um mögliche Unterschiede zwischen den Knockdown- und Kontroll-Zellen analysieren zu können. Da jedoch die „Gewebestruktur“ nach 14 Tagen in der HE-Färbung wenig beeinflusst wirkte, wurde auch noch ein Versuch nach einer 7 Tage langen Kultivierung analysiert.

Der Aufbau des darmähnlichen Zellverbandes wirkte in den Knockdown-Zellen weniger strukturiert als bei der Kontrolle, wobei der Effekt nach 7 Tagen deutlich ausgeprägter aussah (siehe Abb. 2-16, S. 63). Weitergehende immunhistochemische Färbungen bezüglich verschiedener Zell-Zell-Kontaktproteine nach 14 Tagen Kultivierungszeit zeigten zudem, dass die Membranlokalisation von E-Cadherin und p120 verringert war, wohingegen die Signale für Desmoplakin verstärkt, aber gleichzeitig auch sehr diffus wirkten in den p0071 Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 2-16, S. 63).

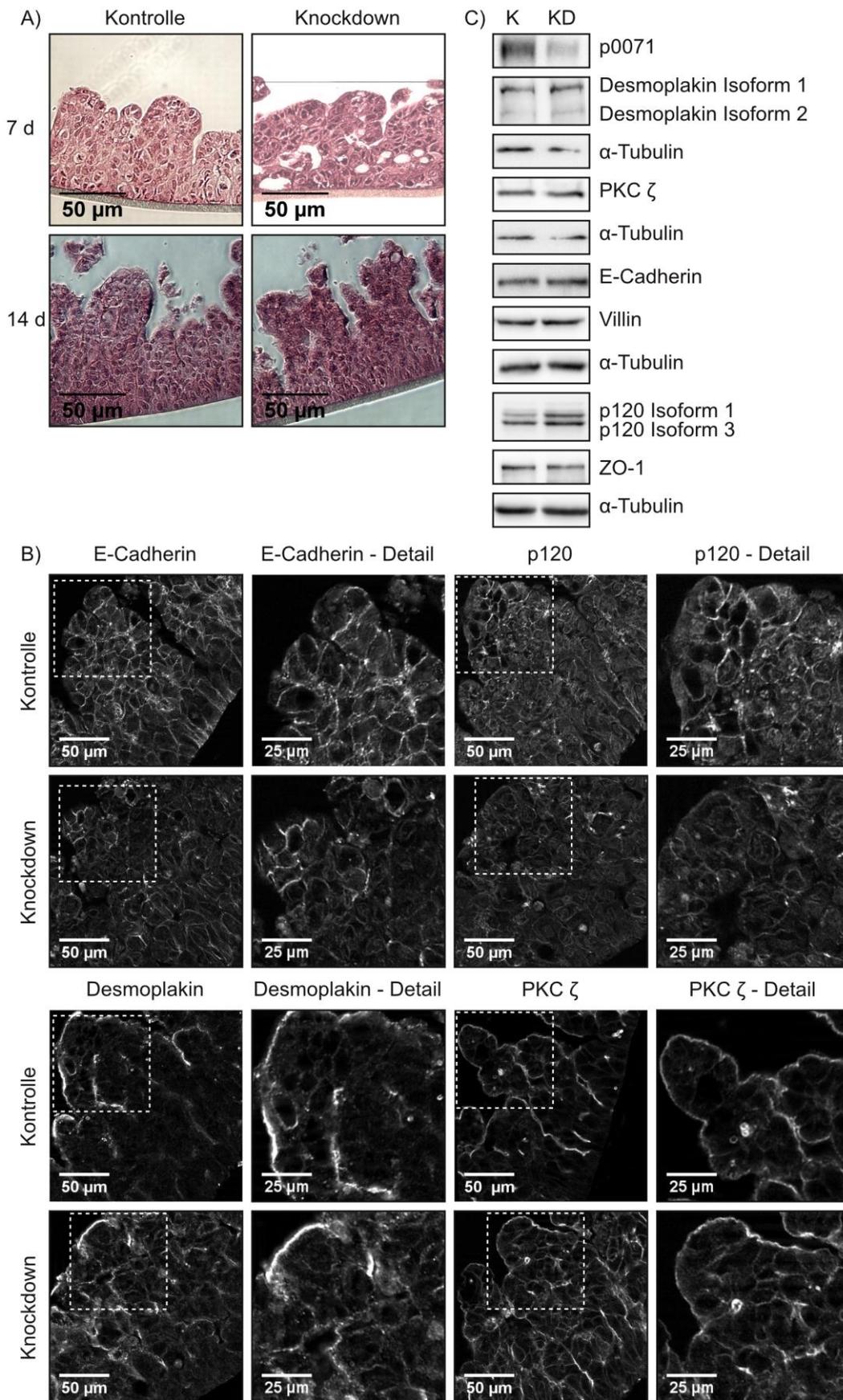


Abb. 2-16: Die Caco-2 Kultivierung auf einem Biochip

Caco-2 Zellen mit einem stabilen p0071 Knockdown bzw. die Kontrolle wurden für 7 bzw. 14 Tage auf einer porösen Membran kultiviert und dabei durch zwei Flüssigkeitsströme – einer apikal, einer basal – mit nährstoffhaltigem Medium versorgt. Die Zellen bildeten so einen gewebeähnlichen Zellverband.

A) zeigt die HE-Färbung von formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Schnitten nach den angegebenen Kultivierungszeiten.

B) zeigt die Lokalisation der Adherens Junctions Proteine E-Cadherin und p120, des desmosomalen Proteins Desmoplakin sowie des Polaritätsproteins PKC  $\zeta$  in Schnitten, bei denen die Zellen für 14 Tage lang kultiviert wurden.

C) zeigt Western Blot Analysen von verschiedenen Zell-Zell-Kontaktproteinen, vom Polaritätsprotein PKC  $\zeta$  sowie vom Differenzierungsmarker Villin in den p0071 Knockdown (KD)-Zellen im Vergleich zu den Kontroll (K)-Zellen. Die Zellen wurden vor der Zellyse für 14 Tage auf dem Biochip kultiviert. Das  $\alpha$ -Tubulin diente erneut als Ladekontrolle.

Es wurde auch die Lokalisation des Polaritätsproteins PKC  $\zeta$  analysiert, um Hinweise auf eine mögliche Störung bei der Ausbildung der Zellpolarität zu bekommen. Das Protein PKC  $\zeta$  ist eine Isoform der atypischen Proteinkinase C und Bestandteil vom Par-Komplex (siehe Abschnitt 1.3, S. 11). Der Par-Polaritätskomplex lokalisiert an den Tight Junctions und ist für die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität wichtig (Hurd *et al.*, 2003). In den Kontroll-Zellen lokalisierte PKC  $\zeta$  apikal an der Zellmembran. In den Knockdown-Zellen konnte eine verstärkte Lokalisation an den lateralen Zellmembranen beobachtet werden. Die Lokalisation dieses wichtigen Polaritätsproteins ist somit nach einem p0071 Knockdown in den Caco-2 Zellen gestört (siehe Abb. 2-16, S. 63).

Durchgeführte Western Blot Analysen belegten, dass die verringerte Membranlokalisation von E-Cadherin und p120 sowie die verstärkte Membranlokalisation von Desmoplakin und PKC  $\zeta$  nicht mit Veränderungen ihrer Proteinmengen nach einem p0071 Knockdown zu begründen sind (siehe Abb. 2-16, S. 63). Lediglich die Proteinmenge von p120 ist nach einem p0071 Knockdown im Vergleich zur Kontrolle erhöht, während es die Proteinmengen der anderen untersuchten Proteine nicht sind.

Zusammenfassend ist die hier gezeigte neue Kultivierungsmethode für Darmepithelzellen wie Caco-2 Zellen geeignet diese in einem gewebeähnlichen Zellverband wachsen zu lassen. Der Aufbau des gewebeähnlichen Zellverbandes ist nach einem p0071 Knockdown gestört. So sind nicht nur verschiedener Zell-Zell-Kontaktproteine in ihrer Lokalisation beeinflusst, sondern auch das Polaritätsprotein PKC  $\zeta$ , was als Hinweis auf eine gestörte Ausbildung der Zellpolarität gewertet werden kann. Somit konnte mit dieser neuartigen Kultivierungsmethode ein Einfluss von p0071 auf die Zellpolarität festgestellt werden, was mit der 2D Zellkultivierung nicht gelang.

Als nächstes wurde der Einfluss von p0071 auf die Zystenbildung von Caco-2 Zellen in der 3D Zellkultivierung analysiert.

## 2.12 Die p0071 Lokalisation während der Zystenbildung

Wie bereits beschrieben können Caco-2 Zellen eingebettet in basalmembranartigen 3D Matrizen ausgehend von einer einzelnen Zelle Zysten bilden. Dieser Prozess wurde durch Immunfluoreszenzstudien eingehender untersucht. Dazu wurden vereinzelte Caco-2 Zellen in eine 3D Matrix eingesät und nach 12, 24 und 48 Stunden fixiert. Durch die indirekte Immunfluoreszenzmethode wurde dann die Lokalisation von p0071 im Vergleich zum apikalen Marker F-Aktin bzw. im Vergleich zum Polaritätsprotein PKC  $\zeta$  analysiert. Im Einzellstadium lokalisierten PKC  $\zeta$  sowie F-Aktin verstärkt an der Plasmamembran. Auch p0071 lokalisierte dort, es konnte jedoch zusätzlich auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (siehe Abb. 2-17, S. 66). Im Zweizellstadium ist eine p0071 Anreicherung an den Zellmembranen feststellbar, die Kontakt mit benachbarten Zellen besitzen. PKC  $\zeta$  wie auch F-Aktin lokalisieren am entstehenden Lumen. Diese Lokalisation wird im weiteren Verlauf der Zystenbildung immer deutlicher, wohingegen p0071 an den Zell-Zell-Kontakten und an der basalen Membranseite angereicht ist (siehe Abb. 2-17, S. 66). Erstmals wurde hier somit das Lokalisationsmuster von p0071 während der Zystenbildung in Caco-2 Zellen beschrieben. Dieses unterscheidet sich von dem des Polaritätsprotein PKC  $\zeta$ , welches apikal lokalisiert.

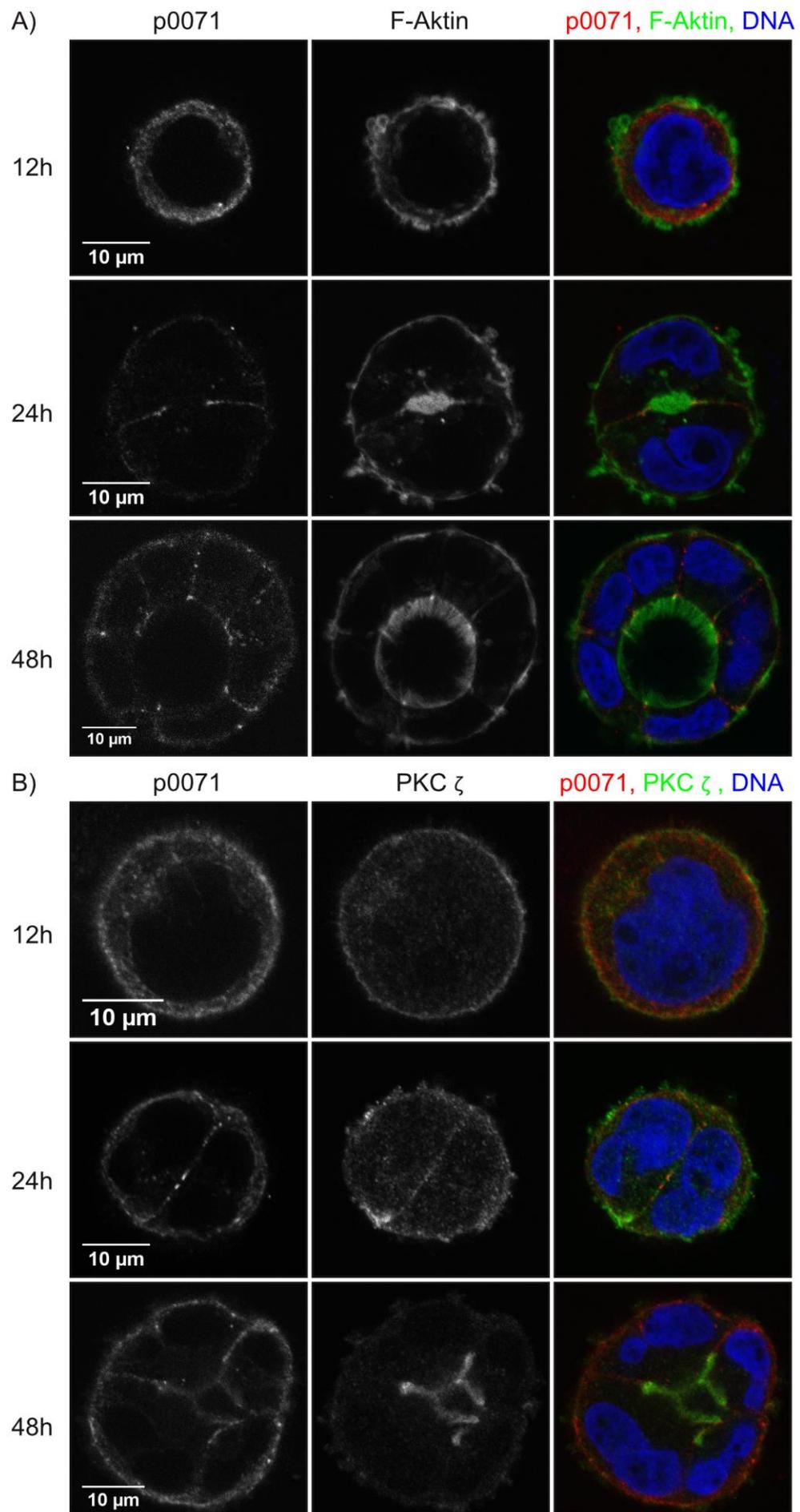


Abb. 2-17: Die p0071 Lokalisation während der Zystenentstehung in Caco-2 Zellen

A) zeigt die Lokalisation von p0071 und F-Aktin während der Zystenbildung. Einzelne Caco-2 Zellen wurden zunächst in die 3D Matrix eingebettet und 12, 24 und 48 Stunden später mit Formaldehyd fixiert. Die dargestellten Bilder zeigen eine Schnittebene der kugelförmigen Zysten. Dies ist möglich durch Verwendung eines Laser-Scanning-Mikroskops.

B) zeigt die Lokalisation von p0071 und dem Polaritätsprotein PKC  $\zeta$  während der Zystenbildung in Caco-2 Zellen, wie unter A) beschrieben.

### 2.13 Der Einfluss von p0071 auf die Zystenbildung von Caco-2 Zellen

Mit Hilfe von Knockdown-Experimenten wurde untersucht, ob die Lumenbildung in den Zysten nach einem p0071 Knockdown gestört ist. Um dies zu analysieren, wurden *Live Cell Imaging* Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Lumenbildung in den für 5 Tage gewachsenen Zysten durch die Zugabe von Cholera toxin in das Medium initiiert. Das Cholera toxin führt zur Aktivierung des cyclischen Adenosinmonophosphat-Signalweges und dieser wiederum zur Aktivierung apikaler Chloridkanäle, die für den Flüssigkeitsstrom in das entstehende Lumen verantwortlich sind und so die Expression des zentralen Lumens in den Zysten vorantreiben. Durch die Cholera toxinzugabe war es möglich den Zeitpunkt der Lumenbildung in den meisten Zysten zu synchronisieren. Die Lumenexpansion wurde an einem Mikroskop mittels Kamertechnik dokumentiert.

Die Ergebnisse belegen, dass die Caco-2 Zellen mit einem stabilen p0071 Knockdown sowie die dazugehörigen Kontroll-Zellen in der Lage waren nach der Cholera toxinstimulation Lumen zu bilden (siehe Abb. 2-18, S. 67). In den p0071 Knockdown-Zysten traten jedoch sehr häufig mehrere kleine Lumen auf und nicht wie bei den Kontroll-Zysten ein zentrales Lumen (siehe Abb. 2-18, S. 67).

Um zu zeigen, dass es sich dabei um einen spezifischen p0071 Effekt handelt, wurden zwei verschiedene p0071 Knockdown Zelllinien für diese Experimente verwendet. Die p0071 Knockdown-Effizienz in den verwendeten Zelllinien wurde mittels Western Blot Analyse untersucht und ist in Abb. 2-15 (S. 59) gezeigt.

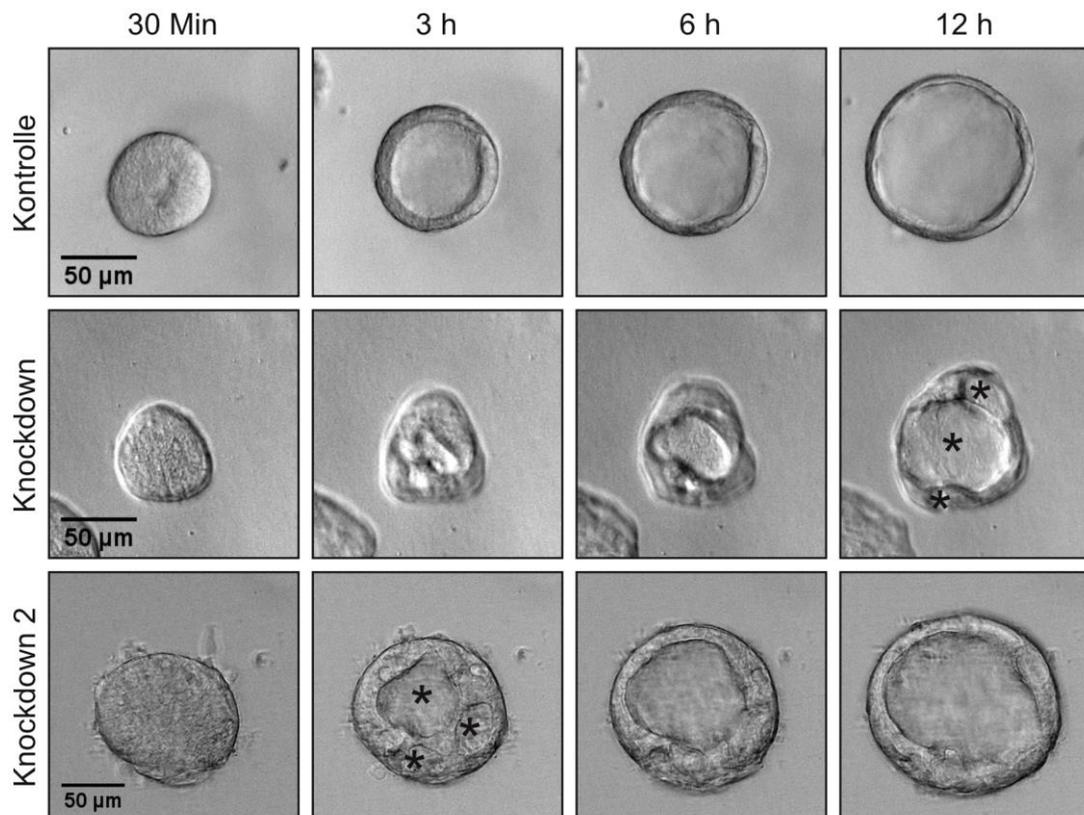


Abb. 2-18: *Live Cell Imaging* der Lumenbildung in Caco-2 Zysten  
 Caco-2 Zysten mit einem stabilen p0071 Knockdown bzw. die Kontrolle wurden durch die Zugabe von 0,1 µg/ml Cholera toxin in das Medium zur Lumenbildung angeregt. Dieser Prozess wurde durch *Live Cell Imaging* am Mikroskop zu den angegebenen Zeitpunkten nach Cholera toxinzugabe dokumentiert. \* markieren multiple Lumen in den Zysten.

Eine quantitative Analyse des Lumenphänotyps ergab eine statistisch signifikante Erhöhung von Zysten mit gestörten Lumen in den p0071 Knockdown-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (siehe Abb. 2-19, S. 68). So wiesen 75% ( $\pm 2\%$ ) bzw. 63% ( $\pm 4\%$ ) aller untersuchten p0071 Knockdown-Zysten einen gestörten Lumenphänotyp auf, im Vergleich zu 24% ( $\pm 2\%$ ) bei den Kontroll-Zellen. Für diese Auswertung wurden in drei unabhängigen Experimenten insgesamt 150 Zysten dahingehen analysiert, ob sie ein zentrales Lumen, multiple Lumen oder gar kein Lumen besitzen. Die Lumen wurden dazu mittels fluoreszenzmarkierten Phalloidin, welches F-Aktin bindet, angefärbt. Zysten mit multiplen Lumen oder gar keinen Lumen wurden dem gestörten Lumenphänotyp zugeordnet. Zudem wurde die Lumengröße stichprobenartig in je 30 verschiedenen Zysten mit p0071 Knockdown oder der Kontrolle vermessen. Dabei ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (siehe Abb. 2-19, S. 68).

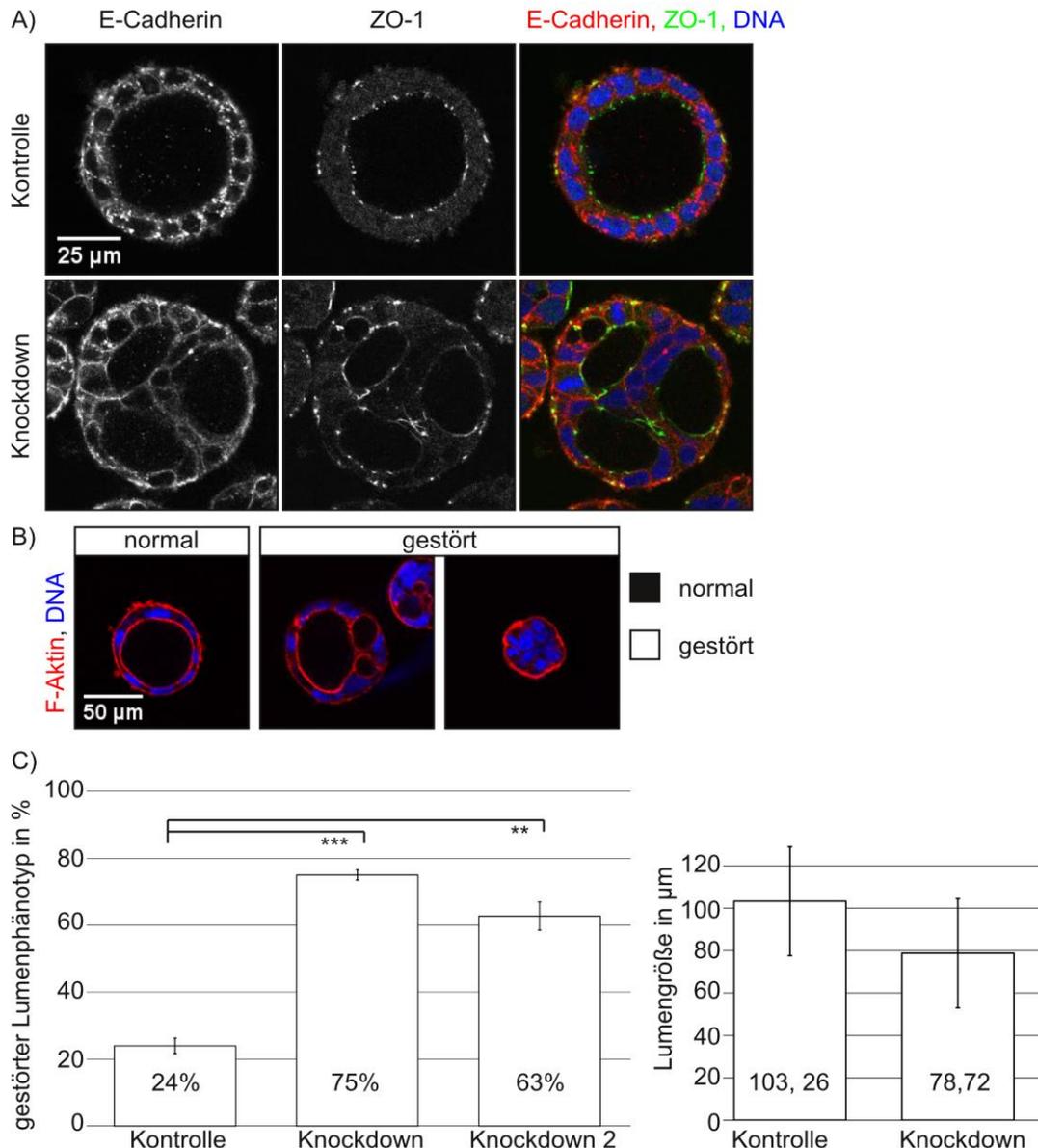


Abb. 2-19: Der Effekt von p0071 auf die Lumenbildung

A) zeigt Immunfluoreszenzstudien zur Lokalisation des apikalen Markers ZO-1 sowie des basolateralen Markers E-Cadherin in Zysten aus Kontroll- bzw. p0071 Knockdown-Zellen.

Der eingezeichnete Maßstab gilt für alle Bilder unter A)

B) zeigt die verschiedenen Arten von Lumenphänotypen in Zysten, die zur Quantifizierung ausgezählt wurden. Dafür wurde in den Zellen mittels Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin F-Aktin angefärbt, das verstärkt am Lumen lokalisiert ist. Als gestört wurden Zysten mit mehreren oder keinem Lumen eingeordnet, als normal Zysten mit einem zentralen Lumen.

Der eingezeichnete Maßstab gilt für alle Bilder unter B)

C) zeigt die quantitative Auswertung des Lumenphänotyps. Die zwei verschiedenen Zelllinien mit einem stabilen p0071 Knockdown zeigten eine statistisch signifikante Erhöhung an Zysten mit einem gestörten Lumenphänotyp im Vergleich zur Kontrolle. \*\*\* bedeutet  $\leq 0,005$ , \*\* bedeutet  $\leq 0,05$ .

D) zeigt die quantitative Auswertung der Lumengröße in den Kontroll- sowie Knockdown-Zysten.

Um zu untersuchen, ob an den multiplen Lumen immer auch die apikalen Marker, wie F-Aktin oder das Tight Junctions Protein ZO-1 lokalisieren, wurden Immunfluoreszenzstudien angefertigt. Diese zeigten eine Fehllokalisierung der apikalen Marker F-Aktin und ZO-1 an den multiplen Lumen (siehe Abb. 2-19, S. 68).

Als mögliche Ursache für die multiplen Lumen wurde eine falsche Orientierung der mitotischen Spindel während der Zellteilung in Betracht gezogen, wie es in Caco-2 Zellen nach einem Cdc42 Knockdown beschrieben ist (Jaffe *et al.*, 2008). Da bei der Zellteilung die apikal-basolaterale Zellpolarität bei der korrekten Orientierung der mitotischen Spindel erhalten bleibt, könnte eine Fehlorientierung der Spindel zu einer falschen apikal-basolateralen Zellpolarität führen und diese neue apikale Membrandomänen definieren, an denen dann Lumen gebildet werden, so dass dadurch Zysten mit multiplen Lumen entstehen können. Aus diesem Grund wurde die Orientierung der mitotischen Spindeln bei der Zystenbildung in den Kontroll- sowie in den p0071 Knockdown-Zellen analysiert. Hierzu wurden in 48 Stunden lang 3D kultivierten Caco-2 Zellen die mitotischen Spindeln durch  $\alpha$ -Tubulin sowie F-Aktin als Marker für das entstehende Lumen angefärbt. In den dokumentierten Immunfluoreszenzstudien wurde anschließend eine Verbindungslinie zwischen den beiden Spindelpolen gezogen. Der Mittelpunkt dieser Verbindungslinie wurde mit einer weiteren Linie mit dem Zentrum der Zyste verbunden, wobei diese Linie die apikal-basolaterale Zellachse widerspiegeln soll. Im Idealfall ergab sich so zwischen diesen beiden Linien ein Winkel von 90 Grad.

Die quantitative Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und p0071 Knockdown-Zellen bezüglich der Orientierung der mitotischen Spindeln (siehe Abb. 2-20, S. 70). Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzstudien fiel jedoch auf, dass der Anteil an Zellen mit multipolaren Spindeln in den Knockdown-Zellen erhöht war. Dies konnte durch eine quantitative Auswertung belegt werden (siehe Abb. 2-20, S. 70). So weisen in den Knockdown-Zellen 31% ( $\pm 4\%$ ) der mitotisch sich teilenden Zellen multipolare Spindeln auf im Vergleich zu 8% ( $\pm 5\%$ ) in den Kontroll-Zellen. Dies stellt einen statistisch signifikanten Unterschied dar (siehe Abb. 2-20, S. 70). Damit konnte gezeigt werden, dass p0071 zwar keinen Einfluss auf die Orientierung bipolarer mitotischer Spindel in den Caco-2 Zellen besitzt, dafür aber auf den Anteil der Zellen mit multipolaren

mitotischen Spindeln. Diese Zellen können sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht korrekt teilen und könnten dadurch zur Etablierung neuer apikaler Membrandomänen innerhalb einer Zyste führen, an denen dann neue, multiple Lumen entstehen.

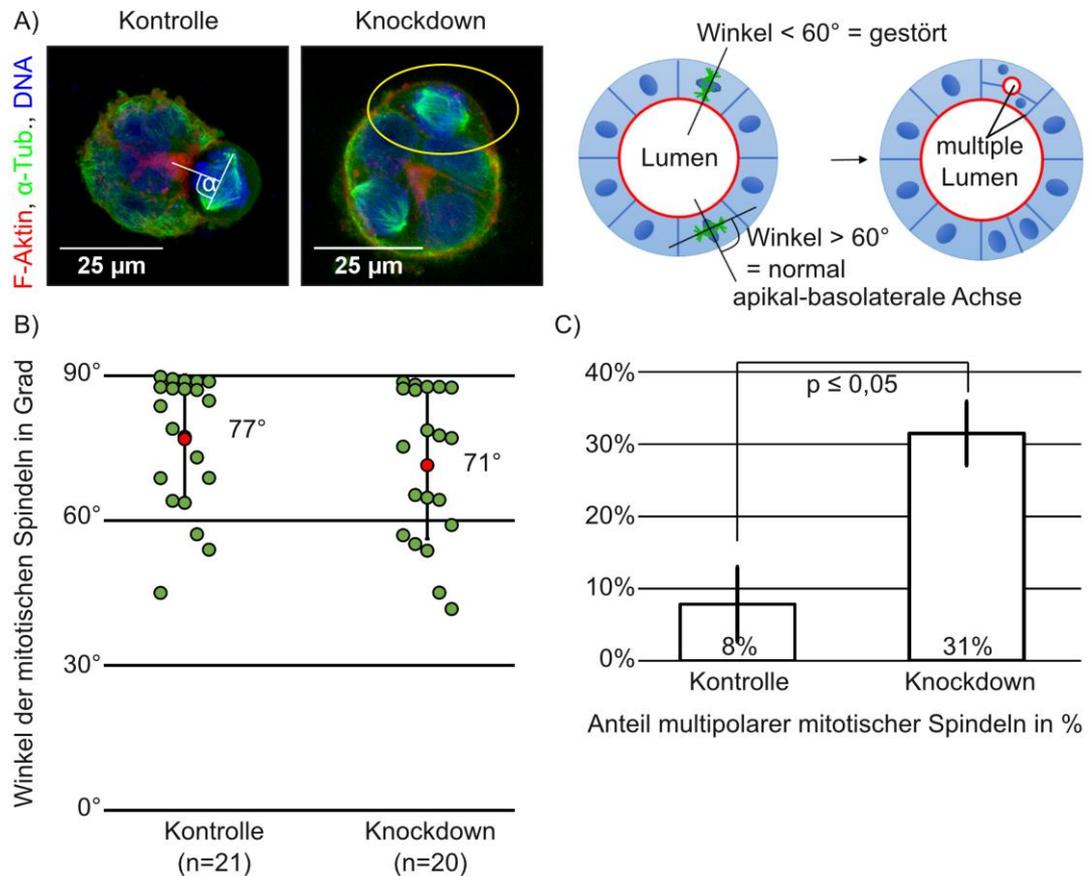


Abb. 2-20: Die Orientierung der mitotischen Spindeln während der Zystenbildung

A) zeigt Zysten, in denen der Winkel der mitotischen Spindeln in Bezug auf die apikal-basolaterale Achse der sich teilenden Zelle bestimmt wurde. Dies ist rechts auch noch mal als Schema aufgezeichnet.  $\alpha$ -Tub. =  $\alpha$ -Tubulin. Die gelbe Ellipse markiert eine Zelle mit einer ausgebildeten multipolaren mitotischen Spindel.

B) zeigt die quantitative Auswertung der bestimmten Winkel der mitotischen Spindeln in den Kontroll- sowie p0071 Knockdown-Zellen. Die Auswertung ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und Knockdown-Zellen. Der rote Datenpunkt stellt den Mittelwert der Messwerte dar. Der genaue Wert des jeweiligen Mittelwertes steht rechts davon. Ausgehend vom Mittelwert wurde die Standardabweichung durch Fehlerbalken eingezeichnet. Die Messwerte sind in grün dargestellt.

C) zeigt die statistisch signifikante Erhöhung des Anteils an Zellen mit multipolaren Spindeln in den p0071 Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Für diese quantitative Auswertung wurden über 100 Zellen mit mitotischen Spindeln in drei unabhängigen Experimenten ausgezählt.

## 2.14 Die Identifizierung neuer p0071 Interaktionspartner

Zur Identifizierung neuer putativer Interaktionspartner für den C-Terminus von p0071 wurde mit diesem Teil des Proteins ein *Yeast Two Hybrid Screening* durchgeführt. Am äußersten C-Terminus besitzt p0071 eine PDZ-Bindedomäne im Gegensatz zum verwandten p120-Catenin. Proteine mit PDZ-Domänen spielen beim Aufbau von verschiedenen Proteinkomplexen eine wichtige Rolle. So besitzen die Polaritätsproteine Par3 und Par6 zum Beispiel bis zu drei PDZ-Domänen und sind für den Aufbau und die Funktion des Par-Polaritätskomplexes essentiell (Lin *et al.*, 2000). Die PDZ-Domäne wurde nach den homologen Domänen in PSD-95 (postsynaptisches Protein), Discs large (*Drosophila melanogaster* Zellpolaritätsprotein) und ZO-1 (Tight Junctions Protein) benannt. Die C-terminale PDZ-Bindedomäne von p0071 wiederum besteht aus den letzten vier Aminosäureresten DSWV und kann Proteine mit einer PDZ-Domäne binden und damit am Aufbau von Proteinkomplexen beteiligt sein (Deguchi *et al.*, 2000; Izawa *et al.*, 2002).

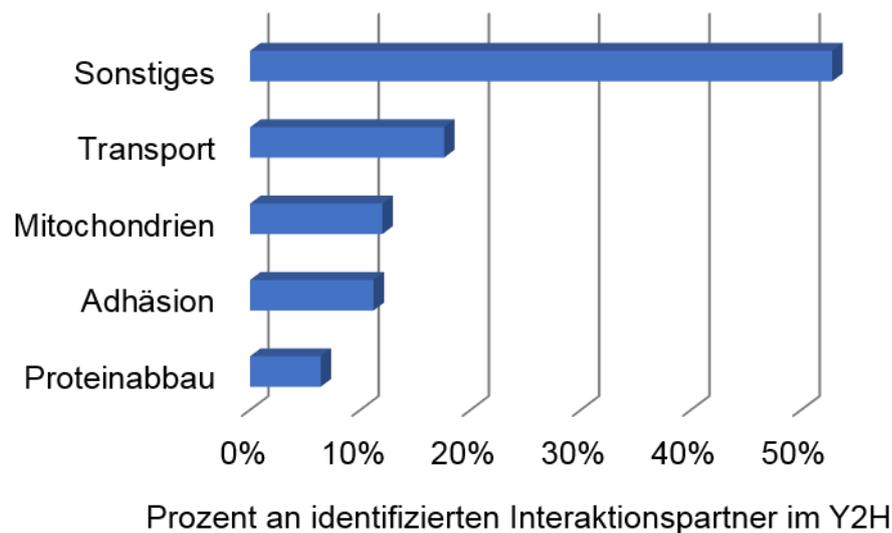


Abb. 2-21: Kategorisierung der im *Yeast Two Hybrid Screening* gefundenen putativen Interaktionspartner für den C-Terminus von p0071

Im Y2H Screening mit dem C-Terminus von p0071 wurden insgesamt 132 neue putative Interaktionspartner gefunden. Diese wurden u. a. mit Hilfe der DAVIS Datenbank analysiert und in verschiedene Kategorien eingeteilt. Der prozentuale Anteil der gefundenen putativen Interaktionspartner an diesen Kategorien ist hier im Diagramm dargestellt.

Der C-Terminus von p0071 wurde zunächst negativ auf Autoaktivität im Y2H Testsystem überprüft. Zur Identifizierung neuer putativer Interaktionspartner wurde im Y2H Screening eine humane cDNA-Bibliothek eingesetzt (siehe Abschnitt 4.3, S. 96). Insgesamt wurden 132 neue mögliche Interaktionspartner für den C-Terminus von

p0071 identifiziert. Die gefundenen putativen Interaktionspartner wurden mit Hilfe der DAVIS Datenbank in verschiedene Kategorien eingeteilt (siehe Abb. 2-21, S. 71). Sehr viele Kandidaten konnte der Kategorie Transport und dort im Speziellen dem ER zum Golgi-Apparat Transport zugeordnet werden. So wurden verschiedene Komponenten des COPII-Komplexes im Y2H Screening gefunden. Der COPII-Komplex spielt beim Transport vom im ER neu synthetisierten Proteinen zum Golgi-Apparat eine wichtige Rolle (Baker *et al.*, 1988).

## 2.15 Die COPII-Komponenten und p0071

Im Y2H Screening wurden als potentielle neue p0071 Interaktionspartner die Sec-Proteine Sec24A, Sec24D und Sec31A gefunden sowie die kleine GTPase Sar1b. Daraufhin wurde zunächst versucht einen funktionellen Zusammenhang zwischen p0071 und den Komponenten des COPII-Komplexes herzustellen. Hierzu wurden p0071 Knockdown-Experimente in transient mit siRNA transfizierten HeLa-Zellen sowie in stabil lentiviral transduzierten MCF-7-Zellen durchgeführt (siehe Abb. 2-22, S. 73). Die MCF-7 Zellen verfügten über einen stabilen p0071 Knockdown bzw. wurden mit einer Kontroll-shRNA lentiviral transduziert. In beiden Zelllinien ist die Lokalisation der Sec-Proteine durch die indirekte Immunfluoreszenzmethode gut zu analysieren. In den Kontroll-Zellen lokalisierten die untersuchten Sec-Proteine perinukleär. Nach einem p0071 Knockdown wirkte diese perinukleäre Anreicherung in den HeLa-Zellen diffuser verteilt (siehe Abb. 2-22, S. 73). In den MCF-7 Zellen war der Unterschied nicht so deutlich zu sehen. Eine Quantifizierung dieser Beobachtung anhand von Immunfluoreszenzbildern gelang nicht.

Parallel durchgeführte Western Blot Analysen zeigten eine Zunahme der Proteinmenge des äußeren Hüllproteins Sec31A nach einem p0071 Knockdown in den HeLa-Zellen. Das innere Hüllprotein Sec24A sowie die kleine GTPase Sar1 schienen hingegen in ihrer Proteinmenge unbeeinflusst nach einem p0071 Knockdown. Somit besitzt p0071 nur einen geringen Einfluss auf die Lokalisation der analysierten COPII-Komponenten sowie auf die Sec31A Proteinmenge.

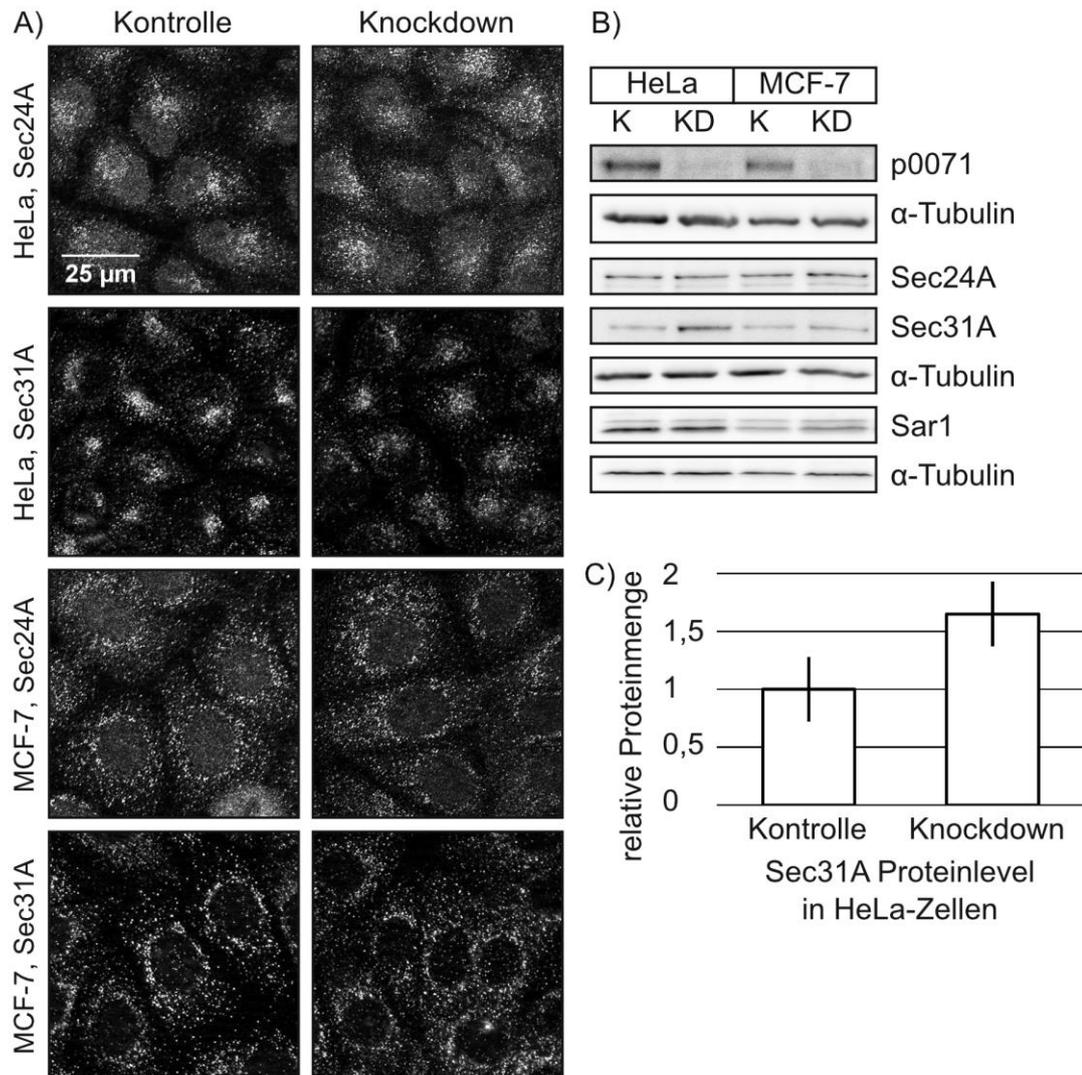


Abb. 2-22: Die Lokalisation und das Proteinlevel einiger COPII-Komponenten nach p0071 Knockdown in HeLa- bzw. MCF-7 Zellen

A) zeigt die Lokalisation von Sec24A und Sec31A einerseits in transient mit siRNA transfizierte HeLa-Zellen sowie andererseits in stabilen MCF-7 Knockdown-Zellen mit den dazugehörigen Kontrollen.

B) zeigt Western Blot Analysen, die u.a. der Bestätigung der p0071 Knockdown (KD) Effizienz dienten sowie der Überprüfung der Proteinlevel der COPII-Komponenten Sec24A, Sec31A und Sar1. Das  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. K = Kontrolle

C) zeigt eine quantitative Auswertung der Proteinmenge von Sec31A in HeLa-Zellen. Diese ergab eine knapp nicht statistisch signifikante Zunahme der Sec31A Proteinmenge nach p0071 Knockdown ( $p = 0,056$ ).

Da als putative Interaktionspartner für p0071 Sec-Proteine der äußeren sowie der inneren COPII-Hülle identifiziert wurden, lag die Vermutung nahe, dass p0071 vielleicht eine Funktion beim Aufbau des COPII-Komplexes besitzt. Um dies zu überprüfen, wurde der Aufbau von COPII-Komplexen an der ER-Membran durch die Inkubation der Zellen mit Nocodazol gestört. Nocodazol wirkt negativ auf die Integrität

des Mikrotubuli-Zytoskeletts, was für den COPII-vermittelten Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat essentiell ist (Ward *et al.*, 2001). Da die COPII-Komponenten nach der Inkubation der Zellen mit Nocodazol nicht länger ihre Funktion beim ER zum Golgi-Apparat Transport ausüben konnten, aggregierten die Sec-Proteine perinukleär (siehe Abb. 2-23, S. 75). Erst nach dem Entfernen vom Nodazol und einiger Zeit zum Rekonstituieren des Mikrotubuli -Zytoskeletts nahmen die Sec-Proteine wieder ihre perinukleäre Anreicherung zu mindestens in den Kontroll-Zellen ein. Nach einem p0071 Knockdown benötigt die Aufhebung der Aggregation der Sec-Proteine mehr Zeit als in den Kontroll-Zellen. Dies liegt augenscheinlich nicht daran, dass das Rekonstituieren des Mikrotubuli -Zytoskeletts in den p0071 Knockdown-Zellen verzögert ist, wie die  $\alpha$ -Tubulin Bilder beweisen (siehe Abb. 2-23, S. 75).

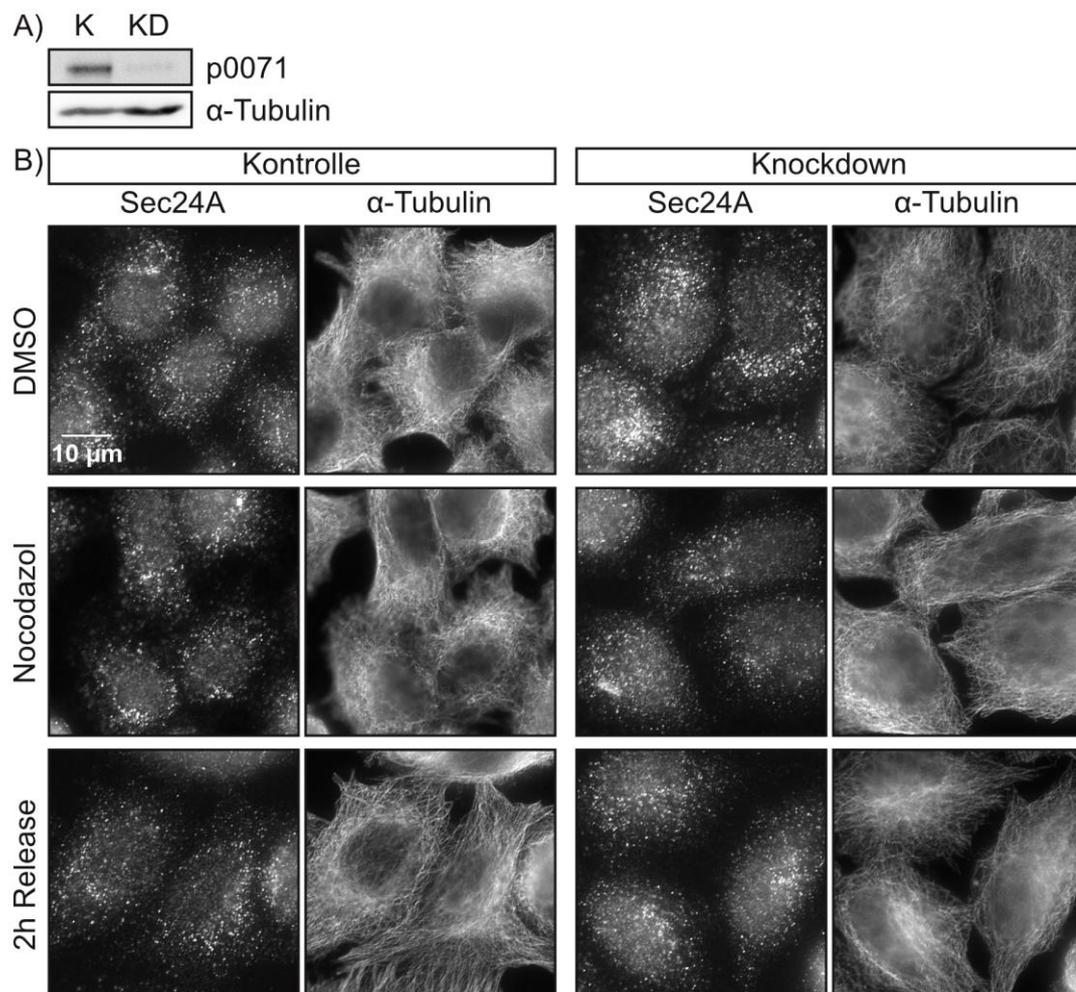


Abb. 2-23: Die Relokalisation der Sec-Proteine nach einem Nocodazol-Release

A) zeigt die Überprüfung der p0071 Knockdown (KD) Effizienz in transient mit siRNA transfizierten HeLa-Zellen, die für das in (B) gezeigte Nocodazol-Release Experiment verwendet wurden. Die siRNA war entweder unspezifisch (= K für Kontrolle) oder gegen p0071 gerichtet (= KD). Das  $\alpha$ -Tubulin diente erneut als Ladekontrolle.

B) zeigt Methanol-fixierte HeLa-Zellen, die 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion entweder eine Stunde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Nocodazol inkubiert wurden. In einem Teil der mit Nocodazol inkubierten Zellen wurde nach der einstündigen Inkubation das Nocodazol durch Waschstschritte entfernt und die Zellen für zwei weitere Stunden in Normalmedium kultiviert, bevor sie durch die indirekte Immunfluoreszenzmethode hinsichtlich der Lokalisation von Sec24A untersucht wurden. Da Nocodazol depolymerisierend auf das Tubulin-Zytoskelett wirkt, wurde dessen Integrität ebenfalls durch die indirekte Immunfluoreszenzmethode sichtbar gemacht.

Das präsentierte Nocodazol-Release Experiment wurde nur in den HeLa-Zellen durchgeführt, die mit siRNA transient transfiziert wurden, weil die perinukleäre Anreicherung der COPII-Komponenten hier am besten zu sehen war.

Aufgrund des eher kleinen Effektes von p0071 auf die Lokalisation der Sec-Proteine sowie auf das Sec31A Proteinlevel fiel es schwer nach diesen Untersuchungen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen p0071 und den COPII-Komponenten zu schließen. Daher wurde mit einem VSVG- sowie Endo H-Test versucht Rückschlüsse auf einen möglichen Einfluss von p0071 auf die Funktion des COPII-Komplexes zu ziehen.

## **2.16 Der VSVG-Transport vom ER zum Golgi-Apparat nach p0071 Knockdown**

Beim VSVG-Test wird eine temperatursensitive Proteinvariante des viralen Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSVG) in Zellen transfiziert. Diese temperatursensitive Proteinvariante vom VSVG kann nach der Synthese im ER nicht korrekt falten, wenn die Zellen bei 40 °C kultiviert werden (Presley *et al.*, 1997). Aufgrund von Kontrollmechanismen im ER aggregiert das falsch gefaltete, neu synthetisierte VSVG-Protein dort bei einer Temperatur von 40 °C. Erst nach dem Temperaturwechsel zu 32 °C kann das VSVG-Protein in den Zellen korrekt falten und das ER in Richtung Plasmamembran verlassen. Der Transport vom ER zum Golgi-Apparat erfolgt für das VSVG-Protein über den COPII-Komplex (Rowe *et al.*, 1996). Daher wurde dieser Test verwendet, um zu untersuchen, ob der Transport vom VSVG-Protein vom ER zur Plasmamembran nach einem p0071 Knockdown gestört ist (siehe Abb. 2-24, S. 77).

Für den Test wurden MCF-7 Zellen, die über einen stabilen p0071 Knockdown verfügen bzw. die dazugehörigen Kontroll-Zellen verwendet. Die Zellen eigneten sich für diesen Test, weil zum einen nur noch eine weitere Transfektion mit einem VSVG-kodierenden Plasmid notwendig war und zum anderen weil in diesen Zellen aufgrund ihrer Größe die Lokalisation von VSVG im ER und an der Plasmamembran gut dokumentiert werden konnte.

Das VSVG konnte einerseits durch einen GFP-Tag (= VSVG-GFP) sichtbar gemacht werden, andererseits durch die indirekte Immunfluoreszenzmethode, bei der ein Antikörper zum Einsatz kam, der die Ektodomäne vom VSVG erkennt. Da die Zellen bei den durchgeführten Experimenten nicht permeabilisiert wurden, konnte dieser Antikörper nur VSVG binden, was an der Plasmamembran lokalisierte.

In den Bildern zu 0 h 32 °C ist die Aggregation von VSVG-GFP im ER nach Inkubation der Zellen über Nacht bei 40°C zu sehen (siehe Abb. 2-24, S. 77). Nach 2 h bei 32 °C lokalisiert das VSVG-GFP zytoplasmatisch und an der Plasmamembran. Der spezifische Nachweis von VSVG an der Plasmamembran gelang zu diesem Zeitpunkt auch mit dem Antikörper, der die Ektodomäne von VSVG erkennt (= ekto-VSVG, siehe Abb. 2-24, S. 77). Durch den VSVG-Test konnten keine markanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und den p0071 Knockdown-Zellen festgestellt werden.

Der Endo H-Test wurde parallel zum VSVG-Test durchgeführt, weil bei diesem Test das im ER neu-synthetisierte VSVG auf seine Sensitivität gegenüber dem Enzym Endo H analysiert wurde. Das Enzym Endo H ist eine Endoglykosidase, die mannose-reiche Zuckerreste an Proteine, wie sie an neu synthetisierten Proteinen im ER verstärkt vorzufinden sind, abspalten kann. Komplexe Zuckerreste an Proteinen, wie sie durch Modifikationen im Golgi-Apparat entstehen, kann das Enzym Endo H nicht abspalten. Dadurch sind Rückschlüsse über den Aufenthalt vom VSVG-Protein in den verschiedenen Zellorganellen zum Zeitpunkt der Analyse möglich.

Für den Endo H-Test wurden Zellysate von MCF-7 Zellen, die zuvor mit VSVG transfiziert wurden, entweder für 3 h mit dem Enzym Endo H inkubiert oder nicht. Proteine, bei denen das Enzym Endo H mannosereiche Zuckerreste abspalten konnte, sind durch ein geringeres Molekulargewicht im Western Blot gekennzeichnet als Proben, die nicht mit dem Enzym inkubiert wurden (siehe Abb. 2-24, S. 77).

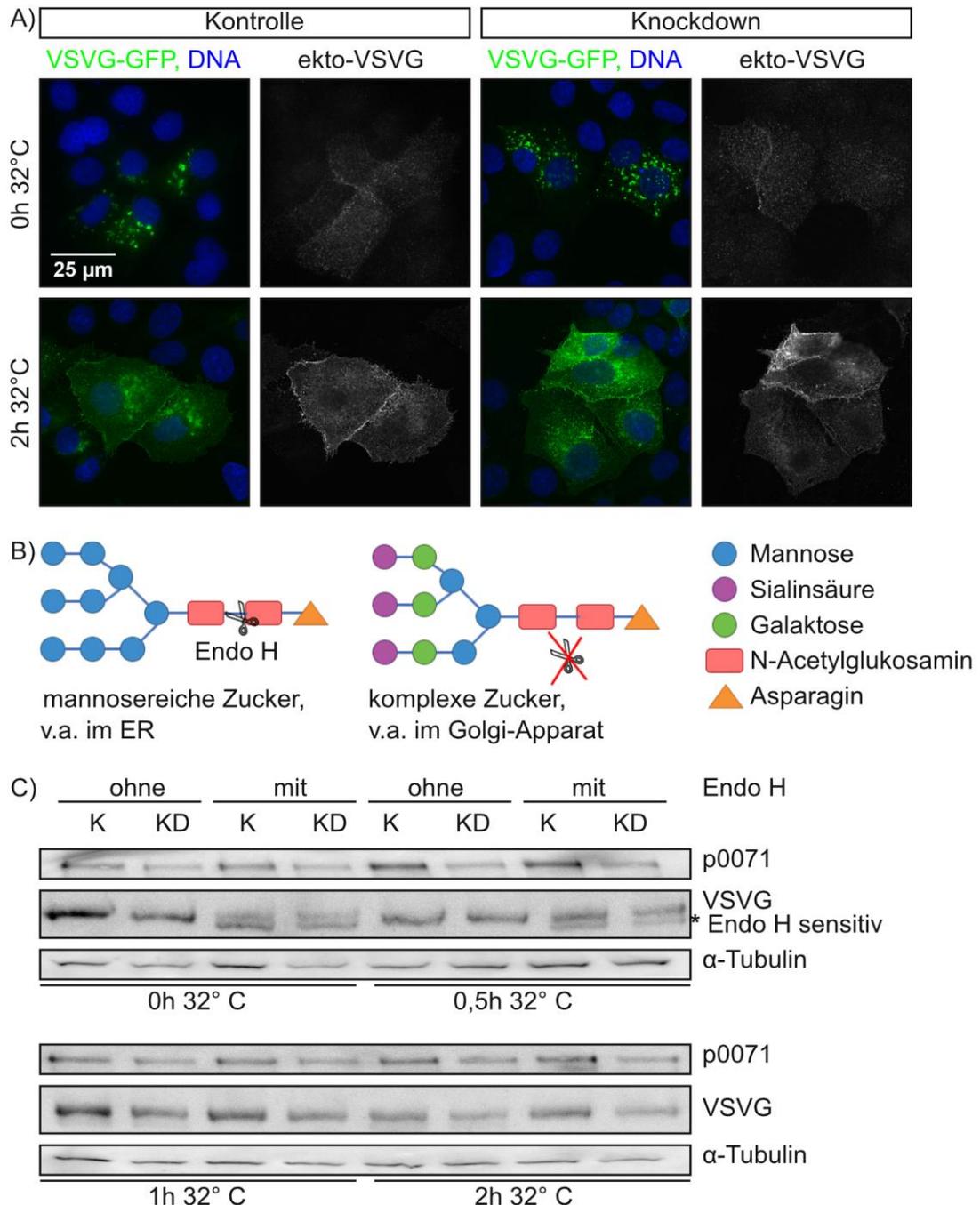


Abb. 2-24: Der VSVG- und Endo H-Test in den stabilen MCF-7 Knockdown-Zellen

A) zeigt die Ergebnisse eines VSVG-Tests. Beim VSVG-Test wurde eine temperatursensitive GFP-getagte Proteinvariante vom viralen Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSVG) zunächst in die hier verwendeten stabilen MCF-7 Knockdown-Zellen transfiziert und die Zellen anschließend über Nacht bei 40 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur kann das im endoplasmatischen Retikulum (ER) neu synthetisierte VSVG-Protein nicht korrekt falten und akkumuliert daher dort. Zu sehen ist dies an den grünen Aggregaten in den Bildern zu 0h 32 °C. Ein Temperaturwechsel zu 32 °C ermöglicht die korrekt Faltung vom VSVG-GFP, was daraufhin das ER Richtung Plasmamembran verlassen kann. An der Plasmamembran lokalisiertes VSVG konnte außer mit dem GFP-Tag auch über einen Antikörper detektiert werden, der gegen die Ektodomäne von VSVG gerichtet ist (ekto-VSVG).

B) zeigt ein Schema, das veranschaulichen soll, dass die Endoglykosidase H (Endo H) nur innerhalb mannosereicher Zuckermodifikationen an Proteinen schneidet, wie sie vor allem an im ER synthetisierten Proteinen zu finden sind. Proteine, die Glykolysierungen mit komplexen

Zuckerresten aufweisen, wie sie vor allem an Proteinen im Golgi-Apparat vorzufinden sind, dienen dem Enzym Endo H nicht länger als Substrat.

C) zeigt die Ergebnisse eines Endo H-Tests. Parallel zum in A) gezeigten VSVG-Test wurden Zelllysate zu den angegebenen Zeitpunkten hergestellt und teils mit dem Enzym Endo H inkubiert, um zu testen, um das neu synthetisierte VSVG-GFP Endo H sensitiv ist. Der Nachweis erfolgte im Western Blot. Von einer Endo H Sensitivität wird gesprochen, wenn Proteinbanden mit einem geringeren Molekulargewicht nach Inkubation mit dem Enzym Endo H auftreten als in den Proben, die nicht mit dem Enzym behandelt wurden. Das geringere Molekulargewicht weist in diesen Fällen darauf hin, dass die Endoglykosidase H mannosereiche Zuckerreste von den Proteinen abspalten konnte. Zur Kontrolle des stabilen p0071 Knockdowns (KD) in den benutzten MCF-7-Zellen wurde das p0071 Proteinlevel ebenfalls im Western Blot analysiert. Das  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle. K = Kontrolle

In den Kontroll- wie auch in den p0071 Knockdown-Zellen verlor sich die Sensitivität gegenüber dem Enzym Endo H innerhalb einer Stunde bei einer 32 °C Inkubation. Das analysierte VSVG-Protein hat also in dieser Zeit mit hoher Wahrscheinlichkeit das ER Richtung Golgi-Apparat verlassen. Erneut konnte kein markanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Knockdown-Zellen festgestellt werden, so dass geschlussfolgert werden kann, dass p0071 keinen stark ausgeprägten Einfluss auf den VSVG-Transport vom ER zum Golgi-Apparat besitzt.

Da mit den gezeigten Experimenten kein eindeutiger funktioneller Zusammenhang zwischen p0071 und den COPII-Komponenten hergestellt werden konnte, wurde auf die Verifizierung der im Y2H Screening gefundenen Interaktionen zwischen diesen Proteine verzichtet.

Weil p0071 kein bisher beschriebenes Transportsignal für den ER zum Golgi-Apparat Transport aufweist und auch nicht zur Gruppe der Plasmamembran- oder zu sekretierenden Proteine gehört, die normalerweise diesen Transportweg verwenden um zu ihrem Zielort zu gelangen, ist es sehr unwahrscheinlich, dass p0071 die verschiedenen im Y2H Screening gefundenen Sec-Proteine und die GTPase Sar1 bindet, um selber transportiert zu werden. Jedoch konnten die durchgeführten Experimente keinen Hinweis zu einer wichtigen Funktion von p0071 beim Aufbau oder der Funktion des COPII-Komplexes liefern, so dass die Zukunft zeigen wird, ob p0071 für den ER zum Golgi-Apparat Transport von Bedeutung ist.

### 3 Diskussion

Für das Armadilloprotein p0071 konnte ein Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakte, auf die Rho-GTPase RhoA sowie auf den Rab11-vermittelten Vesikeltransport zur Zellmembran gezeigt werden (Keil *et al.*, 2014; Setzer *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2006). Diese Faktoren sind bei der Ausbildung der Zellpolarität von Bedeutung, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals die Auswirkungen von p0071 auf die Zellpolarität nähergehend untersucht wurden. Die erlangten Erkenntnisse zeigen eine Beteiligung von p0071 an der Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität und werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### 3.1 p0071 als Adherens Junctions Komponente

Für p0071 konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass es ähnlich schnell wie p120, E-Cadherin und P-Cadherin an der Plasmamembran lokalisiert, um an der *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung mitzuwirken (siehe Abb. 2-4, S. 35). Die Desmosomen bildeten sich im verwendeten Zellmodell dabei erst nach den Adherens Junctions, wie es bereits von O'Keefe *et al.*, 1987 publiziert wurde. Die Ergebnisse belegen somit, dass die verwendeten Mauskeratinozyten ein geeignetes Modell für Untersuchungen bezüglich der *de novo* Zell-Zell-Kontaktbildung sind. Aufgrund dessen und wegen der besseren DNA-Transfektionseffizienz wurden die meisten Experimente bezüglich der Untersuchungen an Zell-Zell-Kontakten in den Mauskeratinozyten durchgeführt und nicht in den HaCaT-Zellen.

Da sich ohne Adherens Junctions auch keine Desmosomen bilden (siehe Abb. 2-7, S. 40), besitzen die Adherens Junctions eine signalgebende Wirkung, mit der sie die weitere Assemblierung der Zell-Zell-Kontakte regulieren (Michels *et al.*, 2009). Diese Wirkung besitzt p0071 als Adherens Junctions Komponente ebenfalls, weil nach einem p0071 Knockdown in den Mauskeratinozyten die weitere Zell-Zell-Kontaktbildung verzögert ist (siehe Abb. 2-6, S. 39).

Die Knockdown-Experimente in den Mauskeratinozyten zeigen, dass die Adherens Junctions und Desmosomen vor allem nach einem p120 Knockdown beeinflusst waren (siehe Abb. 2-7, S. 40). Dies kann darin begründet sein, dass mehr p120 als p0071 in den Mauskeratinozyten vorkommt. Das „wenige“ p0071 also den Verlust

von p120 hier nicht kompensieren kann, aber das „viele“ p120 den Verlust von p0071 nach Knockdown.

Die Mauskeratinozyten, in denen hingegen beide Cadherine durch siRNAs in ihren Proteinleveln herunterreguliert waren, zeigten eine spindelförmige Zellmorphologie, wie dies auch bei den undifferenzierten Mauskeratinozyten zu beobachten ist (Vergleich Abb. 2-10, S. 47 mit Abb. 2-5, S. 37). Solch ein gravierender Effekt konnte nach einem Doppelknockdown von p0071 zusammen mit p120 nicht festgestellt werden, obwohl auch hier so gut wie keine Cadherine mehr an der Zellmembran benachbarter Zellen nachweisbar waren. Dies könnte u. a. durch die unterschiedliche Knockdown-Effizienz bedingt sein. So verändert der direkte Cadherin-Knockdown die Zellmorphologie, wohingegen der Catenin-Knockdown nicht die Bildung von Adherens Junctions an der Plasmamembran zwischen benachbarten Zellen verhindert, aber die Cadherinstabilität in diesem Komplex deutlich verringert. Auf diese Weise wird die Zell-Zell-Kontaktbildung gestört, jedoch bleibt die Zellmorphologie dadurch unbeeinflusst.

Die stark beeinflussten Zell-Zell-Kontakte nach einem p120 Knockdown sowie Cadherin-Doppelknockdown sind auch die Ursache für die verringerte interzelluläre Adhäsion in diesen Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (siehe Abb. 2-8, S. 43 und Abb. 2-11, S. 49). Dass der alleinige E-Cadherin oder P-Cadherin Knockdown nicht die interzelluläre Adhäsion reduziert, liegt höchstwahrscheinlich an dem noch nachweisbaren Anteil von p0071 und Desmoplakin an der Plasmamembran in diesen Knockdown-Zellen (siehe Abb. 2-10, S. 47). Die Membranassoziation von p0071 trotz fehlender Cadherine kann durch die direkte Interaktion mit Desmoplakin erklärt werden (Calkins *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2004). Beide Proteine stabilisieren sich an der Plasmamembran gegenseitig und führen so zur Ausbildung von Desmosomen, die die interzelluläre Adhäsion stärken.

Der nicht gravierende Effekt auf die Zell-Zell-Kontakte eines alleinigen p0071 Knockdowns kann, wie bereits angeführt, auf eine Kompensation des Effektes durch p120 erklärt werden. Solch eine Fähigkeit konnte für E- und P-Cadherin bereits durch verschiedene Experimente belegt werden. So verhindert die Kombination von Antikörpern, die gegen E- und P-Cadherin gerichtet sind, die Bildung von Adherens Junctions und Desmosomen in humanen Keratinozyten. Der alleinige Einsatz von E-Cadherin spezifischen Antikörpern verzögerte dagegen lediglich die Bildung der Zell-

Zell-Kontakte (Lewis *et al.*, 1994), wie es in den Mauskeratinozyten auch nach einem p0071 Knockdown zu sehen ist (siehe Abb. 2-6, S. 39). Schon damals wurde angenommen, dass P-Cadherin die Funktion von E-Cadherin bis zu einem gewissen Grad übernehmen kann. Dies wurde später durch den Nachweis eines erhöhten P-Cadherin Proteinlevels in hautspezifischen E-Cadherin Knockout Mäusen bestätigt (Tinkle *et al.*, 2004; Tunggal *et al.*, 2005).

In weiterführenden Experimenten wurde in einem hautspezifischen E-Cadherin Knockout Mausstamm zusätzlich P-Cadherin durch RNAi-Technologie in seinem Proteinlevel herunterreguliert (Tinkle *et al.*, 2008). Proben von der Epidermis dieser Tiere zeigten keine Veränderungen auf der Proteinebene für die desmosomalen sowie die Tight Junctions Proteine. Die Lokalisation der untersuchten Zell-Zell-Kontaktproteine sowie deren Funktion war jedoch beeinträchtigt, aufgrund dessen die Cadherin-defizienten Tiere innerhalb von 1-2 Stunden nach der Geburt starben, da keine intakte epidermale Barriere vorhanden war, die sie vor der Dehydration schützen konnte (Tinkle *et al.*, 2008).

Darüber hinaus wurde die Lokalisation der Polaritätsproteine Par3, aPKC und Scribble in der Epidermis der Cadherin-defizienten Tiere analysiert und u. a. mit der Epidermis von Tieren mit einem hautspezifischen E-Cadherin Knockout verglichen. Es zeigte sich, dass bei den Cadherin-defizienten Tieren die genannten Polaritätsproteine nicht länger an der Zellmembran in den verschiedenen epithelialen Zellschichten lokalisierten, sondern diffus im Zytoplasma auftraten (Tinkle *et al.*, 2008). Diese zytoplasmatische Lokalisation war weder in der Epidermis von Tieren mit einem hautspezifischen E-Cadherin Knockout noch in der Kontrolle zu sehen. Somit scheinen die klassischen Cadherine E- und P-Cadherin für die korrekte Lokalisation der Polaritätsproteine in der Epidermis notwendig zu sein und damit einen Einfluss auf die Ausbildung der Zellpolarität zu besitzen. Bezieht man diesen Befund nun auf die hier präsentierten Ergebnisse nach dem p120 Knockdown, wonach eindeutig die Lokalisation der Cadherine an der Zellmembran vermindert ist und damit deren membranständige Funktion, so hat p120 darüber womöglich auch einen Einfluss auf die Zellpolarität. Diese Fähigkeit könnte zu einem gewissen Grad auch von p0071 übernommen werden.

Aufgrund der vergleichbaren Lokalisationsmuster zwischen P-Cadherin und p0071 in der Basalzellschicht der Haut wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Adherens Junctions Komplexe dort vor allem aus diesen beiden Proteinen aufgebaut sein könnten. Diese Hypothese sollte durch Immunpräzipitationen mit humanen wie murinen Keratinozyten untermauert werden (siehe Abb. 2-2, S. 30 und Abb. 2-3, S. 31).

Für Adherens Junctions Komplexe, die P-Cadherin als Komponente enthalten, kann aufgrund von Problemen mit den verwendeten P-Cadherin Antikörpern, die trotz Optimierungsversuchen nicht gelöst werden konnten, keine Aussage über den molekularen Aufbau getroffen werden. Stattdessen gelang der Nachweis der Bindung zwischen E-Cadherin und beta-Catenin mit p0071 oder p120 – dies unabhängig von der verwendeten Zelllinie. Somit unterscheiden sich die Adherens Junctions Komplexe nicht zwischen humanen und murinen Keratinozyten.

Bezüglich VE-Cadherin wurde gezeigt, dass p0071 und p120 an der gleichen Stelle innerhalb der Juxtamembranregion von dem Cadherin binden (Calkins *et al.*, 2003). Dazu wurden Punktmutationen in dieser Region eingefügt und überprüft, ob die beiden Catenine trotzdem weiterhin binden können. Als positive Bindungskontrolle wurde  $\beta$ -Catenin benutzt, welches die klassischen Cadherine außerhalb der Juxtamembranregion bindet. Da diese Region innerhalb der klassischen Cadherine stark konserviert ist (Nanes *et al.*, 2012), wird davon ausgegangen, dass die beiden Catenine p0071 und p120 auch am E- und P-Cadherin um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Dafür spricht, dass in den p0071 Immunpräzipitationen kein p120 nachweisbar war und umgekehrt genauso, die beiden Catenine also nicht im gleichen Komplex vorkommen. Dieser Fakt belegt, dass verschiedene Adherens Junctions Komplexe in den Keratinozyten und damit auch sehr wahrscheinlich in der Haut vorkommen.

Die Bindung der Catenine an E-Cadherin war bereits in den unstimulierten Mauskeratinozyten, die noch über keine Zell-Zell-Kontakte verfügten, nachweisbar, so dass sich der Komplex entweder im für die Immunpräzipitation verwendeten Zelllysat gebildet hat oder die Komponenten bereits vor bzw. beim Transport zur Zellmembran assoziieren. Solche Komplexe können in den Immunfluoreszenzstudien mit den unstimulierten Mauskeratinozyten nicht beobachtet werden (siehe Abb. 2-4, S. 35). Gegen eine Assoziation der Komponenten vor dem Transport zur Zellmembran spricht jedoch, dass p120 erst an der Zellmembran E-Cadherin bindet und nicht schon im

endoplasmatischen Retikulum, wie es für  $\beta$ -Catenin beschrieben ist (Chen *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2003).

Den in der Haut mutmaßlich vorkommenden unterschiedlichen Adherens Junctions Komplexen werden verschiedene Funktionen zugesprochen. So wird angenommen, dass die P-Cadherin vermittelten Adherens Junctions das Herauflösen der Zellen aus der Basalzellschicht und damit ihre Differenzierung zu superfiziellen, kernlosen Korneozyten verhindern. Im Gegensatz dazu weisen die Keratinozyten der anderen epithelialen Zellschichten E-Cadherin als Adherens Junctions Komponente auf, was die Differenzierung zu superfiziellen, kernlosen Korneozyten ermöglicht (Lenox *et al.*, 2000).

Aufgrund seines zu P-Cadherin vergleichbaren Lokalisationsmuster ist für p0071 auch eine Funktion als Differenzierungsmarker, wie sie für P-Cadherin diskutiert wird, denkbar. Als zytoplasmatisches Protein, welches P-Cadherin binden kann, könnte es an der Regulation von Signalwegen beteiligt sein, die wiederum den Differenzierungszustand der Keratinozyten regulieren, wie zum Beispiel der EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-Signalweg sowie der Calciumrezeptor-Signalweg (Hennings *et al.*, 1980; Rheinwald *et al.*, 1980).

Eine Zunahme des p0071 Proteinslevels wie es für den Differenzierungsmarker Villin in den untersuchten Caco-2 Zellen zu beobachten ist (siehe Abb. 2-13, S. 56), war jedoch weder in den Mauskeratinozyten noch in den Caco-2 Zellen während der Differenzierung nachweisbar. Lediglich in der humanen HaCaT-Zelllinie nahm das p0071 Proteinlevel während der Differenzierung zu (siehe Abb. 2-12, S. 52), was durch das unterschiedliche Differenzierungspotential der beiden Keratinozyten-Zelllinien begründet sein könnte. So weisen die HaCaT-Zellen von Anfang an Zell-Zell-Kontakte auf, wohingegen sie in den Mauskeratinozyten erst ausgebildet werden müssen.

Die ebenfalls untersuchten desmosomalen Proteine zeigten in beiden analysierten Keratinozyten-Zelllinien eine Zunahme ihrer Proteinlevel während des Differenzierungsprozesses. Die Keratinozyten bilden also vermehrt desmosomale Proteine während der Differenzierung und es gilt anzunehmen, dass diese für die Desmosomenbildung eingesetzt werden. Stärker ausgebildete Zell-Zell-Kontakte wiederum stellen einen erhöhten Differenzierungsgrad gegenüber den undifferenzierten Zellen ohne Zell-

Zell-Kontakte dar. Somit handelt es sich bei den untersuchten desmosomalen Proteinen um Marker für den Differenzierungsprozess in Keratinozyten.

Mit Hilfe der Keratinozyten konnten zudem hier erstmals proteinspezifische Besonderheiten von p120 und p0071 aufgezeigt werden:

So bedingt ein p120 Knockdown einerseits eine verringerte Menge an E- und P-Cadherin an der Plasmamembran, andererseits verringert sich die Gesamtproteinmenge der Cadherine und von  $\beta$ -Catenin – unabhängig von der verwendeten Keratinozyten-Zelllinie (siehe Abb. 2-9, S. 44). Dieser Sachverhalt wurde nach einem p0071 Knockdown nicht beobachtet.

Die Regulation der Cadherinstabilität an der Plasmamembran stellt somit eine p120 spezifische Funktion dar, die von p0071 nicht wahrgenommen wird. Dieser Unterschied könnte in den unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen der beiden miteinander verwandten Proteine liegen. So ist bekannt, dass bestimmte Tyrosinphosphorylierungen an p120 seine Affinität gegenüber den Cadherinen erhöhen und andere Phosphorylierungen die Affinität senken, so dass dann z. B. die E3-Ubiquitinligase Hakai an die Cadherine binden kann und sie für den proteosomalen Abbau markiert (Alema *et al.*, 2007; Hartsock *et al.*, 2012).

Andererseits regulieren die Cadherine die Membranlokalisation von p120 (siehe Abb. 2-10, S. 47) (Thoreson *et al.*, 2000), so dass ein positiver Feedback-Loop zwischen p120 und den klassischen Cadherinen besteht. Eine solche Beobachtung wurde für p0071 nicht gemacht. Stattdessen tragen p0071 und Desmoplakin durch ihre Membranassoziation verstärkt zur interzellulären Adhäsion bei, wenn einzelne Cadherine herunterreguliert sind.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die Herunterregulation von E-Cadherin zu Verzögerungen bei der Adherens Junctions Bildung führt und dies hier auch erstmals für p0071 in den murinen Keratinozyten gezeigt werden konnte (siehe Abb. 2-5, S. 37). Da aber in beiden Fällen die Adherens Junctions Bildung trotz zeitlicher Verzögerung weiterhin möglich ist, kann davon ausgegangen werden, dass andere Proteine in den Keratinozyten ihre Funktionen zu einem gewissen Maß übernehmen können. Im Fall von E-Cadherin wurde eine Kompensation durch P-Cadherin bereits gezeigt (Tinkle *et al.*, 2004; Tunggal *et al.*, 2005), im Fall für p0071 könnte p120 das entsprechende Protein sein.

### 3.2 Der Einfluss von p0071 auf die apikal-basolaterale Zellpolarität

Die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität wurde in Caco-2 Zellen untersucht mit dem Ergebnis, dass diese Zellen bei der 3D Zellkultivierung Zysten mit multiplen Lumen bilden aufgrund einer gestörten Zellpolarität. Dies kann unterschiedliche Gründe haben, so bilden Caco-2 Zellen auch nach einem Rab11 Knockdown Zysten mit multiplen Lumen (Gao *et al.*, 2010). Als Ursache werden Störungen bei Transportprozessen angeführt, da an den multiplen Lumen apikale Marker lokalisieren, wie es auch in den p0071 Knockdown Zysten zu sehen ist (siehe Abb. 2-19, S. 68). Es werden also Stellen mit einer neuen apikalen Membrandomäne definiert, wenn p0071 oder Rab11 in ihrer Funktion gestört sind. Dies ist sehr wahrscheinlich auf ihre Funktionen an den Adherens Junctions zurückzuführen, die wiederum die Lokalisation der Polaritätskomplexe beeinflussen und darüber die apikalen sowie basolateralen Membrandomänen indirekt mitdefinieren (Navarro *et al.*, 2005). Die Lokalisation der Adherens Junctions Komponente E-Cadherin sieht zwar in den Caco-2 Zysten zwischen den Knockdown- und Kontroll-Zellen nicht stark verändert aus (siehe Abb. 2-19, S. 68). Dies sagt aber nichts über die Funktionalität der Adherens Junctions bezüglich der Organisation der Zellpolarität aus.

Auffällige Störungen bei der Organisation des Akinzytoskeletts in den p0071 Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle wurden hingegen nicht bemerkt. Hieraus hätte auf eine Regulation von RhoA durch p0071 geschlossen werden können.

Im Zuge der Anfertigung dieser Arbeit wurden Caco-2 Zellen mit einem stabilen Rab11 Knockdown generiert, die bei der 3D Zellkultivierung Zysten mit multiplen Lumen bildeten. Anschließend waren Rescue-Experimente geplant, jedoch wiesen zu wenige Zellen nach der transienten DNA-Transfektion und 5-tägiger 3D Kultivierung eine grüne Fluoreszenz auf, die die exogene Expression von p0071 anzeigte, so dass eine Quantifizierung des Lumenphänotyps nicht möglich war.

Die bekannte Interaktion zwischen p0071 und Rab 11 (Keil *et al.*, 2014) kann auch für die Erklärung der erhöhten Anzahl an multipolaren mitotischen Spindeln nach einem p0071 Knockdown herangezogen werden (siehe Abb. 2-20, S. 70). So wurde gezeigt, dass Rab11 für den Transport von Proteinen, die für den Spindelpolaufbau und -reifung notwendig sind, verantwortlich ist (Hehnly *et al.*, 2014). Dazu wurden u. a. Knockdown-Experimente durchgeführt und die Rab11 positiven Endosomen an den

Spindelpolen isoliert und bezüglich ihrer Zusammensetzung analysiert. Vorstellbar ist somit, dass das Fehlen von p0071 in den Caco-2 Zellen die Funktion von Rab11 beeinträchtigt und damit der Spindelaufbau gestört wird. Diese Störung führt dann zur Ausbildung multipolarer mitotischer Spindeln in den betroffenen Zellen.

Das p0071 keinen Einfluss auf die Orientierung der bipolaren mitotischen Spindeln in den Caco-2 Zysten besitzt, überrascht, da für verschiedene Polaritätsproteine eine solche Wirkung beschrieben ist und eine Fehlregulation derselbigen zu Zysten mit multiplen Lumen führt (Durgan *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2010). Vielleicht sollte dieser Sachverhalt noch in einer anderen Zelllinie untersucht werden, um zu überprüfen, ob dort ebenfalls kein Einfluss von p0071 auf die Orientierung der bipolaren mitotischen Spindeln nachweisbar ist.

Ein gestörter Lumenphänotyp bei der 3D Zellkultivierung nach einem p0071 Knockdown wurde auch in der humanen Colonkarzinomzelllinie T84 beobachtet. Dort bildeten sich irregulär geformte Zysten mit einem deutlich kleineren Lumen als bei den Kontroll-Zellen (Medvetz *et al.*, 2012). In diesem Kontext wird darauf verwiesen, dass p0071 mit dem Protein Follikulin einen Komplex bildet und der Knockdown von Follikulin ebenfalls die Lumenbildung stört, so dass geschlossen wird, dass der p0071-Follikulin-Komplex für Störungen bei der Zellpolarität verantwortlich ist (Medvetz *et al.*, 2012). Der weitere genaue molekulare Mechanismus dahinter ist bis jetzt nicht verstanden und es ist daher auch nicht möglich Parallelen zu ziehen zu dem hier vorgestellten Phänotyp in den Caco-2 Zellen.

Auf den Vorgang und die Effizienz der Lumenbildung besitzt p0071 keinen Einfluss, wie u. a. die *Live Cell Imaging* Experimente gezeigt haben. Das bedeutet, dass apikal lokalisierenden Ionenkanäle unabhängig von p0071 funktionieren.

Die einmalig durchgeführten Experimente mit dem neuartigen Biochip aus der Arbeitsgruppe von Prof. Otmar Huber zeigten einen Einfluss von p0071 auf die gebildete „Gewebestruktur“ nach 7- sowie 14-tägiger Kultivierung. Nicht nur die Organisation des Zellverbandes an sich, sondern auch die Lokalisation verschiedener Zell-Zell-Kontaktproteine war nach einem p0071 Knockdown beeinträchtigt. Es wird vermutet, dass die veränderte Lokalisation der Zell-Zell-Kontaktproteine dazu führt, dass die interzelluläre Adhäsion nicht normal ausgeprägt ist und so nach einem p0071 Knockdown der generelle Eindruck eines weniger strukturierten Zellverbandes

entsteht. Die veränderte Lokalisation der Zell-Zell-Kontaktproteine könnte auch die beeinträchtigte Lokalisation vom Polaritätsprotein PKC  $\zeta$  erklären, da der Par-Komplex direkt an Zell-Zell-Kontakte lokalisiert (Ebnet *et al.*, 2001).

Generell stellt der verwendete Biochip eine gute Alternative zur 2D Zellkultur dar, weil die Analyse der Proteinmengen nach einer 14-tägigen Kultivierungszeit das Vorhandensein zweier p120 Isoformen zeigte (siehe Abb. 2-16, S. 63), wie sie bei der 2D Zellkultur erst nach 21 Tagen Kultivierungszeit zu sehen war (siehe Abb. 2-13, S. 56). Somit ist davon auszugehen, dass die Differenzierung der Zellen auf dem Biochip deutlich schneller voranschreitet als bei der 2D Zellkultur.

Da für die Bildung eines intakten Zellverbandes die Ausbildung der richtigen Zellpolarität unerlässlich ist, u. a. damit sich die Zellen innerhalb des homogenen Zellverbandes richtig orientieren und eingliedern, beweisen die Ergebnisse der Biochip-Proben, dass p0071 darauf einen Einfluss in Caco-2 Zellen besitzt.

Die durchgeführten Experimente mit den Caco-2 Zellen in der 2D Zellkultur zeigen hingegen, dass p0071 einen Einfluss auf die Lokalisation verschiedener desmosomaler Proteine an der Plasmamembran hat und darüber die interzelluläre Adhäsion beeinflusst (siehe Abb. 2-15, S. 59). Dieser Effekt kann durchaus direkt vermittelt sein, da p0071 eine Bindestelle für das desmosomale Protein Desmoplakin besitzt (Calkins *et al.*, 2003; Setzer *et al.*, 2004). Fehlt nun p0071 in den Caco-2 Zellen, lokalisiert Desmoplakin nicht mehr effizient an der Plasmamembran, so dass auch die Verbindung zwischen den Desmosomen und den Intermediärfilamenten gestört ist. Folgend daraus sind die desmosomalen Cadherine Desmocollin und Desmoglein nicht mehr gut an der Plasmamembran verankert, was eine reduzierte interzelluläre Adhäsion nach sich zieht (siehe Abb. 2-15, S. 59).

Die Orientierung der Zellpolarität ist bei der 2D Kultivierung der Caco-2 Zellen mit einem p0071 Knockdown nicht gestört. Dies wurde mit unterschiedlichen apikalen und basolateralen Markern gezeigt (siehe Abb. 2-14, S. 57). Und auch die Differenzierung in hochprismatische Enterozyten ist nach einem p0071 Knockdown unbeeinflusst. So erreichten die Zellen während der 21-tägigen Differenzierung eine vergleichbare Höhe zu den Kontroll-Zellen, die mit einer unspezifischen shRNA lentiviral transfiziert waren (Abb. 2-14, S. 57).

Für diese Experimente wurden die Caco-2 Zellen auf permeablen Filtermembranen kultiviert, die mit Collagen beschichtet waren. Da auch die extrazelluläre Matrix einen Einfluss auf die Ausprägung der Zellpolarität besitzt, könnte mit diesem Ansatz womöglich die Funktion von p0071 bei diesem Prozess nicht zum Vorschein gekommen sein. Vorstellbar ist, dass p0071 in Analogie zu seiner Funktion bei der Zytokinese die Aktivitätslevel der Rho-GTPasen während der Ausbildung der Zellteilung beeinflusst. Da für die Rho-GTPase Rac1 bekannt ist, dass sie die Orientierung der Zellpolarität in MDCK-Zellen über eine Interaktion mit Integrinen festlegt (Martin-Belmonte *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2001), könnte p0071 z. B. über diesen Signalweg die Zellpolarität beeinflussen.

Es wurde während der Anfertigung der Arbeit versucht die Aktivitätslevel der Rho-GTPase in den p0071 Knockdown-Zellen sowie in den dazugehörigen Kontrollzellen zu bestimmen. Verschiedene Versuchsanordnungen führten jedoch zu keinen reproduzierbaren und damit aussagekräftigen Ergebnissen. Zu bedenken ist hierbei, dass die Rho-GTPasen oftmals lokal reguliert werden und es daher fraglich ist, ob mit dem verwendeten GST-Pulldown-Aktivitätsassay solche lokalen Veränderungen nachweisbar wären.

Generell haben die durchgeführten Experimente gezeigt, dass die Ergebnisse aus den 2D Zellkulturexperimenten nicht ohne Einschränkungen auf die 3D Zellkulturexperimente übertragbar sind. Dies kann damit begründet werden, dass die Geschwindigkeiten der Prozesse, die zum Ausbilden der apikal-basolateralen Zellpolarität führen, sich zwischen der 2D und 3D Kultivierungsmethode unterscheiden. So ist eine einzelne Zelle, die in einer 3D Matrix eingebettet wird anderen Signalen ausgesetzt, als dies in der 2D Zellkultur der Fall ist. Dies liegt zum einen an den verwendeten Materialien – komplex zusammengesetzte basalmembran-ähnliche 3D Matrix versus in 2D Collagen beschichtete Filtermembranen – zum anderen an der eingesetzten Zelldichte. Die Caco-2 Zysten gehen bei der 3D Kultivierung aus einzelnen Zellen durch Proliferation hervor, wohingegen eine so starke Vereinzelung der Caco-2 Zellen in der 2D Kultivierung zum Absterben der Zellen führt.

Zusammenfassend belegen die präsentierten Ergebnisse eine Beteiligung von p0071 an der Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität.

### 3.3 Mögliche Funktionen von p0071 beim intrazellulären Proteintransport

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten auf eine Rolle von p0071 beim COPII-vermittelten Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat hin, da verschiedene Komponenten des COPII-Komplexes in einem Y2H Screening mit der C-terminalen Domäne von p0071 gefunden wurden und weiterführende Experimente einen Einfluss von p0071 z. B. auf das Sec31A Protein belegen konnten (siehe Abb. 2-22, S. 73). Ob p0071 direkt oder indirekt einen Einfluss auf das Sec31A Protein ausübt, konnte im Zuge der durchgeführten Experimente nicht ermittelt werden. Für einen direkten Einfluss würde der Nachweis einer Interaktion zwischen p0071 und Sec31A. sprechen. Da es sich aber vermutlich um eine transiente Interaktionen zwischen p0071 und den COPII-Komponenten handelt, gestaltet sich der Nachweis schwierig.

Mit Hilfe der temperatursensitiven Proteinvariante von VSVG wurden schon viele Proteine identifiziert, die einen Einfluss auf den ER zum Golgi-Apparat Transport besitzen (Presley *et al.*, 1997). Daher kam dieses Protein auch zum Einsatz, um die Rolle von p0071 in diesem Zusammenhang zu klären. Mit den durchgeführten VSVG- und Endo H-Tests konnte jedoch bezüglich dem VSVG-Protein kein gestörter Transport zur Plasmamembran nach einem p0071 Knockdown aufgezeigt werden (siehe Abb. 2-24, S. 77). Das p0071 Protein beeinflusst somit nicht den VSVG-Proteintransport zur Plasmamembran.

Als Kontrolle für die Funktionalität des Endo H Enzym wurde ein Teil der Proben nicht mit dem Enzym inkubiert. Das VSVG-Protein weist in diesen Proben zum Teil ein höheres Molekulargewicht auf, da das Enzym Endo H hier keine mannosereichen Zuckerreste vom Protein abspalten konnte. Damit ist belegt, dass der Endo H-Test an sich funktionierte, aber kein Unterschied zwischen den Kontroll- und Knockdown-Zellen feststellbar war. Und auch die Funktionalität des VSVG-Tests wurde durch die Lokalisation der GFP-getaggten Proteinvariante vom VSVG bestätigt, da das Protein nach einer Inkubation der Zellen bei 40°C erwartungsgemäß in Zellkernnähe akkumulierte, was für eine Aggregation des falsch gefalteten Proteins im endoplasmatischen Retikulum spricht. Nach einer Inkubation bei 32°C war das VSVG-Protein später an der Zellmembran nachweisbar (siehe Abb. 2-24, S. 77).

Da als neue putative Interaktionspartner für p0071 ausschließlich die Sec24 Proteinisoformen A und D gefunden wurden, könnte dies als Hinweis dienen, dass p0071 eine Funktion bei dem Proteintransport besitzt, bei dem diese Sec24 Proteinisoformen die Cargoselektion vermitteln. Dass die verschiedenen Sec24 Proteinisoformen einen Einfluss auf die Cargoselektion besitzen, wurde u. a. durch isoform-spezifische Knockdown-Experimente gezeigt (Merte *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2003; Wendeler *et al.*, 2007). Für die Selektion von VSVG in die COPII-bedeckten Vesikel am endoplasmatischen Retikulum sind zum Beispiel die Sec24 Proteinisoformen A und B notwendig (Mancias *et al.*, 2008). Wenn also die Hypothese stimmt, dass p0071 eine Funktion bei dem Proteintransport besitzt, bei dem diese Sec24 Proteinisoformen A und D die Cargoselektion vermitteln, würde dies erklären, warum kein Effekt von p0071 auf den VSVG-Proteintransport nachweisbar ist.

Im durchgeführten Y2H Screening wurde auch das *kelch-like protein 12* (KLHL12) als putativer Interaktionspartner für den C-Terminus von p0071 gefunden. Dabei handelt es sich um ein mit der E3-Ubiquitinligase Cullin interagierendes Protein. Im Komplex führen diese Proteine zu einer Monoubiquitinierung von Sec31, was zu einer Vergrößerung der COPII-Vesikel an der ER-Membran führt, wie sie für den Transport von Procollagenfibrillen notwendig ist (Jin *et al.*, 2012). Somit stellt Collagen ein mögliches Cargo dar, bei dessen Transport p0071 eine regulierende Funktion besitzen könnte.

Neben vielen Proteinen, die eine Rolle beim intrazellulären Transport eine Rolle spielen, wurden auch Proteine mit einer Funktion bei der Zelladhäsion im durchgeführten Y2H Screening gefunden (siehe Abb. 2-21, S. 71). Dies bestätigt zum einen noch einmal die Bedeutung von p0071 für die Zelladhäsion und andererseits beweist es, dass das Y2H Screening geeignet ist neue und bereits bekannte Interaktionspartner für p0071 zu identifizieren. Auffällig war beim durchgeführten Y2H Screening jedoch, dass keine Proteine mit einer PDZ-Domäne gefunden wurden, obwohl p0071 am äußersten C-Terminus ein PDZ-Bindemotiv besitzt. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die PDZ-Proteine dieses Motiv nicht erkannt haben und daher nicht an p0071 gebunden haben, kann eine nicht korrekte Konformation des Motivs sein. Jenes wiederum mag bedingt durch den angehängten Tag sein. Es wäre somit sinnvoll, das Y2H Screening mit einem anderen Tag zu wiederholen, um die native Konformation des

Bindemotivs zu erhalten. Sollte dies gelingen, könnten die PDZ-Proteine daran binden und vielleicht bestimmt Polaritätsproteine mit PDZ-Domänen wie Par3, Par6, Discs Large und Scribble sowie PALS1 und PATJ als putative Interaktionspartner für p0071 entdeckt werden. Dies würde Rückschlüsse zulassen, für welchen der drei konservierten Polaritätskomplexe p0071 von Bedeutung ist.

Aufgrund seiner basolateralen Lokalisation in den untersuchten Caco-2 Zellen ist eine Interaktion zwischen dem PDZ-Bindemotiv von p0071 und dem ebenfalls basolateral angeordneten Scribble-Komplex am wahrscheinlichsten. Zumal das Scribble Protein schon mit der Adherens Junctions Komponenten E-Cadherin interagiert (Lohia *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2005). Die Proteine lokalisieren also in unmittelbare Nähe zueinander an der Plasmamembran, was die Komplexbildung zwischen ihnen begünstigen sollte. Nimmt man diese Bildung eines Komplexes an, würde damit der Stabilisierung der basolateralen Membrandomäne gedient sein, indem sichergestellt wird, dass zwei Komplexe, die der Definition der basolateralen Membrandomäne dienen in Abhängigkeit voneinander korrekt an der Plasmamembran lokalisieren.

Da für p0071 auch eine im C-Terminus um 43 Aminosäuren kürzere Isoform existiert (Hatzfeld *et al.*, 1996), könnte man das durchgeführte Y2H Screening für diese kürzere Proteinvariante wiederholen, um so auf mögliche Isoform-spezifische Interaktionspartner für p0071 rückschließen zu können. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die beiden bekannten p0071 Isoformen in ihren Funktionen bei der Ausbildung der Zellpolarität unterscheiden. Überhaupt ist bisher vollkommen unklar unter welchen Bedingungen welche Proteinvariante von p0071 in den unterschiedlichen Zellarten gebildet wird.

### 3.4 Modell zur Rolle von p0071 bei der Zellpolarität

Der Einfluss von p0071 auf die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität ist nach den vorgestellten Ergebnissen unbestreitbar. Jedoch ist der molekulare Mechanismus dahinter noch immer nicht im Detail verstanden. Diese Arbeit erhärtet allerdings die Vermutung, dass die Interaktionen zwischen p0071 und Rab11 sowie den Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 eine entscheidende Rolle dabei spielen.

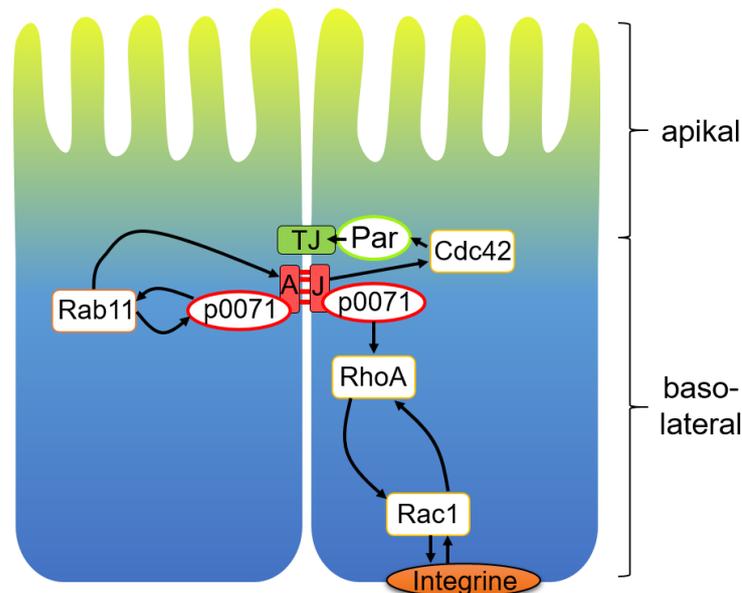


Abb. 3-1: Modell zur Rolle von p0071 bei der apikal-basolateralen Zellpolarität  
Das p0071 Protein kann über verschiedene Signalwege auf die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität einwirken. Entscheidend dafür ist u. a. die Balance zwischen den drei Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1. Auf den Aktivitätszustand der Rho-GTPase RhoA kann p0071 direkt regulierend wirkend. RhoA gilt als Gegenspieler zu Rac1, welches durch Interaktion mit den Integrinen Signale von außen in die Zelle transferriert. Cdc42 kann durch die Adhärenz Verbindungen (AJ) aktiviert werden und wirkt u. a. durch den Par-Komplex (Par) regulierend auf die Tight Junctions (TJ). Durch seine Interaktion mit Rab11 kann p0071 auch den intrazellulären Proteintransport beeinflussen und darüber die Dynamik der Adhärenz Verbindungen an der Zellmembran.

Cdc42 ist für die Orientierung der mitotischen Spindel während der Zellteilung von Bedeutung und reguliert darüber die richtige Ausbildung der Zellpolarität in 3D gewachsenen Zysten (Jaffe *et al.*, 2008). Zur Ausübung dieser Funktion interagiert Cdc42 mit den Komponenten des Par-Komplexes Par6 und aPKC (Durgan *et al.*, 2011).

Für Rac1 konnte hingegen ein Einfluss auf die Signalübertragung von Zell-Matrix-Kontakten zur Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität ermittelt werden (O'Brien *et al.*, 2001). Dabei ist das Gleichgewicht zwischen den Rho-GTPasen

entscheidend für die richtige Ausbildung der Zellpolarität. So weisen in 3D gewachsene MDCK-Zellen, die zuvor mit einer dominant negativen Proteinvariante von Rac1 transfiziert wurden, eine invertierte Zellpolarität auf. Dies bedeutet, dass die apikalen Marker zur extrazellulären Matrix ausgerichtet sind und nicht zum Lumen. Ein Knockdown von RhoA kann in diesem Zusammenhang die richtige Orientierung der Zellpolarität wiederherstellen (Yu *et al.*, 2008).

Das p0071 Protein kann wiederum die Aktivität von RhoA stimulieren (Wolf *et al.*, 2006), und so über die aufgezeigten Mechanismen bei der Ausbildung der Zellpolarität mitwirken. Dies kann zudem auch über die bereits erwähnte gegenseitige Regulation zwischen Rab11 und p0071 passieren (Keil *et al.*, 2014). So wird angenommen, dass der multiple Lumenphänotyp nach einem Rab11 Knockdown in Caco-2 Zellen durch Transportdefekte verursacht wird (Gao *et al.*, 2010). Durch seine regulierende Wirkung auf Rab11 kann p0071 auf eben diese Transportvorgänge einwirken und so die Ausbildung der apikal-basolateralen Zellpolarität beeinflussen. Dabei ist für Rab11 eine Beteiligung an der Assemblierung der Adherens Junctions belegt (Desclozeaux *et al.*, 2008).

Wie in den ersten Kapiteln erläutert, ist die Zellpolarität ein so fundamentaler biologischer Prozess, dass jede weitere Forschung auf diesem Gebiet vorangetrieben werden sollte, um Krankheiten wie Krebs besser verstehen und behandeln zu können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Hefestämme

**Material:** *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm AH109 bzw. Y187 (Clontech, Mountain View, USA); 10x Aminosäure Dropout-Zusatz (Clontech, Mountain View, USA); Agar-Agar (Carl Roth, Karlsruhe); YPDA- und SD-Medium

Für das *Yeast Two Hybrid Screening* wurden folgende *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme verwendet:

**Tabelle 4-1: verwendete Hefestämme**

Stamm	Genotyp	Vertrieb
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2:: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, ura3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	Clontech, Mountain View, USA
Y187	MAT $\alpha$ , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 $\Delta$ , met <sup>-</sup> , gal80 $\Delta$ , URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ	Clontech, Mountain View, USA

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte in YPDA-Medium.

**YPDA-Medium:** 2 % (w/v) Bakto-Pepton; 1 % (w/v) Hefeextrakt;

2 % (w/v) Glucose; 0,08 % (w/v) Adenin-Hemisulfat; pH 6,5

Nach erfolgter Transformation der Hefen erfolgte die weitere Kultivierung in SD-Medium.

**SD-Medium:** 2 % (w/v) Glucose; 6,7 % (w/v) Hefe-Stickstoff-Base ohne Aminosäuren; 1x Aminosäure Dropout-Lösung; pH 5,8

Die entsprechenden YPDA- bzw. SD-Agar konnten durch Zugabe von 20 g/l Agar-Agar hergestellt werden. Die Selektion transformierter Hefen erfolgt in der Regel durch plasmidvermittelte Stoffwechselauxotrophien, statt über Antibiotikaresistenzen wie bei den Bakterien.

## 4.2 Plasmid-Transformation in *Saccharomyces cerevisiae* AH109

**Material:** *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm AH109 (Clontech, Mountain View, USA); GFL-Schüttelinkubator 3032 (GFL, Burgwedel); Yeastmaker Carrier DNA, 10x Aminosäure Dropout-Zusatz (beides Clontech, Mountain View, USA); Wasserbad bei 42°C, Selektions-SD-Agarplatten; Photometer: GeneQuant 1300, Version: 4281 V1.6.1 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien); Zentrifuge für 50 ml Zentrifugationsröhrchen, TE-Puffer; Lithiumacetat und Polyethylenglykol 4000 (Carl Roth, Karlsruhe); DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); MS1 Minishaker (IKA, Staufen)

Die für das Y2H Screening verwendete humane cDNA-Bibliothek war bereits durch den Hersteller in den Hefestamm Y187 transformiert. Für die Transformation des C-Terminus von p0071 auf dem pBD-Vektor wurde eine Übernachtkultur der *Saccharomyces cerevisiae* AH109 in 50 ml YPDA-Medium bei 30 °C und 250 rpm inkubiert bis eine optische Dichte größer als 1,5 bei 600 nm erreicht wurde. 30 ml dieser Starterkultur wurden zum Animpfen von 300 ml YPDA-Medium verwendet. Die optische Dichte bei 600 nm lag so bei 0,2-0,3. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 230 rpm für ungefähr 3 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt lag die optische Dichte bei 600 nm zwischen 0,4 und 0,6. Die Hefezellen wurden anschließend für 5 Minuten bei 3000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 6 ml TE-Puffer resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 rpm und RT. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml frisch hergestellter 1x TE/1x Lithiumacetat (LiAc)-Lösung resuspendiert. 0,1 ml von diesen Hefezellen wurden mit 0,5 µg Plasmid-DNA und 0,1 mg Carrier DNA gemischt, sowie mit 0,6 ml frisch hergestellter PEG/ LiAc-Lösung. Nach einem kurzen Mischen der Zellen mit der DNA durch Benutzung eines Rotationsschüttlers wurden der Ansatz für 30 Minuten bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Nach der Zugabe von 70 µl DMSO und vorsichtigem Durchmischen erfolgte eine Inkubation für 15 Minuten in einem 42 °C warmen Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz 1-2 Minuten auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert bevor er auf die Selektions-SD-Agarplatten ausgestrichen wurden und bei 30 °C inkubiert wurde. Für die Selektion auf erfolgreich transformierte Hefen wurden SD-Agarplatten ohne Tryptophan verwendet. Um zu testen, ob das transformierte p0071 C-Terminus Konstrukt keine Autoaktivität besitzt, wurden erfolgreich transformierte Hefe-Einzelkolonien außer auf SD-Agarplatten ohne Tryptophan auch auf SD-Agarplatten ohne Tryptophan und Histidin bzw. ohne Tryptophan und Adenin ausgestrichen. Das Wachstum auf Histidin- und

Adenin-freien SD-Agarplatten wurde später im Y2H Screening als Reporter für stattfindende Interaktionen zwischen dem C-Terminus von p0071 und den Proteinen aus der humanen cDNA-Bibliothek benutzt. Der C-Terminus von p0071 wies keine Autoaktivität auf.

<b>10x LiAc:</b>	1 M Lithiumacetat, pH 7,5
<b>PEG/LiAc Lösung:</b>	40 % PEG 4000; 1x TE-Puffer, 1x LiAc
<b>1x TE-Puffer:</b>	10 mM TRIS; 1 mM EDTA; pH 7,5

### 4.3 Y2H Screening

Material: Mate & Plate Library - Universal Human Normalized (Clontech, Mountain View, USA), mit dem C-Terminus von p0071 transformierter AH109 Hefestamm (siehe Abschnitt 0, S. 95); Tryptophan-, Leucin-, Histidin- und Adenin-freie Selektions-SD-Agarplatten, Zentrifuge für 50 ml Zentrifugationsröhrchen, SD- und YPDA-Medium (siehe Abschnitt 4.1, S. 94); GFL-Schüttelinkubator 3032 (GFL, Burgwedel)

Das *Yeast Two Hybrid Screening* diente der Identifikation möglicher neuer Interaktionspartner von p0071. Dazu wurde der C-Terminus von p0071 auf dem Vektor pBD in den Hefestamm AH109 transformiert (siehe Abschnitt 0, S. 95) und nach dem Mating mit dem Hefestamm Y187, der mit einer humane cDNA-Bibliothek transformiert war, auf mögliche Interaktionen zwischen den Proteinen getestet. Als Reporter für mögliche Interaktionen zwischen den Proteinen diente das Wachstum der durch das Mating entstandenen Hefe-Diploide auf Tryptophan-, Leucin-, Histidin- und Adenin-freien Selektions-SD-Agarplatten.

Für das Mating der beiden verschiedenen transformierten Hefestämme AH109 und Y187 wurde eine 50 ml Übernachtskultur in SD-Medium ohne Tryptophan des transformierten AH109 Hefestamms nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,8 zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte für 5 Minuten bei 3000 rpm und RT. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml SD-Medium ohne Tryptophan resuspendiert und mit 1 ml des aufgetauten, mit der humanen cDNA-Bibliothek transformierten Y187 Hefestamm in einem 2 L Kolben und 45 ml 2x YPDA-Medium vereint. Es folgte eine Inkubation für 24 Stunden bei 30 °C und 50 rpm. Am nächsten Tag wurden die gemateten Hefezellen für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der 2 L Kolben wurde zweimal mit je 50 ml 0,5x YPDA ausgespült und mit dem Zellpellet vereint. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml 0,5x YPDA Medium

resuspendiert. Der Großteil der Zellsuspension wurde zu je 200 µl auf 15 cm großen Selektions-SD-Agarplatten ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin ausgestrichen. Für die Überprüfung des erfolgreichen Matings der beiden Hefestämme miteinander, wurde ein kleiner Teil auch auf Selektions-SD-Agarplatten ohne Tryptophan und Leucin ausgestrichen. Die Selektions-SD-Agarplatten wurden bei 30 °C inkubiert. Bei Wachstum auf den Selektionsreporterplatten (ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin) wurden diese Hefekolonien gepickt, die enthaltenen Plasmide isoliert (siehe Abschnitt 4.4, S. 97), sowie anschließend sequenziert.

#### 4.4 DNA-Isolierung aus Hefen

**Material:** Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Carl Roth, Karlsruhe), Glasperlen 425-600 µm acid-washed sowie 96 % Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); SD-Medium (siehe Abschnitt 4.1, S. 94), 10x Aminosäure Dropout-Zusatz (Clontech, Mountain View, USA)

Die von den Selektionsplatten gepickten Hefekolonien wurden über Nacht bei 30 °C und 240-260 rpm in 4 ml SD-Medium ohne den Zusatz von Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium bei RT für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 200 µl Lysispuffer, ein wenig Glasperlen und 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol durch 1-minütiges Vermischen auf einem Rotationsschüttler aufgeschlossen. Die unlöslichen Zelltrümmer wurden durch die Zentrifugation bei RT für 5 Minuten bei 13.000 rpm abgetrennt und die obere Phase (ca. 150 µl) erneut zentrifugiert. Der Überstand davon wurde mit 500 µl 96 % Ethanol versetzt und kurz in flüssigen Stickstoff inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei RT für 10 Minuten und 13.000 rpm. Das entstandene Pellet ist die isolierte DNA aus den Hefezellen. Die DNA wurde vor dem Trocknen bei 37 °C zunächst mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 20 µl autoklaviertem Wasser aufgenommen.

**Lysispuffer (100 ml):** 2 ml 100 % Triton X-100; 5 ml 20 % SDS; 2 ml 5 M NaCl;  
1 ml 1 M TRIS-HCl pH 8,0; 0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0;  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O

Die so isolierte Hefe-DNA wurde anschließend teilweise für eine Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, deren Produkte wurden dann zur Sequenzierung geschickt.

## 4.5 Polymerase-Kettenreaktion für die Y2H Proben

**Material:** DreamTaq PCR Master Mix (2X), Nuklease-freies H<sub>2</sub>O (alles von Thermo Scientific, Waltham, USA); DNA-Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon, Ebersberg); Thermozykler T3 (Biometra, Göttingen)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient unter anderem der *in vitro* Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA).

**Tabelle 4-2: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes**

Reagenz	Volumen
Hefe-DNA	2 µl
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	25 µl
<i>forward</i> Primer (10 pmol/µl)	1 µl
<i>revers</i> Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	21 µl

Die Sequenzen der Primer für die PCR waren die folgenden:

Primer	Sequenz 5' → 3'
<i>forward</i>	attcaaaaccactgtcacctgggtggac
<i>revers</i>	cagttgaagtgaacttgccggggttttc

Der PCR-Ansatz wurde gemischt und im Thermozykler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

**Tabelle 4-3: PCR-Programm**

Temperatur	Dauer	Wiederholungen
95 °C	2 Minuten	keine
95 °C	30 Sekunden	5x
72 °C	5 Minuten	
95 °C	30 Sekunden	20x
68 °C	5 Minuten	
68 °C	7 Minuten	keine

Nach der PCR wurden 5 µl vom Ansatz mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut (siehe Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden., S. Fehler! Textmarke nicht definiert.**), um durch die unterschiedlichen Schnittstellen für das Enzym innerhalb der Y2H Proben Hinweise auf identische Klone zu bekommen. Jeweils 5 µl vom PCR-Ansatz der zu sequenzierenden Proben wurden in die Vertiefungen einer 96 Well-Platte pipettiert und im 60 °C Trockenschrank für ungefähr 5 Minuten eingetrocknet. Anschließend wurde die Well-Platte mit Folie versiegelt und

zum Sequenzieren an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem T7-Primer der Firma.

## 4.6 Zelllinien

Für die Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

**Tabelle 4-4: verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HeLa	humane Zellen aus einem Cervix-Adenokarzinom	(Scherer <i>et al.</i> , 1954)
MCF-7	humane Zellen aus einem Mamma-Adenokarzinom	(Soule <i>et al.</i> , 1973)
HaCaT	humane spontan transformierte Keratinozyten	(Boukamp <i>et al.</i> , 1988)
Maus-keratinozyten (MKZ)	murine spontan transformierte Keratinozyten	(Vijayaraj <i>et al.</i> , 2009)
Caco-2	humane Zellen aus einem Colon-Adenokarzinom	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)
HEK-293T	humane embryonale Nierenepithelzellen	(Graham <i>et al.</i> , 1977)
MDCKII	canine Nierenepithelzellen	(Gaush <i>et al.</i> , 1966)

## 4.7 2D Zellkultur

**Material:** DMEM; Natriumpyruvat; FCS; Trypsin; DMSO, nicht essentielle Aminosäuren, L-Alanyl-L-glutamine; Isopropanol (alles von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau); Sterilbank (Kendro; Langenselbold); Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container (Thermo Scientific, Waltham, USA); Universal 16 Hettich Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen); Mikroskop Wilovert A (hund, Wetzlar); PBSE; Plastik Kulturschalen (Corning, Corning, USA), Kryo-Röhrchen (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz); DMEM/ Ham's F12 low calcium (GE Healthcare, München); Chelex 100 Resin (Bio-Rad, Hercules, USA); Adenin, Insulin, Hydrocortison, Choleratoxin, *epidermal growth factor*, Essigsäure (alles von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); 2,5 % Trypsin (Life Technologies, Carlsbad, USA), Collagen Type I Rat Tail und Transwell 4 µm Polyester-Membraneinsätze (Corning, Corning, USA), Calciumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe)

Die Kultivierung der HeLa-, MCF-7-, HEK-293T und HaCaT-Zellen erfolgte in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) Kultivierungsmedium, dem zusätzlich 10 % FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum) zugefügt wurde. Die Zellen wuchsen für die Kultivierung auf 10 cm Plastik Kulturschalen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-

Gehalt. Alle 2 bis 4 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kultivierungsmedium entfernt, die Zellen mit PBSE (*phosphate buffered saline* + 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden zur Neutralisation des Trypsins in einigen Millilitern DMEM aufgenommen und für 3 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem DMEM resuspendiert und die Zellsuspension auf neue Kulturschalen verteilt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellen zuvor ebenfalls mit PBSE gewaschen und durch Trypsin von der Kulturschale abgelöst. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in FCS mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Die Suspension wurde in Kryo-Röhrchen überführt, die in speziellen Einfrierboxen mit einer Abkühlrate von 1 °C pro Minute in der Gefriertruhe auf -80 °C gekühlt wurden. Das DMSO soll während des Einfrierens die Eiskristallbildung, die die Zelle zerstören kann, verhindern.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension im Kryo-Röhrchen möglichst schnell im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in Zentrifugationsröhrchen überführt, in denen bereits vorgewärmtes DMEM enthalten war. Es erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 1.500 rpm und RT. Das Zellpellet wurde in DMEM resuspendiert und auf die Kulturschalen verteilt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt bzw. die Zellen passagiert.

Die Kultivierung der Caco-2 Zellen erfolgte in DMEM, dem zusätzlich 10 % FCS sowie 1 % nicht essentielle Aminosäuren und 1 % L-Alanyl-L-glutamine zugefügt wurde. Zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde das verwendete Trypsin 1:2 in PBSE verdünnt. Die restliche Kultivierung der Zellen erfolgte wie oben bereits beschrieben bzw. wurde die Zellen zum Teil nicht auf den normalen Plastikkulturschalen kultiviert, sondern auf Transwell Polyester-Membraneinsätze mit einer Porengröße von 4 µm um die Differenzierung in hochprismatische Enterozyten zu fördern.

Die Kultivierung der Mauskeratinozyten erfolgte in DMEM/ Ham's F12 low calcium Medium, dem zusätzlich 10 % Chelex behandeltes FCS, 2 ml Adenin (250x), 500 µl Insulin (1000x), 250 µl Hydrocortison (200x), 5 µl Choleratoxin, 5 ml L-Alanyl-L-glutamine, 5 ml Natriumpyruvat und 500 µl EGF (1000x) zugefügt wurde. Die Zellen wuchsen für die Kultivierung auf 10 cm Plastikkulturschalen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei

32 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt. Die Mauskeratinozyten wurden nur mit PBS gewaschen, bevor eine Inkubation mit Trypsin zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale erfolgt. Auch hier wurden die Zellen zum Passagieren nach dem Ablösen für 3 Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert, bevor die Zellsuspension auf neue Kulturschalen verteilt wurde. Die Kulturschalen mussten für die Mauskeratinozyten zuvor immer mit einer Collagen-Lösung für mindestens 20 Minuten bei 37 °C beschichtet werden. Nach der Beschichtung wurden die Kulturschalen zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Mauskeratinozyten darauf kultiviert wurden. Zur *de novo* Bildung von Zell-Zell-Kontakten wurde das normale Kultivierungsmedium der Mauskeratinozyten mit 50 µM Calcium gegen Medium ausgetauscht, das stattdessen 1,2 mM Calcium enthielt.

**PBS(E):** 135 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
(1 mM EDTA); pH 7,4

#### 4.8 3D Zellkultur

Material: Geltrex (life technologies, Carlsbad, USA); µ-Slide 8 Well (Ibidi, Martinsried); CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau); Sterilbank (Kendro; Langenselbold); Cholera toxin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Die 3D Zellkultivierung der Caco-2 Zellen erfolgte in einer Matrix, die aus Wachstumsfaktoren-reduzierten Basallamina-Extrakten des murinen Engelbreth-Holm-Swarm Tumors besteht. Zu den Hauptbestandteilen der Matrix (= Geltrex von life technologies) zählen laut den Herstellerangaben Laminin, Collagen IV, Entactin und Heparinsulfat-Proteoglykane. Die Kultivierung geschah in 8 Well Objektträgern, deren Vertiefungen zunächst mit 100 % Geltrex beschichtet wurden. Damit das Geltrex von seiner bei 4 °C flüssigen Form in eine stabile, feste Form übergeht, erfolgte eine Inkubation für 20-30 Minuten bei 37 °C. Die Caco-2 Zellen wurden anschließend als Einzelzellsuspension, bestehend aus dem Kultivierungsmedium mit 40 % Geltrex, in die Vertiefungen auf den Objektträgern zu je 100-150 µl eingesetzt und zum Gelieren der 3D Matrix ebenfalls für 30 Minuten bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde die Matrix mit ca. 300 µl Kultivierungsmedium überschichtet und die Zellen auf diese Weise mehrere Tage lang kultiviert. Es wurde ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage durchgeführt. Zur Stimulation der Lumenbildung in den entstandenen kugelförmigen Zellgebilden (= Zysten) wurde am Tag 5 nach Beginn der 3D Kultivierung 0,1 µg/ml

Choleratoxin dem Medium zugesetzt. Nach mindestens vier Stunden Inkubation mit Choleratoxin wurden die Zellen anschließend für die immunzytologischen Untersuchungen fixiert (siehe Abschnitt 4.13, S. 104).

#### **4.9 *Live Cell Imaging***

Material: siehe Abschnitt 4.8, S. 101; Mikroskop: Axio Observer .Z1 + Kamera: AxioCamMR3 (Carl Zeiss AG, Jena);

Für das *Live Cell Imaging* der Lumenbildung in den 3D kultivierten Caco-2 Zysten wurden diese zunächst durch Zugabe von 0,1 µg/ml Choleratoxin in das Medium am Tag 5 der 3D Kultivierung zur Lumenbildung angeregt. Während der nachfolgenden mikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen im Objektträger in der zum Mikroskop dazugehörigen Inkubationskammer bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Etwa alle 5-15 Minuten wurden Bilder aufgenommen und dies maximal 24 Stunden lang.

#### **4.10 Zellzahlbestimmung**

Material: Neubauer Zählkammer (Laboroptik, Friedrichsdorf); Mikroskop Wilovert A (hund, Wetzlar)

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit der Neubauer Zählkammer. Dazu wurde von einer Zellsuspension, deren Zellzahl bestimmt werden sollte, eine 1:100 Verdünnung hergestellt. 10 µl der Verdünnung wurden jeweils in die zwei Zählfelder der Neubauer Zählkammer pipettiert. Am Mikroskop wurden dann pro Zählfeld vier Großquadrate ausgezählt, die wiederum durch vier weitere Quadrate gebildet wurden. Anschließend wurde der Mittelwert aller vier Großquadrate ermittelt. Da das Volumen eines Zählfeldes 0,1 mm<sup>3</sup> beträgt, war die bestimmte Zellzahl in 0,1 µl Zellsuspension enthalten. Diese Zellzahl musste noch einmal mit dem Faktor 100 multipliziert werden, aufgrund der vorgenommenen Verdünnung sowie mit dem Faktor 10000, um von 0,1 µl auf 1 ml zu kommen. Das Ergebnis entspricht dann der Anzahl der Zellen, die in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert wurden.

#### 4.11 siRNA Transfektion

**Material:** Lipofectamin 2000 (life technologies, Carlsbad, USA); serumfreies DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Xfect siRNA *Transfection Reagent* (Clontech, Mountain View, USA)

Die Transfektion von siRNA mittels Lipofectamin 2000 erfolgte in Suspension mit HeLa-, Caco-2 und HaCaT-Zellen. Für die Transfektion der Zellen, die in einem 24 Well enthalten waren, wurden 25 pmol siRNA und 1,5 µl Lipofectamin 2000 eingesetzt. Beides wurde zuvor in je 50 µl serumfreies DMEM verdünnt. Die Lipofectamin-Verdünnung wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie mit der siRNA-Verdünnung im Verhältnis 1:1 gemischt wurde. Dieser Ansatz wurde für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zu der Zellsuspension in die Kulturschalen gegeben. Die Zellen wurden für die Transfektion so in Suspension eingesetzt, dass sie am nächsten Tag zu ca. 50 % konfluent waren.

Die siRNA-Transfektion der Mauskeratinozyten erfolgte mittels Xfect siRNA *Transfection Reagent*. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls in Suspension transfiziert, jedoch so eingesetzt, dass sie am nächsten Tag zu mindestens 60 % konfluent waren. Pro 24 Well wurden 30 pmol siRNA mit 4 µl Xfect Polymer und 46 µl Reaktionspuffer eingesetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei RT konnte die Lösung zu der Zellsuspension in die Kulturschalen gegeben werden. Es erfolgte bei beiden Transfektionsmethoden am nächsten Tag ein Mediumwechsel.

#### 4.12 Lentivirale Transduktion

**Material:** Calciumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe); Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Präzipitationspuffer; 0,45 µm Polyethersulfon-Filter (VWR International, Wayne, USA); Polyethylenglykol 6000 und Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe); DNase/RNase-freies Wasser und Polybren (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Puromycin (Life Technologies, Carlsbad, USA)

HEK-293T-Zellen wurden stark subkonfluent auf 6 cm Kulturschalen eingesetzt und am nächsten Tag mittels Calciumphosphat transfiziert. Die Kulturschalen wurden zur besseren Adhäsion der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet, indem sie für 10 Minuten mit diesem inkubiert und anschließend mit PBSE gewaschen wurden. Vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, d.h., dass das Kultivierungsmedium durch 2,4 ml frisches DMEM ersetzt wurde. Für die Herstellung des Präzipitats wurden 24,8 µg Plasmid-DNA (50 % individuelle Plasmid-DNA, 36 %

psPAX, 14 % pMDS.G) in 280 µl DNase/RNase-freies Wasser pipettiert und nach der Zugabe von 40 µl 2 mM Calciumchlorid vorsichtig gemischt. Diese DNA-Mischung wurde anschließend unter Schütteln tropfenweise zu 310 µl Präzipitationspuffer gegeben. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zu den HEK-293T-Zellen hinzugefügt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und die zu transduzierenden Zellen wurden in 12 Well so eingesetzt, dass sie am folgenden Tag zu ca. 50 % dicht waren. Am darauffolgenden Tag wurden dann 4 ml vom HEK-293T Mediumüberstand durch einen Polyethersulfon (PES)-Filter filtriert und mit einer Polyethylenglykol (PEG)- Lösung vermischt. Nach Inkubation dieses Gemisches für zwei Stunden bei 4 °C erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 7700 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde anschließend entfernt und das Pellet in 400 µl Kultivierungsmedium mit 10 µg/ml Polybren resuspendiert. Diese 10x konzentrierte Viren-Lösung wurde unterschiedlich stark konzentriert auf die zu transduzierenden Zellen gegeben, in der Regel 0,5x, 1x, 2x oder 5x-fach. Die anschließende Selektion der transduzierten Zellen erfolgte mit 2-4 µg/ml Puromycin.

**PEG-Lösung:** 50 % PEG 6000; 1,5 mM Natriumchlorid, pH 7,2 in PBS

**Präzipitationslösung:** 5 M Kaliumacetat (pH 5,2), Eisessig

#### 4.13 Immunzytologische Untersuchungen

**Material:** Milchpulver (Milupa, Friedrichsdorf); Mikroskop: Axio Observer .Z1 + Kamera: AxioCamMR3 (Carl Zeiss AG, Jena); LSM-Mikroskop: Leica DM IRE2 mit TCS SP2 (Leica, Wetzlar); Nikon Eclipse E600 Mikroskop + Kamera: Ds-Qi1 (Nikon, Tokio, Japan); Formaldehyd und Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Methanol (Merck, Darmstadt); Ethanol (Walter CMP GmbH, Kiel); Hoechst 33342 (Millipore, Darmstadt); Mowiol; MT-Puffer; PBS; verwendete Antikörper siehe Anhang 1, S. 116 und Anhang 2, S. 118; 12 mm Deckgläschen (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim); BSA (bovines Serumalbumin, Carl Roth, Karlsruhe)

Die Zellen wurden vor der immunzytologischen Markierung entweder durch Methanol- oder durch Formaldehyd fixiert.

Bei der Formaldehyd-Fixierung wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen nach dem Waschen mit PBS für 15 Minuten mit Formaldehyd (FA) bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte eine 12-minütige Inkubation mit dem Mikrotubuli-stabilisierenden Puffer (MT-Puffer) bei RT bzw. mit 0,5 % Triton X-100/ PBS im Fall der Mauskeratinozyten.

Bei der Methanol-Fixierung wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen nach dem Waschen in PBS für 10 Minuten in -20 °C kaltem Methanol inkubiert. Vor dem Permeabilisieren der Plasmamembran durch den MT-Puffer bzw. mit 0,5 % Triton X-100/PBS, wurden die Deckgläschen kurz getrocknet.

Nach der Zellpermeabilisierung folgte unabhängig von der angewendeten Fixierungsmethode ein kurzer Waschschrift in PBS, danach eine halbstündige Inkubation in zentrifugierter 1 %iger Milchpulver/PBS-Lösung bzw. 1 %iger BSA/PBS-Lösung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für die nachfolgenden Antikörper. Die primären Antikörper wurden in 1 %iger Milchpulver bzw. BSA/PBS-Lösung verdünnt und 20 µl dieser Lösung auf je ein Deckgläschen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und danach für mindestens 5 Minuten in zentrifugierter 1 %iger Milchpulver/PBS-Lösung inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden in 1 %iger Milchpulver/PBS-Lösung verdünnt und 20 µl der Antikörperlösung auf je ein Deckgläschen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT im Dunkeln für eine Stunde. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, zum Entsalzen in destilliertes Wasser getaucht und anschließend zum Entwässern in 96 %igem Ethanol. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen auf die Objektträger mit Mowiol eingebettet. Die angefertigten Präparate wurden im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Die Aufnahmen von den Präparaten wurden mit einem der unter Material stehenden Mikroskope (Zeiss, Leica, Nikon) und den dazugehörigen Kameras angefertigt. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.48p.

- Mowiol:** 5 % (w/v) Mowiol; 30 % (v/v) Glycerin;  
0,25 % (w/v) 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)
- MT-Puffer:** 100 mM PIPES (pH 6,9); 4 M Glycerin; 2 mM EDTA;  
1 mM EGTA; 0,5 % (v/v) Triton X-100
- PBS:** 135 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
pH 7,4

#### 4.14 Immunhistochemische Färbungen

**Material:** *Clear Polyfreeze Tissue Freezing Medium* (Polysciences, Warrington, USA); Superfrost Ultra Plus Objektträger (Thermo Scientific, Waltham, USA); 10 % neutral gepuffertes Formalin sowie Isopropanol, Ethanol, Ziegen Serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Xylol (Merck, Darmstadt); Citratpuffer; Mikrotom RM2145 und Cryotom CM3050 S (Leica, Wetzlar); 2-Methylbutan und Aceton (Carl Roth, Karlsruhe); Hoechst 33342 (Millipore, Darmstadt); Wasserbad und Heizplatte (Medax, Kiel); BSA (bovines Serumalbumin, Carl Roth, Karlsruhe), Rezepte für PBS und Mowiol siehe Abschnitt 4.13, S. 104

Die Präparation des Maudarms erfolgte durch Dr. René Keil, die Präparation der Maushaut und deren immunhistochemische Färbung erfolgte durch Diplom-Biochemikerin Katrin Rietscher. Die paraffin-eingebetteten Proben der Caco-2 Zellen auf der Biochip-Membran wurden in Jena in der Arbeitsgruppe von Professor Huber angefertigt, genauso wie die dazugehörigen Cryo-Proben.

Teile des präparierten Maudarms wurden über Nacht in 10 % Formalin fixiert. Anschließend wurden sie in spezielle Behälter getan und in einer Maschine in der Anatomie an der MLU Halle-Wittenberg entwässert und paraffiniert. Die nachfolgende Einbettung in Paraffin wurde ebenfalls in der Anatomie durchgeführt. Die Proben konnten anschließend bei RT gelagert werden und wurden entweder an einem Mikrotom in der Anatomie in 4  $\mu\text{m}$  (bezüglich Maudarm) oder in 8  $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte (bezüglich Biochip-Proben aus Jena) geschnitten. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines 50 °C warmen Wasserbades auf Objektträger transferiert und auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Entparaffinierung durch nachstehendes Protokoll:

- 2-3x 10 Minuten Xylol
- 2x 5 Minuten Isopropanol
- 2x 5 Minuten 96 % Ethanol
- 1x 5° Minuten 80 % Ethanol
- 1x 5 Minuten 70 % Ethanol
- kurz in Aqua destillata spülen

Zur Antikörper-Demaskierung wurden die Objektträger anschließend in einem 0,1 M Citratpuffer in einer Mikrowelle 3x 2 Minuten erwärmt. Nach dem Abkühlen auf RT, erfolgte eine dreimalige Inkubation für je 10 Minuten in 3 % Triton X-100/ PBS. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für die nachfolgenden Antikörper, wurden

die Schnitte mit 1:20 in 3 % Triton X-100/ PBS verdünntem Ziegen Serum inkubiert. Die primären Antikörper selber wurden in 3 % Triton X-100/ PBS mit 0,5 % BSA verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Objektträgern inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für jeweils 10 Minuten mit 3 % Triton X-100/ PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei RT im Dunkeln mit den in 3 % Triton X-100/ PBS mit 0,5 % BSA verdünnten sekundären Antikörpern. Anschließend folgte ein 10-minütiger Waschschrift in 3 % Triton X-100/ PBS, gefolgt von 5 Minuten in Aqua destillata. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit Mowiol und Deckgläschen bedeckt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die in *Clear Polyfreeze Tissue Freezing Medium* eingebetteten Proben (Mausdarm und Biochip-Proben aus Jena) wurden am Cryotom in 8 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger transferiert und für 10 Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixieren und permeabilisieren. Nach dem Trocknen, wurden sie über Nacht bei 4 °C mit der primären Antikörper-Lösung, verdünnt in 3 % BSA/ PBS mit 0,1 % Tween20, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal für je 10 Minuten in 0,1 % Tween20/ PBS gewaschen und nach dem Trocknen für eine Stunde im Dunkeln mit der sekundären Antikörper-Lösung, ebenfalls verdünnt in 3 % BSA/ PBS mit 0,1 % Tween20, inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal für je 10 Minuten in 0,1 % Tween20/ PBS gewaschen. Nach dem Trocknen erfolgte schließlich das Eindeckeln mit Mowiol und geeigneten Deckgläsern.

**Citratpuffer:** 9 ml 0,1 M Zitronensäure + 41 ml 0,1 M Natriumcitrat  
+ 450 ml aq. dest., pH 6 einstellen

#### 4.15 Herstellung von Zelllysaten

**Material:** Aprotinin; Leupeptin; Pefabloc; Natriumvanadat (alle von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Kühlzentrifuge Sigma 2-16PK (Fisher Bioblock Scientific, Schwerte, Madrid); Immunpräzipitationspuffer und SDS-Lysepuffer; 2x SDS-PAGE Puffer, Benzonase (Santa Cruz, Dallas, USA); PBS Rezept siehe siehe Abschnitt 4.13, S. 104

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen in den Kulturschalen zunächst mit kaltem PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS wurde der Lysepuffer (Immunpräzipitationspuffer, 2x SDS-PAGE Puffer oder SDS-Lysepuffer) zu den Zellen gegeben. Die Menge an Lysepuffer richtete sich nach der Größe der Kulturschale. Für eine Vertiefung im 24 Well wurden zum Beispiel 80-100 µl Lysepuffer verwendet. Dem

Immunpräzitationspuffer wurden zuvor die Proteaseinhibitoren Aprotinin (10 µg/ ml), Leupeptin (10 µg/ ml) und Pefabloc (1 mM) sowie der Phosphataseinhibitor NaVO<sub>3</sub> (1 mM) frisch zugesetzt. Dem 2x SDS-PAGE Puffer bzw. dem SDS-Lysepuffer wurden 250 U/ ml Benzonase frisch zugesetzt. Die im Lysepuffer aufgenommenen Zellen wurden zum weiteren Zellaufschluss in flüssigen Stickstoff gegeben bzw. bei Verwendung des 2x SDS-PAGE Puffers einige Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach dem Auftauen der im Stickstoff eingefrorenen Proben im Wasserbad bei RT wurden sie für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde dann für die Proteinbestimmung (siehe Absatz 4.16, S. 108) eingesetzt oder für die Immunpräzitation (siehe Absatz 4.19, S. 111).

**SDS-Lysepuffer:** 25 mM TRIS; 1 % SDS

**Immunpräzitationspuffer:** 20 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 10 % (v/v) Glycerol;  
1 % (v/v) Nonidet P-40; 2 mM EDTA; 10 mM NaF<sub>2</sub>; 137 mM NaCl

**4x SDS-Ladepuffer:** 250 mM TRIS-HCl (pH 6,8); 8 % (v/v) SDS;  
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 30 % (v/v) Glycerin;  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

#### 4.16 Proteinkonzentrationsbestimmung

Material: Pierce BCA Protein Assay Kit (life technologies, Carlsbad, USA);  
Photometer: GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode. Anwesende Proteine bewirken bei dieser Methode die Entstehung einwertiger Kupferionen, die wiederum einen violetten Farbkomplex mit BCA bilden, der bei 562 nm detektiert werden kann. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration musste zunächst eine Eichgerade erstellt werden. Als Standard für die Eichung wurde Rinderserumalbumin (BSA, *bovine serum albumin*) benutzt. Dieses wurde in bekannten Konzentrationen mit BCA zur Reaktion gebracht, so dass mit Hilfe der gemessenen Absorptionen bei 562 nm und der Kenntnis der eingesetzten Konzentrationen die Erstellung einer Eichgerade möglich war. Die Eichgerade wurde als lineare Regression mit der Software Microsoft Excel erstellt. Durch die Eichgerade konnte schließlich auf die Proteinkonzentration der Proben nach Vermessen der Absorption bei 562 nm zurückgeschlossen werden. Die Proteinbestimmung wurde mit 1:100 verdünnten

Probenansätzen durchgeführt. 100 µl davon wurden mit 100 µl einer 25:25:1 ABC-Mischung aus dem Pierce BCA Protein Assay Kit für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Proben danach auf RT abgekühlt waren, wurden ihre Absorptionen bei 562 nm vermessen.

#### 4.17 SDS-PAGE

**Material:** PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (life technologies, Carlsbad, USA); SDS-PAGE-System Mini-Protean (Biorad, München); 4x SDS-Ladepuffer; Tris/Glycin-Laufpuffer

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Auftrennung von Proteingemischen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen.

Die mit 4x SDS-Ladepuffer versetzten Proben wurden für 5 bis 10 Minuten bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine inkubiert, bevor etwa 20-30 µl davon in die Taschen der Polyacrylamidgele aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte für den Sammelgelbereich für circa 30 Minuten bei 75 Volt. Danach wurde die Elektrophorese bei 90 V für meist 120 Minuten fortgesetzt. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mittels Western Blot übertragen (siehe Absatz 4.18, S. 109).

<b>4x SDS-Ladepuffer:</b>	250 mM TRIS-HCl (pH 6,8); 8 % (v/v) SDS; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
<b>Tris/Glycin-Laufpuffer:</b>	25 mM TRIS-HCl; 19,2 mM Glycin; 0,1 % (v/v) SDS

#### 4.18 Western Blot

**Material:** BSA (Carl Roth, Karlsruhe); Milchpulver (Milupa, Friedrichsdorf); Whatman Protran Nitrocellulose Transfer Membran (Whatman, Kent; Großbritannien); Rotilabo-Blottingpapiere (Carl Roth, Karlsruhe); PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter (peqlab, Erlangen); Wet Blot Apparatur und Imager Fusion-SL (peqlab, Erlangen); 10x Ponceau-Rot; Blotpuffer 1/2/3; Wet Blot Puffer; Chemilumineszenzlösung 1 und 2; TBS; TBST, verwendete Antikörper siehe 4.24Anhang 1 und Anhang 2 ab S. 116

Es wurde entweder mit der *semidry* oder mit der *wet blot* Methode geblottet. Bei der *semidry* Methode wurde der Western Blot wie folgt aufgebaut: Kathode, 3x Whatman-Papier in Blotpuffer 3 getränkt, Polyacrylamidgel, Nitrozellulose-Membran,

3x Whatman-Papier in Blotpuffer 2 getränkt, 3x Whatman-Papier in Blotpuffer 1 getränkt, Anode. Für die Dauer von 45 Minuten wurde pro Gel eine Stromstärke von 100 mA angelegt, gefolgt von 10-15 Minuten 150 mA. Zur Kontrolle des erfolgten Proteintransfers wurde die 6x9 cm Membran für zwei Minuten mit einer 1x Ponceau-Rot-Lösung inkubiert. Der rote Diazofarbstoff Ponceau S bindet dabei reversibel an die zugänglichen positiv geladenen Aminosäuren der Proteine. Die Ponceaufärbung wurde durch Waschen mit Wasser und TBST (*Tris buffered saline* + *Tween20*) wieder entfernt.

Die *wet blot* Methode ist besonders bei der Übertragung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 200 Kilodalton effizienter als die *semidry* Methode. Beim *wet blot* wurde der Western Blot wie folgt aufgebaut: Kathode, in Wet Blot Puffer getränkter Schwamm, gefolgt von 2x Whatman-Papier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulose-Membran, 2x Whatman-Papier und in Wet Blot Puffer getränkter Schwamm. Für die Dauer von ungefähr drei Stunden wurde eine Stromstärke von 400 mA angelegt.

Zum Absättigen unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurden die Nitrozellulose-Membranen anschließend für mindestens 20 Minuten entweder in 5 % Milchpulver/ TBST oder in 3 % BSA/ TBST-Lösung inkubiert. Die 3 %ige BSA/ TBST-Lösung kam zur Anwendung, wenn später phosphorylierte Proteine nachgewiesen werden sollten. Die primären Antikörper wurden in 3 % BSA/ TBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran mit TBST gewaschen und als nächstes für 1 Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde dazu in 5 % Milchpulver/ TBST verdünnt. Anschließend wurde die Membran mit TBS (*Tris buffered saline*) gewaschen. Für die Detektion des sekundären Antikörpers wurde eine 1:1 Mischung der Chemiluminiszenz-Lösungen 1 und 2 verwendet. Die Mischung wurde kurz vor der Anwendung hergestellt. Für die Detektion der Antikörpersignale wurde der Imager Fusion-SL benutzt.

**Blotpuffer 1:** 0,3 M TRIS-HCl (pH 10,4); 20 % (v/v) Methanol

**Blotpuffer 2:** 25 mM TRIS-HCl (pH 10,4); 20 % (v/v) Methanol

**Blotpuffer 3:** 25 mM TRIS-HCl (pH 9,4); 40 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure;  
20 % (v/v) Methanol

**Wet Blot Puffer:** 48 mM Tris-HCl; 39 mM Glycin; 0,0375 % SDS; pH 9,2

**Chemiluminenszenz-Lösung 1:** 100 mM TRIS-HCl (pH 8,5); 25 mM Luminol;  
0,4 mM Cumarinsäure

**Chemiluminenszenz-Lösung 2:** 100 mM TRIS-HCl (pH 8,5); 0,02 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**TBS(T):** 10 mM TRIS-HCl (pH 7,6); 100 mM NaCl; (0,1 % (v/v) Tween20)

**10x Ponceau-Rot:** 2 % (w/v) Ponceau S; 30 % (w/v) Trichlor-  
essigsäure; 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure

#### 4.19 Immunpräzipitation

Material: Protein A Agarose bzw. Protein G Agarose (life technologies, Carlsbad, USA); Kühlzentrifuge Sigma 2-16PK (Fisher Bioblock Scientific, Schwerte, Schwerte); Immunpräzipitationspuffer; verwendete Antikörper siehe 4.24Anhang 1 (S. 116); 2x SDS-PAGE Puffer; Kontrollseren Maus bzw. Kaninchen (Santa Cruz, Dallas, USA)

Die Immunpräzipitation beschreibt die Komplexbildung zwischen einem meist an einer festen Matrix immobilisierten Antikörper und einem löslichen Antigen. Dieses Verfahren eignet sich für den Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen, da es möglich ist an das Antigen gebundene Interaktionspartner zu präzipitieren.

Pro Immunpräzipitation wurden alle lysierte Zellen von einer 10 cm Kulturschale sowie entweder 20 µl Protein A Agarose oder Protein G Agarose eingesetzt. Die Agarose wurde mit dem Immunpräzipitationspuffer äquilibriert und anschließend mit 3 µg der jeweiligen Antikörper und 500 µl Zelllysaten versetzt (siehe dazu 4.15, S. 107). Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die ungebundene Fraktion von den Immunpräzipitaten durch eine einminütige Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C abgetrennt. Die Immunpräzipitate wurden mindestens dreimal mit dem Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Die Agarose wurde anschließend trocken gesaugt und die Immunpräzipitate mittels 30 µl 2x SDS-PAGE Puffer und einer Inkubation für 5 Minuten bei 95 °C eluiert. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgte dann per Western Blot Analyse (siehe Abschnitt 4.18, S. 109).

**Immunpräzipitationspuffer:** 20 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 10 % (v/v) Glycerol;  
1 % (v/v) Nonidet P-40; 2 mM EDTA; 10 mM NaF<sub>2</sub>; 137 mM NaCl

**4x SDS-Ladepuffer:** 250 mM TRIS-HCl (pH 6,8); 8 % (v/v) SDS;  
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 30 % (v/v) Glycerin;  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

## 4.20 Dispase-Test

**Material:** Dispase II (Roche, Rotkreuz, Schweiz); MS1 Minishaker (IKA, Staufen); Dispase-Puffer; Fotoapparat Sony Cyber-Shot DSC-H10 (Sony, Tokio, Japan); CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus Instruments, Hanau)

Mit Hilfe des Dispase-Tests kann die Stärke der interzellulären Adhäsion getestet werden. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen im 6 Well oder 12 Well so eingesetzt, dass sie innerhalb von 1-2 Tagen konfluent wachsen. Der konfluente Zellmonolayer wird dann mit Hilfe des Enzyms Dispase von der Kulturschale abgelöst und mittels eines Rotationsschüttlers mechanischem Stress ausgesetzt. Der Rotationsschüttler bewegt sich hierfür mit 600 rpm. Das Ablösen des intakten Zellmonolayers durch die Dispase sowie dessen Zerfall durch mechanischen Stress wurden mit einem Fotoapparat dokumentiert. Damit die Dispase ihre vollständige Aktivität besitzt, wurde die abgewogene Enzymmenge in Dispase-Puffer gelöst und 1:3 mit dem Kultivierungsmedium der Zellen verdünnt, so dass die Endkonzentration an Dispase 2,4 U/ ml betrug. Zum Ablösen des Zellmonolayers wurden die konfluenten Zellen in den Kulturschalen mit der Dispase-Lösung für 30 bis 60 Minuten bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert.

**Dispase-Puffer:** 50 mM HEPES; 150 mM NaCl; pH 7,4

## 4.21 VSVG-Test

**Material:** TrueFect Transfection Reagent (United Biosystems, Herdon, USA); Cycloheximid, Poly-L-Lysin und HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Heizplatte TRZ 3700 (Carl Zeiss AG, Jena); Anti-VSVG (8GF11) Antikörper (Kerafast, Boston, USA)

Beim VSVG-Test wird die Lokalisation des viralen Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSVG) während seines Transportes vom ER zur Plasmamembran fluoreszenztechnisch verfolgt. Dies geschah zum einen mittels einer thermoreversible GFP-getagten Faltungsvariante des Proteins und zum anderen durch Verwendung eines Antikörpers, der nur die Ektodomäne des VSVG-Proteins an der Plasmamembran erkennt (= ekto-VSVG). Der Test wurde mit MCF-7-Zellen durchgeführt, die entweder eine stabile Reduktion des p0071 Proteinlevels aufwiesen (= Knockdown-Zellen) oder mit den dazugehörigen Kontroll-Zellen. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen mit einer Zelldichte von  $1,2 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst mit VSVG-GFP und TrueFect nach

Herstellerangaben transfiziert. Vier Stunden nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen über Nacht bei 40 °C kultiviert. Bei dieser Temperatur kann das in der Zelle neu synthetisierte VSVG-GFP nicht korrekt falten und wird aufgrund dessen im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und aggregiert dort. Am nächsten Tag wurden die Zellen für vier Stunden mit 100 µg/ml Cycloheximid und 25 mM HEPES bei 20 °C inkubiert, um die weitere Proteinsynthese zu inhibieren, bevor die Zellen schließlich bei 32 °C weiterkultiviert wurden. Bei dieser Temperatur kann das VSVG-GFP richtig falten und ist in der Lage das ER Richtung Golgi-Apparat und nachfolgend Richtung Plasmamembran zu verlassen. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120 und 180 Minuten bei 32 °C wurden Deckgläschen zum Anfertigen der immunzytologischen Färbungen entnommen und mit Formaldehyd fixiert (siehe Abschnitt 4.13, S. 104). Anschließend erfolgte das Absättigen unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen durch Blocken mit 1 % Milchpulver/PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde der primäre Antikörper gegen die VSVG-Ektodomäne 1:500 in 1 % Milchpulver/PBS verdünnt und über Nacht auf den Deckgläschen bei 4 °C inkubiert. Durch den fehlenden Permeabilisierungsschritt bei den immunzytologischen Untersuchungen konnte der Antikörper nur VSVG detektieren, was zum Zeitpunkt der Inkubation bereits an der Plasmamembran lokalisierte. Der primäre VSVG-Antikörper wurde anschließend durch einen sekundären, Cy3-gekoppelten Antikörper detektierbar gemacht.

#### 4.22 Endo H-Test

**Material:** TrueFect Transfection Reagent (United Biosystems, Herdon, USA); Cycloheximid und HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Endo H mit Denaturierungspuffer und G5 Reaktionspuffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main); Heizplatte TRZ 3700 (Carl Zeiss AG, Jena); Immunpräzipitationspuffer und 2x SDS-PAGE Puffer: Rezepte siehe Abschnitt 4.19, S. 111

Der Endo H-Test gibt Auskunft über den Verbleib von glykolysierten Proteinen in Zellen. Das Enzym Endoglykosidase H (Endo H) schneidet nur mannosereiche Zuckerketten von Proteinen ab, wie sie vor allem im endoplasmatischen Retikulum vorkommen, während die komplexen Zuckerstrukturen an Proteinen im Golgi-Apparat kein Substrat für dieses Enzym darstellen. Analog zum VSVG-Test wurden die verwendeten p0071 Knockdown oder Kontroll-MCF-7-Zellen für diesen Test im 24 Well

mit einer Zelldichte von  $1,2 \cdot 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Auch diese Zellen wurden mittels TrueFect mit der thermoreversiblen GFP-getagte Faltungsvariante von VSVG transfiziert und vier Stunden danach über Nacht bei 40 °C inkubiert. Um die weitere Proteinsynthese zu inhibieren, wurden die Zellen am nächsten Tag für vier Stunden mit 100 µg/ml Cycloheximid und 25 mM HEPES bei 20 °C inkubiert. Nach dem Temperaturwechsel zu 32 °C wurden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120 und 180 Minuten Zelllysate mit jeweils 80 µl Immunpräzipitationpuffer hergestellt (siehe Abschnitt 4.15, S. 107). Nach einem Zentrifugationsschritt wurden 54 µl des Überstandes mit 6 µl Denaturierungspuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 6 µl G5 Reaktionspuffer hinzugesetzt und die Probe auf zwei Reaktionsgefäße à 25 µl aufgeteilt. Dem einen wurde 250 U des Enzyms Endo H zugesetzt, dem anderen nicht. Beide Reaktionsgefäße wurden für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch Zugabe von 25 µl 2x SDS-PAGE Puffer und der anschließenden Inkubation für 5 Minuten bei 95 °C. Die Analyse der gewonnenen Proben auf Endo H-sensitive VSVG-Proteinvarianten erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot (siehe Abschnitt 4.17 und Abschnitt 4.18, ab S. 109).

#### 4.23 Vermessung der Orientierung der mitotischen Spindel

Material: LSM-Mikroskop: Leica DM IRE2 mit TCS SP2 (Leica, Wetzlar); Software ImageJ Version 1.48p

Zur Vermessung der Orientierung der mitotischen Spindel wurden in den 3D kultivierten Caco-2 Zysten durch immunzytologische Färbungen  $\alpha$ -Tubulin und F-Aktin angefärbt (siehe Abschnitt 4.13, S. 104). Das  $\alpha$ -Tubulin diente dabei der Markierung der mitotischen Spindel, das F-Aktin markierte das zentrale Lumen. Mit Hilfe der Information der Lumenposition konnte durch die mitotische Zelle die apikal-basolaterale Zellachse in die Immunfluoreszenzstudien eingezeichnet werden (siehe Abb. 4-1, S. 115). Als apikal gilt die Lumen zugewandte Zellseite, als basal die der umgebenen 3D Matrix zugewandte Zellseite. An der Stelle, wo diese Zellachse den Mittelunkt der Verbindungslinie der beiden Spindelpole schneidet, wurde der Winkel bestimmt. Im Idealfall sollte er 90 ° betragen. Es wurden ausschließlich nur mitotische Zellen vermessen, in denen beide Spindelpole bei den Aufnahmen am LSM-Mikroskop in einer Ebene waren. Das Einzeichnen der Zellachse und der Verbindungslinie

zwischen den beiden Spindelpole sowie das Vermessen des entstandenen Winkels erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.48p.

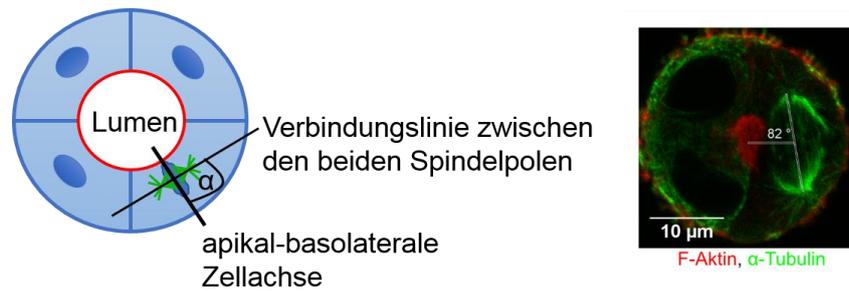


Abb. 4-1: Schema zur Vermessung der Orientierung der mitotischen Spindel  
Um den Winkel  $\alpha$  bestimmen zu können, wurde die apikal-basolaterale Zellachse mit Hilfe des Zentrums des Lumens festgelegt. Das Lumen ist im Schema links rot umrandet. Zudem musste eine Verbindungslinie zwischen den beiden Spindelpolen gezogen werden. Der so aufgespannte Winkel  $\alpha$  diente zur Bestimmung der Orientierung der mitotischen Spindel in Bezug auf die apikal-basolaterale Zellachse. Rechts vom Schema ist beispielhaft eine durchgeführte Vermessung gezeigt.

#### 4.24 Statistische Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Quantifizierungen auf Grundlage von mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken in den einzelnen Diagrammen dargestellt. Der zweiseitige heteroskedastische Student's t-Test wurde zur Bestimmung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Gruppen genutzt.

## ANHANG

**Anhang 1** *Verwendete primäre Antikörper*

Die aufgelisteten primären Antikörper wurden mit der angegebenen Verdünnung für die immunzytologischen Untersuchungen (IF) und Western Blot Analysen (WB) eingesetzt.

**Tabelle 4-5: Übersicht der verwendeten primären Antikörper**

Antikörper (Klon)	Typ	Spezies	Vertrieb	eingesetzte Verdünnung
E-Cadherin (36)	monoklonal	Maus	BD Transduction	IF 1:1000 WB 1:1000
p0071 (tail #10)	polyklonal	Meerschwein	M. Hatzfeld	IF 1:2000
Desmoplakin (616)	polyklonal	Kaninchen	M. Hatzfeld	IF 1:1000 WB 1:1000
pp120 (98)	monoklonal	Maus	BD Transduction	IF 1:1000 WB 1:1000
p120 (H-90)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	IF 1:250 WB 1:500
GFP	polyklonal	Kaninchen	Rockland	WB 1:500
VSVG (8GF11) = ekto-VSVG	monoklonal	Maus	Kerafast	IF 1:500
E-Cadherin (ECCD-1)	monoklonal	Ratte	life technologies	IF 1:500
P-Cadherin (PCD-1)	monoklonal	Ratte	life technologies	IF 1:500
p0071 (head #2)	polyklonal	Meerschwein	M. Hatzfeld	IF 1:1000
$\beta$ -Catenin (14)	monoklonal	Maus	BD Transduction	IF 1:1000 WB 1:1000
p0071 (Epitopmix)	monoklonal	Maus	Progen	IF 1:10 WB 1:50
p0071 (406.3.1)	monoklonal	Maus	Progen	IF 1:10 WB 1:50

Antikörper (Klon)	Typ	Spezies	Vertrieb	eingesetzte Verdünnung
E-Cadherin (EP700Y)	polyklonal	Kaninchen	Merck Millipore	WB 1:500
P-Cadherin (H-105)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	WB 1:250
$\alpha$ -Tubulin (DM1A)	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich	IF 1:1000 WB 1:1000
Desmoglein 1+2	monoklonal	Maus	Progen	IF 1:200 WB 1:500
Plakophilin 1 (10B2)	monoklonal	Maus	Santa Cruz	WB 1:250
Villin	monoklonal	Maus	Serotec	IF 1:50 WB 1:500
ZO-1 (Mid)	polyklonal	Kaninchen	life technolgies	IF 1:500 WB 1:500
Desmocollin 2/3	monoklonal	Maus	life technolgies	IF 1:200 WB 1:500
PKC $\zeta$ (C-20)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	IF 1:200 WB 1:500
Sec24A	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	IF 1:500 WB 1:1000
Sec31A (32)	monoklonal	Maus	BD Transduction	IF 1:500 WB 1:1000
Sar1	polyklonal	Kaninchen	Merck Millipore	WB 1:100
P-Cadherin (56)	monoklonal	Maus	BD Transduction	WB 1:1000
gp135	monoklonal	Maus	DSHB aus Iowa	IF 1:20 WB 1:50

## Anhang 2 *Verwendete sekundäre Antikörper*

Die nachstehenden sekundären Antikörper wurden wie angegeben für die immunzytologische Untersuchungen (IF) oder für die Western Blot Analysen (WB) benutzt. Die sekundären Antikörper für die immunzytologischen Untersuchungen waren mit einem Fluorophor konjugiert. Die sekundären Antikörper für die Western Blot Analysen waren mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Alle verwendeten sekundären Antikörper waren polyklonale Antikörper und stammten aus der Spezies Esel.

Tabelle 4-6: Übersicht der benutzten sekundären Antikörper

Antikörper	Vertrieb	Verdünnung
Anti-Maus DyLight 488	Dianova (Hamburg)	1:250
Anti-Maus DyLight Cy3	Dianova	1:250
Anti-Maus DyLight 649	Dianova	1:50
Anti-Kaninchen DyLight 488	Dianova	1:250
Anti-Kaninchen DyLight Cy3	Dianova	1:250
Anti-Kaninchen DyLight 649	Dianova	1:50
Anti-Ratte DyLight Cy3	Dianova	1:250
Anti-Meerschwein DyLight 488	Dianova	1:250
Anti-Meerschwein DyLight Cy3	Dianova	1:250
Anti-Kaninchen HRP	Dianova	1:20000
Anti-Maus HRP	Dianova	1:20000
Anti-Meerschwein HRP	Dianova	1:20000

## Anhang 3 *Transfizierte siRNAs und shRNAs*

Tabelle 4-7: Übersicht der transfizierten siRNAs

siRNA	verringertes Proteinlevel an ...	5'→3' siRNA-Sequenz bzw. Hersteller
Pool	p0071	siTools Biotech (Matrinsried)
Pool	p120	siTools Biotech (Matrinsried)
Pool	Kontrolle	siTools Biotech (Matrinsried)
Mix	p0071	GCACATTACTCCTATATATGA CATTCTGGATGGAATAACTCT GATAACGATAGAGTTGTTTCT
einzelne	E-Cadherin	AGA ACC UGG UUC AGA UCAA
einzelne	P-Cadherin	CCTGGTACATTTCTCTGACAT
einzelne	Kontrolle	TTGTACTACACAAAAGTACTG

Tabelle 4-8: Übersicht der transfizierten shRNAs

shRNA	verringertes Proteinlevel an ...	5'→3' siRNA-Sequenz
#3	p0071	CAGGAGCTTCAGTTTCAA
#5	p0071	CATTCTGGATGGAATAACTCTT
	Kontrolle	TTGTACTACACAAAAGTACTG

## Anhang 4 Transfizierte Plasmide

Tabelle 4-9: Übersicht der transfizierten Plasmide

Plasmid	Expression von...	Quelle
VSVG-GFP	grün fluoreszierendes, temperatursensitives VSVG-Protein	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der AG Seufferlein
p0071 tail lang pBD	p0071 C-Terminus (Aminosäuren 989-1192)	Klonierung aus pBD (Clontech, Mountain View, USA) und p0071 tail lang TOPO-TA (AG Hatzfeld)

## Anhang 5 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Verschiedenen Arten der Zellpolarität.....	8
Abb. 1-2: Die Entstehung der Zellpolarität in einschichtigen Epithelien.....	10
Abb. 1-3: Die Lokalisation der Polaritätskomplexe in einschichtigen Epithelien.....	11
Abb. 1-4: Die Domänenstruktur von einigen Armadillo-Proteinfamilienmitgliedern ..	14
Abb. 1-5: Vesikeltransportprozesse in polarisierten Epithelien .....	19
Abb. 1-6: Der COPII-vermittelte Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat.....	21
Abb. 1-7: Die Zellpolarisierung von Epithelzellen in der 2D sowie 3D Zellkultur .....	22
Abb. 2-1: Die Lokalisation der Adherens Junctions Proteine in der murinen Haut.....	26
Abb. 2-2: Immunpräzipitationen der Catenine in Keratinozyten .....	30
Abb. 2-3: Immunpräzipitationen der Cadherine in Keratinozyten.....	31
Abb. 2-4: Die Lokalisation von E-Cadherin, p120 und p0071 bei der <i>de novo</i> Zell-Zell-Kontaktbildung in den Mauskeratinozyten .....	35
Abb. 2-5: Die Lokalisation von P-Cadherin, Desmoplakin und p0071 bei der <i>de novo</i> Zell-Zell-Kontaktbildung in den Mauskeratinozyten.....	37
Abb. 2-6: Der Einfluss der Catenine auf die <i>de novo</i> Zell-Zell-Kontaktbildung nach einer Stunde Calciumstimulation in den Mauskeratinozyten.....	39
Abb. 2-7: Der Einfluss der Catenine auf die <i>de novo</i> Zell-Zell-Kontaktbildung 24 Stunden nach Calciumstimulation in den Mauskeratinozyten.....	40
Abb. 2-8: Der Einfluss der Catenine auf die interzelluläre Adhäsion .....	43
Abb. 2-9: Der Einfluss der Catenine auf das Proteinlevel der Adherens Junctions.....	44
Abb. 2-10: Der Einfluss der Cadherine auf die <i>de novo</i> Zell-Zell-Kontaktbildung 24 Stunden nach Calciumstimulation in den Mauskeratinozyten.....	47
Abb. 2-11: Der Einfluss der Cadherine auf die interzelluläre Adhäsion.....	49

Abb. 2-12: Die Proteinmengen verschiedener Adherens Junctions und desmosomaler Proteine in murinen und humanen Keratinozyten während der Differenzierung .....	52
Abb. 2-13: Western Blot Analysen zum Differenzierungsprozess in Caco-2 Zellen .....	56
Abb. 2-14: Die Differenzierung von Caco-2 Zellen in hochprismatische Enterozyten...	57
Abb. 2-15: Die interzelluläre Adhäsion in Caco-2 Zellen nach p0071 Knockdown.....	59
Abb. 2-16: Die Caco-2 Kultivierung auf einem Biochip.....	63
Abb. 2-17: Die p0071 Lokalisation während der Zystenentstehung in Caco-2 Zellen ...	66
Abb. 2-18: <i>Live Cell Imaging</i> der Lumenbildung in Caco-2 Zysten.....	67
Abb. 2-19: Der Effekt von p0071 auf die Lumenbildung.....	68
Abb. 2-20: Die Orientierung der mitotischen Spindeln während der Zystenbildung....	70
Abb. 2-21: Kategorisierung der im <i>Yeast Two Hybrid Screening</i> gefundenen putativen Interaktionspartner für den C-Terminus von p0071 .....	71
Abb. 2-22: Die Lokalisation und das Proteinlevel einiger COPII-Komponenten nach p0071 Knockdown in HeLa- bzw. MCF-7 Zellen .....	73
Abb. 2-23: Die Relokalisation der Sec-Proteine nach einem Nocodazol-Release.....	75
Abb. 2-24: Der VSVG- und Endo H-Test in den stabilen MCF-7 Knockdown-Zellen ...	77
Abb. 3-1: Modell zur Rolle von p0071 bei der apikal-basolateralen Zellpolarität .....	92
Abb. 4-1: Schema zur Vermessung der Orientierung der mitotischen Spindel .....	115

## **Anhang 6      TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 4-1: verwendete Hefestämme .....	94
Tabelle 4-2: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.....	98
Tabelle 4-3: PCR-Programm .....	98
Tabelle 4-4: verwendete Zelllinien.....	99
Tabelle 4-5: Übersicht der verwendeten primären Antikörper .....	116
Tabelle 4-6: Übersicht der benutzten sekundären Antikörper.....	118
Tabelle 4-7: Übersicht der transfizierten siRNAs.....	118
Tabelle 4-8: Übersicht der transfizierten shRNAs .....	118
Tabelle 4-9: Übersicht der transfizierten Plasmide .....	119

## LITERATURVERZEICHNIS

- Aho, Levansuo, et al.** (2002): "Specific sequences in p120ctn determine subcellular distribution of its multiple isoforms involved in cellular adhesion of normal and malignant epithelial cells" *J Cell Sci*, PMID: 11896187
- Alema and Salvatore** (2007): "p120 catenin and phosphorylation: Mechanisms and traits of an unresolved issue" *Biochim Biophys Acta*, PMID: 16904204
- Apodaca, Gallo, et al.** (2012): "Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry" *Nat Cell Biol*, PMID: 23196841
- Baker, Hicke, et al.** (1988): "Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport" *Cell*, PMID: 3293799
- Barlowe, Orci, et al.** (1994): "COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum" *Cell*, PMID: 8004676
- Betschinger, Mechtler, et al.** (2003): "The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl" *Nature*, PMID: 12629552
- Boukamp, Petrussevska, et al.** (1988): "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line" *J Cell Biol*, PMID: 2450098
- Bryant, Datta, et al.** (2010): "A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen" *Nat Cell Biol*, PMID: 20890297
- Bryant and Mostov** (2008): "From cells to organs: building polarized tissue" *Nat Rev Mol Cell Biol*, PMID: 18946477
- Calkins, Hoepner, et al.** (2003): "The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein" *J Biol Chem*, PMID: 12426320
- Capaldo and Macara** (2007): "Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells" *Mol Biol Cell*, PMID: 17093058
- Chantret, Barbat, et al.** (1988): "Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines" *Cancer Res*, PMID: 3349466
- Charest, Jennings, et al.** (2009): "Cadherin-mediated cell-cell contact regulates keratinocyte differentiation" *J Invest Dermatol*, PMID: 18754040
- Chen, Stewart, et al.** (1999): "Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells" *J Cell Biol*, PMID: 10037790

**Daniel and Reynolds** (1995): "The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin" *Mol Cell Biol*, PMID: 7651399

**Davis, Ireton, et al.** (2003): "A core function for p120-catenin in cadherin turnover" *J Cell Biol*, PMID: 14610055

**Davis and Reynolds** (2006): "Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland" *Dev Cell*, PMID: 16399075

**Debnath and Brugge** (2005): "Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures" *Nat Rev Cancer*, PMID: 16148884

**Deguchi, Iizuka, et al.** (2000): "PAPIN. A novel multiple PSD-95/Dlg-A/ZO-1 protein interacting with neural plakophilin-related armadillo repeat protein/delta-catenin and p0071" *J Biol Chem*, PMID: 10896674

**Desclozeaux, Venturato, et al.** (2008): "Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis" *Am J Physiol Cell Physiol*, PMID: 18579802

**Drees, Pokutta, et al.** (2005): "Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly" *Cell*, PMID: 16325583

**Durgan, Kaji, et al.** (2011): "Par6B and atypical PKC regulate mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis" *J Biol Chem*, PMID: 21300793

**Ebnet** (2008): "Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions" *Histochem Cell Biol*, PMID: 18365233

**Ebnet, Suzuki, et al.** (2001): "The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM)" *EMBO J*, PMID: 11447115

**Etienne-Manneville** (2004): "Cdc42--the centre of polarity" *J Cell Sci*, PMID: 15020669

**Etienne-Manneville and Hall** (2002): "Rho GTPases in cell biology" *Nature*, PMID: 12478284

**Fang, Ji, et al.** (2004): "Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac" *J Cell Biol*, PMID: 15067024

**Fogh, Wright, et al.** (1977): "Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors" *J Natl Cancer Inst*, PMID: 833871

**Furukawa, Fujii, et al.** (1997): "Roles of E- and P-cadherin in the human skin" *Microsc Res Tech*, PMID: 9297684

- Gao and Kaestner** (2010): "Cdx2 regulates endo-lysosomal function and epithelial cell polarity" *Genes Dev*, PMID: 20551175
- Gaush, Hard, et al.** (1966): "Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK)" *Proc Soc Exp Biol Med*, PMID: 5918973
- George, Wang, et al.** (2007): "Dimerization and actin-bundling properties of villin and its role in the assembly of epithelial cell brush borders" *J Biol Chem*, PMID: 17606613
- Getsios, Huen, et al.** (2004): "Working out the strength and flexibility of desmosomes" *Nat Rev Mol Cell Biol*, PMID: 15071552
- Graham, Smiley, et al.** (1977): "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5" *J Gen Virol*, PMID: 886304
- Green and Simpson** (2007): "Desmosomes: new perspectives on a classic" *J Invest Dermatol*, PMID: 17934502
- Halbleib, Saaf, et al.** (2007): "Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro" *Mol Biol Cell*, PMID: 17699590
- Hartsock and Nelson** (2012): "Competitive regulation of E-cadherin juxtamembrane domain degradation by p120-catenin binding and Hakai-mediated ubiquitination" *PLoS One*, PMID: 22693575
- Hatzfeld and Nachtshiem** (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*, PMID: 8937994
- Hehnlly and Doxsey** (2014): "Rab11 endosomes contribute to mitotic spindle organization and orientation" *Dev Cell*, PMID: 24561039
- Hennings, Holbrook, et al.** (1980): "Growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture: effects of extracellular calcium" *Curr Probl Dermatol*, PMID: 7238094
- Horikoshi, Suzuki, et al.** (2009): "Interaction between PAR-3 and the aPKC-PAR-6 complex is indispensable for apical domain development of epithelial cells" *J Cell Sci*, PMID: 19401335
- Hulsken, Birchmeier, et al.** (1994): "E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton" *J Cell Biol*, PMID: 7806582
- Hurd, Fan, et al.** (2003): "Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to the polarity protein Par3 regulates cell polarity in mammalian epithelia" *Curr Biol*, PMID: 14653998
- Iden and Collard** (2008): "Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization" *Nat Rev Mol Cell Biol*, PMID: 18946474

- Ireton, Davis, et al.** (2002): "A novel role for p120 catenin in E-cadherin function" *J Cell Biol*, PMID: 12427869
- Ishiyama, Lee, et al.** (2010): "Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion" *Cell*, PMID: 20371349
- Izawa, Nishizawa, et al.** (2002): "ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells" *Genes Cells*, PMID: 12047349
- Jaffe, Kaji, et al.** (2008): "Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis" *J Cell Biol*, PMID: 19001128
- Jaulin-Bastard, Arsanto, et al.** (2002): "Interaction between Erbin and a Catenin-related protein in epithelial cells" *J Biol Chem*, PMID: 11711544
- Jensen and Schekman** (2011): "COPII-mediated vesicle formation at a glance" *J Cell Sci*, PMID: 21172817
- Jin, Pahuja, et al.** (2012): "Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function" *Nature*, PMID: 22358839
- Kanno, Isa, et al.** (2008): "P120-catenin is a novel desmoglein 3 interacting partner: identification of the p120-catenin association site of desmoglein 3" *Exp Cell Res*, PMID: 18343367
- Keil and Hatzfeld** (2014): "The armadillo protein p0071 is involved in Rab11-dependent recycling" *J Cell Sci*, PMID: 24163434
- Keil, Schulz, et al.** (2013): "p0071/PKP4, a multifunctional protein coordinating cell adhesion with cytoskeletal organization" *Biol Chem*, PMID: 23640939
- Kimura, Merritt, et al.** (2007): "Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive" *J Invest Dermatol*, PMID: 17195016
- Kuge, Dascher, et al.** (1994): "Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments" *J Cell Biol*, PMID: 8138575
- Laprise, Viel, et al.** (2004): "Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells" *J Biol Chem*, PMID: 14699157
- Lechler and Fuchs** (2005): "Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin" *Nature*, PMID: 16094321
- Lenox, Koch, et al.** (2000): "Postnatal lethality of P-cadherin/desmoglein 3 double knockout mice: demonstration of a cooperative effect of these cell adhesion molecules in tissue homeostasis of stratified squamous epithelia" *J Invest Dermatol*, PMID: 10771476

**Lewis, Jensen, et al.** (1994): "Cadherin function is required for human keratinocytes to assemble desmosomes and stratify in response to calcium" *J Invest Dermatol*, PMID: 8006450

**Lin, Edwards, et al.** (2000): "A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity" *Nat Cell Biol*, PMID: 10934475

**Lock and Stow** (2005): "Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin" *Mol Biol Cell*, PMID: 15689490

**Lohia, Qin, et al.** (2012): "The Scribble polarity protein stabilizes E-cadherin/p120-catenin binding and blocks retrieval of E-cadherin to the Golgi" *PLoS One*, PMID: 23226478

**Mancias and Goldberg** (2008): "Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery" *EMBO J*, PMID: 18843296

**Martin-Belmonte, Gassama, et al.** (2007): "PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42" *Cell*, PMID: 17254974

**Martin-Belmonte and Perez-Moreno** (2012): "Epithelial cell polarity, stem cells and cancer" *Nat Rev Cancer*, PMID: 22169974

**Martin-Belmonte, Yu, et al.** (2008): "Cell-polarity dynamics controls the mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis" *Curr Biol*, PMID: 18394894

**McNeill, Ryan, et al.** (1993): "Spatial and temporal dissection of immediate and early events following cadherin-mediated epithelial cell adhesion" *J Cell Biol*, PMID: 8436592

**Medvetz, Khabibullin, et al.** (2012): "Folliculin, the product of the Birt-Hogg-Dube tumor suppressor gene, interacts with the adherens junction protein p0071 to regulate cell-cell adhesion" *PLoS One*, PMID: 23139756

**Mellman and Nelson** (2008): "Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells" *Nat Rev Mol Cell Biol*, PMID: 18946473

**Merte, Jensen, et al.** (2010): "Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure" *Nat Cell Biol*, PMID: 19966784

**Michels, Buchta, et al.** (2009): "Classical cadherins regulate desmosome formation" *J Invest Dermatol*, PMID: 19262605

**Miller, Beilharz, et al.** (2003): "Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles" *Cell*, PMID: 12941277

- Miranda, Joseph, et al.** (2003): "Contextual binding of p120ctn to E-cadherin at the basolateral plasma membrane in polarized epithelia" J Biol Chem, PMID: 12923199
- Miranda, Khromykh, et al.** (2001): "A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells" J Biol Chem, PMID: 11312273
- Mizuno and Singer** (1994): "A possible role for stable microtubules in intracellular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus" J Cell Sci, PMID: 7929638
- Myster, Cavallo, et al.** (2003): "Drosophila p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component" J Cell Biol, PMID: 12551951
- Nagai-Tamai, Mizuno, et al.** (2002): "Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells" Genes Cells, PMID: 12390250
- Nahorski, Seabra, et al.** (2012): "Folliculin interacts with p0071 (plakophilin-4) and deficiency is associated with disordered RhoA signalling, epithelial polarization and cytokinesis" Hum Mol Genet, PMID: 22965878
- Nanes, Chiasson-MacKenzie, et al.** (2012): "p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins" J Cell Biol, PMID: 23071156
- Navarro, Nola, et al.** (2005): "Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement" Oncogene, PMID: 15806148
- Niessen** (2007): "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function" J Invest Dermatol, PMID: 17934504
- Niessen, Iden, et al.** (2012): "The in vivo function of mammalian cell and tissue polarity regulators--how to shape and maintain the epidermal barrier" J Cell Sci, PMID: 22935653
- Noren, Liu, et al.** (2000): "p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases" J Cell Biol, PMID: 10931868
- Nose and Takeichi** (1986): "A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos" J Cell Biol, PMID: 3539943
- O'Brien, Jou, et al.** (2001): "Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly" Nat Cell Biol, PMID: 11533663
- O'Brien, Zegers, et al.** (2002): "Opinion: Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models" Nat Rev Mol Cell Biol, PMID: 12094219

- O'Keefe, Briggaman, et al.** (1987): "Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes" *J Cell Biol*, PMID: 2442175
- Perez-Moreno, Davis, et al.** (2006): "p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin" *Cell*, PMID: 16469707
- Perona, Montaner, et al.** (1997): "Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins" *Genes Dev*, PMID: 9042860
- Pettitt, Cox, et al.** (2003): "The *Caenorhabditis elegans* p120 catenin homologue, JAC-1, modulates cadherin-catenin function during epidermal morphogenesis" *J Cell Biol*, PMID: 12847081
- Pieters, van Hengel, et al.** (2012): "Functions of p120ctn in development and disease" *Front Biosci (Landmark Ed)*, PMID: 22201773
- Presley, Cole, et al.** (1997): "ER-to-Golgi transport visualized in living cells" *Nature*, PMID: 9288971
- Qin, Capaldo, et al.** (2005): "The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin" *J Cell Biol*, PMID: 16344308
- Qin, Meisen, et al.** (2010): "Tuba, a Cdc42 GEF, is required for polarized spindle orientation during epithelial cyst formation" *J Cell Biol*, PMID: 20479467
- Rheinwald and Beckett** (1980): "Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes" *Cell*, PMID: 6160916
- Riggelman, Wieschaus, et al.** (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*, PMID: 2707602
- Roura and Dominguez** (2004): "Inducible expression of p120Cas1B isoform corroborates the role for p120-catenin as a positive regulator of E-cadherin function in intestinal cancer cells" *Biochem Biophys Res Commun*, PMID: 15219847
- Rowe, Aridor, et al.** (1996): "COPII vesicles derived from mammalian endoplasmic reticulum microsomes recruit COPI" *J Cell Biol*, PMID: 8922375
- Royer and Lu** (2011): "Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer?" *Cell Death Differ*, PMID: 21617693
- Scherer and Hoogasian** (1954): "Preservation at subzero temperatures of mouse fibroblasts (strain L) and human epithelial cells (strain HeLa)" *Proc Soc Exp Biol Med*, PMID: 13237281

**Setzer, Calkins, et al.** (2004): "Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration" *J Invest Dermatol*, PMID: 15304078

**Sotillos, Diaz-Meco, et al.** (2004): "DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*" *J Cell Biol*, PMID: 15302858

**Soule, Vazquez, et al.** (1973): "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma" *J Natl Cancer Inst*, PMID: 4357757

**Stenzel, Fetzer, et al.** (2009): "PDZ-domain-directed basolateral targeting of the peripheral membrane protein FRMPD2 in epithelial cells" *J Cell Sci*, PMID: 19706687

**Suzuki, Ishiyama, et al.** (2002): "aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization" *J Cell Sci*, PMID: 12186943

**Suzuki, Yamanaka, et al.** (2001): "Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures" *J Cell Biol*, PMID: 11257119

**Takeichi** (1990): "Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion" *Annu Rev Biochem*, PMID: 2197976

**Thoreson, Anastasiadis, et al.** (2000): "Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion" *J Cell Biol*, PMID: 10629228

**Tinkle, Lechler, et al.** (2004): "Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses" *Proc Natl Acad Sci U S A*, PMID: 14704278

**Tinkle, Pasolli, et al.** (2008): "New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity" *Proc Natl Acad Sci U S A*, PMID: 18809908

**Tunggal, Helfrich, et al.** (2005): "E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions" *EMBO J*, PMID: 15775979

**Ullrich, Reinsch, et al.** (1996): "Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome" *J Cell Biol*, PMID: 8922376

**Vijayaraj, Kroger, et al.** (2009): "Keratins regulate protein biosynthesis through localization of GLUT1 and -3 upstream of AMP kinase and Raptor" *J Cell Biol*, PMID: 19841136

**Ward, Polishchuk, et al.** (2001): "Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export" *J Cell Biol*, PMID: 11706049

- Weissman, Plutner, et al.** (2001): "The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export" *Traffic*, PMID: 11422940
- Wendeler, Paccaud, et al.** (2007): "Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum" *EMBO Rep*, PMID: 17255961
- Wildenberg, Dohn, et al.** (2006): "p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho" *Cell*, PMID: 17129786
- Wolf, Keil, et al.** (2006): "The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis" *Nat Cell Biol*, PMID: 17115030
- Xiao, Garner, et al.** (2005): "p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin" *Mol Biol Cell*, PMID: 16120645
- Yamada, Pokutta, et al.** (2005): "Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex" *Cell*, PMID: 16325582
- Yamanaka, Horikoshi, et al.** (2003): "Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity" *Curr Biol*, PMID: 12725730
- Yamanaka, Horikoshi, et al.** (2001): "PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex" *Genes Cells*, PMID: 11532031
- Yeaman, Grindstaff, et al.** (2004): "Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells" *J Cell Sci*, PMID: 14709721
- Yu, Shewan, et al.** (2008): "Involvement of RhoA, ROCK I and myosin II in inverted orientation of epithelial polarity" *EMBO Rep*, PMID: 18660750
- Zhang, Zhao, et al.** (2014): "Impact of p120-catenin isoforms 1A and 3A on epithelial mesenchymal transition of lung cancer cells expressing E-cadherin in different subcellular locations" *PLoS One*, PMID: 24505377
- Zheng, Zhu, et al.** (2010): "LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis" *J Cell Biol*, PMID: 20385777

**DANKSAGUNG**

Abschließend möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Mechthild Hatzfeld für die Möglichkeit meine Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Molekulare Medizin anfertigen zu können. Darüber hinaus für Ihre Unterstützung, die maßgeblich zum Entstehen der Arbeit beitrug.

Prof. Elmar Wahle und Prof. Otmar Huber für die Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Otmar Huber des Weiteren für die Kooperation, die eine Kultivierung der Caco-2 Zellen auf einem neuartigen Biochip ermöglicht hat. Bei diesen Experimenten hat mich zudem maßgeblich Florian Berlinghof unterstützt.

Candy Rothgänger und Chalid Ghadban für die Einarbeitung im Umgang mit formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Geweben.

Dr. René Keil für die wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Diplom-Biochemikerin Katrin Rietscher für das Präparieren und die Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen der Maushaut sowie für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre sonnige Art.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hatzfeld für all die schönen Dinge, die dazu beitrugen, dass mir meine Zeit am Institut in positiver Erinnerung bleiben wird.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Martin und meine Eltern bedanken, dass sie mich zu jeder Zeit und in jeder Form unterstützt und motiviert haben auf meinem Weg zum Dokortitel!

**LEBENS LAUF**Persönliche Angaben:

Name:	Schulz
Vorname:	Jenny
Akademischer Grad:	Diplom-Biochemikerin
Geburtsdatum:	25.04.1986
Geburtsort:	Berlin
Geschlecht:	weiblich
Wohnsitz- und Korrespondenzanschrift:	Paracelsusstraße 15 06114 Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Fachgebiet der Promotion:

Biochemie, Molekular- und Zellbiologie

Studium:

10/2005 - 09/2010	Diplomstudium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit: Der Par-Komplex in der Zytokinese
10/2010 - 04/2015	Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Institut für Molekulare Medizin, Abteilung Pathobiochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Mechthild Hatzfeld

Publikationsliste:

R. Keil, J. Schulz, M. Hatzfeld (2013): p0071/PKP4, a multifunctional protein coordinating cell adhesion with cytoskeletal organization, *Biol Chem* Vol. 394

Vorträge:

J. Schulz, A. Wingenfeld, R. Keil, M. Hatzfeld (2012): Mouse keratinocytes as model system to study cell-cell contacts, Workshop des SFB610 „Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz“, Oppurg

Poster:

J. Schulz, R. Keil, M. Hatzfeld (2015): p0071 affects cell polarity, „International Meeting of the German Society for Cell Biology“, 24. - 27. März, Köln

***EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG***

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Weiterhin versichere ich, dass diese Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle (Saale), 29.10.2015

---

Jenny Schulz